



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจ  
วิเคราะห์สารปนเปื้อนและสารตกค้างในอาหาร

### โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนัน ธิพิพัฒน์ไพบูลย์

31 ตุลาคม 2554

สัญญาเลขที่ RMU5180009

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนและสาร  
ตกค้างในอาหาร

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนันท์ ธิพิพัฒน์ไพบุลย์

สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญรูป	iv
สารบัญตาราง	vi
สัญลักษณ์และคำย่อ	vii
บทคัดย่อภาษาไทย	xi
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	xii
Executive Summary	xiii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 วัตถุประสงค์	1
1.2 ระเบียบวิธีวิจัย	1
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 เอกสารอ้างอิง	3
บทที่ 2 โครงการย่อยที่ 1: เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชในผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์การเกษตร	
2.1 บทนำ	4
2.2 โครงการย่อย 1.1 การตรวจวัดกลุ่มสารกำจัดวัชพืชในข้าวโดยการดัดแปรวิธีการสกัดแบบ QuEChERS และการตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี	5
2.2.1 การทดลอง	6
2.2.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี	6
2.2.1.2 สารมาตรฐานกลุ่มกรดฟีนอกซี	6
2.2.1.3 เครื่องมือและภาวะการทดลอง	7
2.2.1.4 การเตรียมตัวอย่าง	8
2.2.1.5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ	9
2.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์	9
2.2.2.1 ภาวะของเครื่องมือ UPLC-ESI-MS-MS	9
2.2.2.2 ภาวะการสกัดสารตัวอย่าง	9
- การสกัดด้วยการกระจายตัวในเฟสของเหลว-ของเหลว	9

	- การทำความสะอาดสารละลายสกัดตัวอย่าง ด้วยวิธีการกระจายเฟสของแข็งลงในสารละลายสกัด (Dispersive-SPE clean up)	12
	- สมรรถนะของวิธีการ (Method performance)	13
2.2.3	สรุปผลการทดลอง	15
2.2.4	เอกสารอ้างอิง	17
2.3	โครงการย่อย 1.2 การขยายขอบข่ายวิธีการ QuEChERS เพื่อการสกัด สารกำจัดศัตรูพืชครอบคลุมกลุ่มธาตุพืช พืชที่มีน้ำมันมาก เช่น ถั่ว เมล็ด แฟลกซ์ซีด (flaxseeds) และแป้ง (doughs)	19
2.3.1	การทดลอง	20
2.3.1.1	วัสดุและสารเคมีที่ใช้	20
2.3.1.2	เครื่องมือและสภาวะการทดลอง	21
2.3.1.3	การเตรียมตัวอย่าง	23
2.3.2	ผลการทดลองและวิจารณ์	25
2.3.2.1	วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม	25
2.3.2.2	ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์	30
2.3.2.2.1	ความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด	30
2.3.2.2.2	ค่าร้อยละการคืนกลับ	31
2.3.2.2.3	การทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ	33
2.3.3	สรุปผลการทดลอง	38
2.3.4	เอกสารอ้างอิง	38
2.4	โครงการย่อย 1.3 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิดอย่างรวดเร็ว โดยการสกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อคู่ กับระบบแมสสเปกโทรเมตรีชนิดไทม์ออฟไฟท์แบบความดันต่ำ	41
2.4.1	การทดลอง	43
2.4.1.1	สารเคมีและอุปกรณ์	43
2.4.1.2	การเตรียมสารมาตรฐาน	48
2.4.1.3	วิธีเตรียมตัวอย่าง	48
2.4.1.4	สภาวะการทดลอง LP-GC/TOFMS	50
2.4.1.5	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ	51
2.4.2	ผลการทดลองและวิจารณ์	51
2.4.2.1	ภาวะที่เหมาะสมของ LP-GC/TOFMS	51
2.4.2.2	สมรรถนะของวิธีการ	54

	2.4.2.2.1	ความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด	55
	2.4.2.2.2	ระดับต่ำสุดของการทำปริมาณวิเคราะห์	55
	2.4.2.2.3	ร้อยละการคืนกลับ	55
	2.4.2.2.4	ชนิดและผลของตัวดูดซับต่อการทำ ความสะอาดสารละลายสกัด	60
	2.4.2.2.5	ความเที่ยง	62
	2.4.2.3	การเปรียบเทียบการกระจายวัฏภาคของแข็ง (d- SPE) เทียบกับวิธีการ DPX ในการทำความสะอาด สารละลายสกัด	62
	2.4.2.4	ความทนทานของวิธีการ	63
	2.4.2.5	อิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์	63
	2.4.3	สรุปผลการทดลอง	65
	2.4.4	เอกสารอ้างอิง	65
บทที่ 3		เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยด้วยเมมเบรนสำหรับการวิเคราะห์ โกลโฟสเตต และ กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิกในน้ำ โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง และการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column ร่วมกับ การตรวจวัดชนิด ฟลูออเรสเซนส์	
	3.1	บทนำ	68
	3.2	การทดลอง	71
	3.2.1	สารเคมีและอุปกรณ์	71
	3.2.2	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและการเตรียมอนุพันธ์ แบบ post-column	72
	3.2.3	การสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนที่บรรจุของเหลว	73
	3.3	ผลการทดลองและการอภิปรายผล	73
	3.3.1	สารตัวพา	74
	3.3.2	การเลือกชนิดของเหลวที่บรรจุที่ผนังเมมเบรน	
	3.3.3	การเลือกสารละลายตัวให้	75
	3.3.4	การเลือกสารละลายตัวรับ	75
	3.3.5	สัดส่วนปริมาตรของสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ	77
	3.3.6	การถ่ายเทมวล	79
	3.3.7	ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวพา	79
	3.3.8	เวลาที่ใช้ในการสกัด	80

	3.3.9	การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ร่วมกับการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column (HPLC analysis with post-column derivatization)	80
	3.3.10	สภาวะการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ (optimum $\mu$ -SLME procedure and method validation)	81
	3.3.10.1	ค่าการเพิ่มความเข้มข้น (Enrichment factor)	83
	3.3.10.2	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ (Method Validation)	84
	3.3.10.3	การนำวิธีการไปใช้งาน (Method application)	84
	3.4	สรุปผลการทดลอง	85
	3.5	เอกสารอ้างอิง	85
บทที่ 4		โครงการย่อยที่ 3: การตรวจวัดสารกลุ่มยาเสพติดต่างกลุ่มพร้อมกัน	
	4.1	บทนำ	88
	4.2	โครงการย่อย 3.1: การตรวจวัดสารกลุ่มยาเสพติดต่างชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรฟิลิกลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี	89
	4.2.1	วิธีการดำเนินงานวิจัย	89
	4.2.2	การทดลอง	90
	4.2.2.1	สารเคมีที่ใช้	90
	4.2.2.2	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน	93
	4.2.2.3	เครื่องมือและภาวะที่ใช้ในการตรวจวัด	94
	4.2.2.4	การเตรียมตัวอย่าง	94
	4.2.2.5	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	95
	4.2.3	ผลและวิจารณ์การทดลอง	96
	4.2.3.1	ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วย HILIC-ESI-MS/MS	96
	4.2.3.2	ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง	99
	4.2.3.3	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ	101
	4.2.3.3.1	การบ่งชี้สาร (Identification)	101
	4.2.3.3.2	ค่าการเลือกจำเพาะ (Selectivity or Specificity)	102
	4.2.3.3.3	ผลของเมทริกซ์	102
	4.2.3.3.4	ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	102

	4.2.3.3.5	ค่าร้อยละการคืนกลับ (Recovery)	105
	4.2.3.3.6	ความเที่ยง (precision)	106
	4.2.3.3.7	ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Analytical Limit)	106
	4.2.3.4	การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง	109
	4.2.4	สรุปผลการวิจัย	109
	4.2.5	เอกสารอ้างอิง	110
4.3		โครงการย่อย 3.2: การวิเคราะห์แบบพร้อมกันของสารปฏิชีวนะหลาย กลุ่มที่ตกค้างในน้ำด้วยการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใย กลวงโดยใช้สารตัวพาและตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิด ของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี	112
	4.3.1	บทนำ	112
	4.3.2	วิธีการดำเนินงานวิจัย	114
	4.3.2.1	สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้	114
	4.3.2.2	วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน	114
	4.3.2.3	ระบบการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ	114
	4.3.2.4	ขั้นตอนของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟส ของเหลวด้วยเส้นใยกลวง	115
	4.3.3	ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	118
	4.3.3.1	เวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงที่มีต่อการเพิ่มความ เข้มข้นของสาร	118
	4.3.3.2	สารตัวพาและการเลือกตัวทำละลาย	118
	4.3.3.3	สารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ	121
	4.3.3.4	เวลาที่ใช้ในการสกัด	122
	4.3.4	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ	125
	4.3.5	การใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใย กลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ	127
	4.3.6	สรุปและข้อเสนอแนะ	128
	4.3.7	เอกสารอ้างอิง	129
บทที่ 5		บทสรุปงานวิจัย วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	133
		Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	135

## ภาคผนวก

บทความตีพิมพ์นานาชาติ

โครงการที่ 1 (บทที่ 2)

- 1 Urrairat Koesukwiwat, Kunaporn Sanguankaew, **Natchanun Leepipatpiboon\***, Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 2008, **626**, 10-20. (Impact factor 4.310\*)<sup>i</sup> published.
- 2 Steven J. Lehotay, Kyung Ae Son, Hyeyong Kwon, Urrairat Koesukwiwat, Wusheng Fu, Katerina Mastovska, Eunha Hoh and **Natchanun Leepipatpiboon\***, Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 2548-2560 (Impact factor 4.194\*) published.
- 3 Urrairat Koesukwiwat, Steven J. Lehotay, Katerina Mastovska, Kelly Dorweiler and **Natchanun Leepipatpiboon**, Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts and doughs, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2010, **58**, 5950-5958. (Impact factor 2.816\*) published.
- 4 Urrairat Koesukwiwat, Steven J. Lehotay, Shui Miao and **Natchanun Leepipatpiboon**, High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**(43), 6692-6703 Impact Factor 4.194\* published.

- 5 Steven J. Lehotay, Urairat Koesukwiwat, Henk van der Kamp, Hans G.J. Mol, and **Natchanun Leepipatpiboon**, Qualitative aspects in the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using fast, low-pressure gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(14), 7544-7556 Impact Factor 2.816\*
- 6 Urairat Koesukwiwat, Steven J. Lehotay, **Natchanun Leepipatpiboon**, Fast. Low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry of 150 pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2011, inpress Impact Factor 4.194\*.

บทความตีพิมพ์นานาชาติ

โครงการที่ 2 (บทที่ 3)

- 1 Montra Piriya Pittaya, Siripastra Jayanta, Somenath Mitra, **Natchanun Leepipatpiboon\***, Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1189(1-2)**, 483-492. (Impact factor 4.194\*) published

บทความตีพิมพ์นานาชาติ

โครงการที่ 3 (บทที่ 4)

- 1 Chayada Chiao Chan, Urairat Koesukwiwat, Soparat Yudthavorasit, **Natchanun Leepipatpiboon**, Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle, *Analytica Chimica Acta*, 2010, **682(1-2)**, pp.117-129 Impact factor 4.310\* published.
- 2 Soparat Yudthavorasit, Chayada Chiao Chan, **Natchanun Leepipatpiboon**, Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Micro chimica Acta*, 2011, **172(1)**, pp. 39-49 impact factor 2.578\* published.

## สารบัญรูป

	หน้า	
รูปที่ 2.2.1	ชนิดและสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสาร Phenoxy acids 13 ชนิด ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้	7
รูปที่ 2.2.2	ผลของการปรับค่าพีเอชของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่มีต่อร้อยละการคืนกลับของการตรวจวัดสารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซีทั้ง 13 ชนิด	12
รูปที่ 2.2.3	ผลของการเติมซิเตรทบัฟเฟอร์ในขั้นตอนที่ 3 ของการสกัดตัวอย่างต่อร้อยละการคืนกลับ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)	13
รูปที่ 2.2.4	ผลของการเลือกใช้ของแข็งดูดซับต่างชนิดและปริมาณที่มีต่อร้อยละการคืนกลับของสาร	14
รูปที่ 2.2.5	สัญญาณการตรวจวัด Multiple-reaction monitoring, MRM ที่จากเครื่อง UPLC-ESI-MS/MS ของตัวอย่างข้าวที่เติมสารมาตรฐานกลุ่มสารกำจัดวัชพืชกรดฟีนอกซี 13 ชนิด ลงไปที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	15
รูปที่ 2.2.6	แผนผังสรุปวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนามาเพื่อการตรวจสอบสารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซีในข้าว	17
รูปที่ 2.3.1	การแยกไขมันในเมล็ด flaxseed ในระบบ GPC ออกจากสารกำจัดศัตรูพืชที่ศึกษา โดยฉีดตัวอย่างน้ำมันสกัด 1 กรัม และเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ GPC ทุก 1 นาที	26
รูปที่ 2.3.2	ผลของเวลาที่มีต่อการตกตะกอนสารสกัดร่วมในสารละลายสกัด QuEChERS flaxseed (ก่อนขั้นตอน cleanup ด้วย d-SPE) ที่ $-20^{\circ}\text{C}$	28
รูปที่ 2.3.3	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการตกตะกอนไขมันในสารสกัด QuEChERS flaxseed โดยเก็บเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิ $-85^{\circ}\text{C}$ จะเพิ่มอุณหภูมิถึง $-45^{\circ}\text{C}$ ก่อนจึงจะสามารถละลายอะซิโตนไนไตรล์และนำออกเพื่อทำการชั่งน้ำหนักสารได้)	28
รูปที่ 2.3.4	ร้อยละการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองซ้ำ 6 วัน ของสารที่ตรวจวัด 20 ชนิด แสดงตามค่าการเพิ่มขึ้นของร้อยละการคืนกลับ และเป็นไปตามค่าการลดลงของค่าการละลายในไขมันในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างเมล็ด flaxseed ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด และสกัดด้วยวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้	35

รูปที่ 2.3.5	GC/TOF-MS total ion chromatograms ของ (A-B) flaxseeds, (C) peanut, and (D) biscuit (E) pie crust และ (F) cinnamon roll	36
รูปที่ 2.4.1	การกระจายค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิดในเนื้อเมทริกซ์มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ มันฝรั่ง และผักใบเขียว เมื่อใช้เทคนิคการสกัดและการทำความสะอาดสารสกัดที่แตกต่างกันและตรวจวัดด้วย LP-GC/TOFMS	58
รูปที่ 2.4.2	Total ion chromatogram ของการสกัดตัวอย่าง (A) มันฝรั่ง และ (B) ส้ม โดยใช้วิธีการสกัด QuEChERS แบบใช้บัฟเฟอร์และไม่ใช้บัฟเฟอร์และใช้การทำความสะอาดละลายสกัดด้วย d-SPE	59
รูปที่ 2.4.3	ค่าร้อยละการคืนกลับของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นแนวระนาบในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกันและใช้การสกัด QuEChERS และการ clean-up ที่แตกต่างกัน (n=15 โดยการรวมผลของการเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ระดับเข้าด้วยกัน) และใช้ GCB 7.5 mg	61
รูปที่ 2.4.4	การกระจายของค่าร้อยละของอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ที่มีต่อสารกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจวัดทั้ง 150 ชนิด เมื่อสกัดด้วยวิธี QuEChERS ที่แตกต่างกันและวิเคราะห์ด้วย	64
รูปที่ 3.1	ผลของค่า pH ของสารละลายตัวให้ต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้นสารละลายตัวให้: โกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร $V_d$ 20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร $V_a$ 30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.20 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที	76
รูปที่ 3.2	ผลของชนิดตัวรับต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: โกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร $V_d$ 20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร $V_a$ 30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที	77
รูปที่ 3.3	ผลของปริมาตรตัวให้ต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: โกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0; สารละลายตัวรับ: โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร $V_a$ 20 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที	78

รูปที่ 3.4	ผลของปริมาตรตัวรับต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร $V_d$ 20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที	79
รูปที่ 3.5	ผลของความเข้มข้นของตัวพาต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร $V_d$ 20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร $V_a$ 30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether; เวลาสกัด 45 นาที	80
รูปที่ 3.6	ผลของเวลาที่ใช้สกัดต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร $V_d$ 20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร $V_a$ 30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์	82
รูปที่ 3.7	ปฏิกิริยา Postcolumn ของไกลโฟเสตและ AMPA	82
รูปที่ 3.8	โครมาโทแกรมที่ซ้อนทับกันของสารละลายมาตรฐานไกลโฟเสต 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ AMPA 8 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งวิเคราะห์โดย (a) การฉีดสารสู่เครื่องโดยตรง (direct injection) (b) ผ่านกระบวนการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลว	83
รูปที่ 4.2.1	ชื่อและโครงสร้างทางเคมีของยาสัตว์ 24 ชนิดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้	91
รูปที่ 4.2.2	แผนผังการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ก่อนการวิเคราะห์	95

รูปที่ 4.2.3	การเปรียบเทียบสภาพไวและรูปร่างพีคของสาร amprolium และ spiramycin ภาพ (a) reversed-phase ใช้คอลัมน์ water acquity UPLC BEH shield RP18 (2.1 mm x100 mm; 1.7 $\mu$ m) ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฟสเคลื่อนที่ A: 0.3% HOAc ใน 10 mM ammonium acetate และเฟสเคลื่อนที่ B: 0.3% HOAc ใน MeOH-MeCN (1:1,v/v) (b) ion-pair ใช้คอลัมน์ water acquity UPLC BEH shield RP18 (2.1 mm x100 mm; 1.7 $\mu$ m) ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฟสเคลื่อนที่ A: 0.01 M HFBA ใน MeCN-น้ำ (5:95, v/v) และเฟสเคลื่อนที่ B: 0.01 M HFBA ใน MeCN-น้ำ (95:5, v/v) และ (c) HILIC ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภาพการทดลองแสดงไว้ในหัวข้อเครื่องมือและภาวะการทดลอง	98
รูปที่ 4.2.4	อิทธิพลของความเข้มข้นของ TCA ที่มีต่อค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น MRL ของยาสัตว์ทั้ง 24 ชนิด	100
รูปที่ 4.2.5	ภาพโครมาโทแกรมเปรียบเทียบความแรงของตัวทำละลายที่มีผลต่อการแยกสาร lincomycin (LIN) และ pyrillimycin (PIR) ที่ระดับความเข้มข้น MRL อัตราส่วนสารละลายสกัดตัวอย่างต่อตัวทำละลายผสม (10% formic acid ในน้ำ : MeCN (1:9, v/v); (a) 1:9, (b) 2:8, (c) 3:7, (d) 4:6 และ (e) 5:5	103
รูปที่ 4.2.6	ผลของเมทริกซ์ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS แสดงค่าเปรียบเทียบร้อยละของความแตกต่างของสัญญาณการตอบสนองกรณีสารมาตรฐานอยู่ในตัวทำละลายเทียบกับกรณีสารมาตรฐานอยู่ในสารละลายสกัดเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้น MRL ของสารทุกชนิดที่ทำการตรวจวัด	105
รูปที่ 4.3.1	ผลของเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงในตัวทำละลายที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	120
รูปที่ 4.3.2	ผลของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ แบบไม่มีสารตัวพาที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	123
รูปที่ 4.3.3	ผลของปริมาณสารตัวพาใน DHE ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	125
รูปที่ 4.3.4	โครมาโทแกรมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา	128

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.2.1	ชื่อสารสูตรและน้ำหนักโมเลกุลและภาวะการตั้งค่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS	10
ตารางที่ 2.2.2	เปรียบเทียบวิธีการที่มีการพัฒนาการตรวจวัดสารกลุ่มยากำจัดวัชพืชด้วยวิธีการที่แตกต่างกันและในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน	11
ตารางที่ 2.2.3	ค่ารีเทนชันไทม์ ค่าร้อยละการคืนกลับ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์ของสารกำจัดวัชพืชกลุ่มฟีนอกซี 13 ชนิดในตัวอย่างข้าว	16
ตารางที่ 2.3.1	ส่วนประกอบของเนื้อตัวอย่าง* ที่สนใจในงานวิจัยนี้	20
ตารางที่ 2.3.2	ค่ารีเทนชันไทม์ และไอออนที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์สารแต่ละชนิด รวมถึงค่า ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานในเนื้อเมทริกซ์แบลงก์ของสารสกัด flaxseeds ฉีด 10 $\mu$ L ผ่าน PTV Optic-3 injection.	24
ตารางที่ 2.3.3	เวลาการผ่านออกมาจากระบบคอลัมน์ GPC ของสารกำจัดศัตรูพืชที่เลือกศึกษาจำนวน 34 ชนิด โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 1:1 EtOAc : cyclohexane อัตราการไหล 5 mL/min ปริมาตรการฉีด 5 มิลลิลิตร	26
ตารางที่ 2.3.4	การเปรียบเทียบอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ที่มีต่อสัญญาณการตรวจวัดใน GC-TOF ในกรณีที่ใช้การฉีดแบบ pressure-pulsed splitless injection (PSI) โดยฉีด 2 ไมโครลิตรของสารละลายที่ผ่านการสกัดคิดเป็น 0.5 กรัมเนื้อสารต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร และ large volume injection (LVI) โดยฉีด 10 ไมโครลิตรของสารละลายที่ผ่านการสกัด คิดเป็น 0.25 กรัมเนื้อสารต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร ผลของเมทริกซ์คำนวณโดยคิดค่าความแตกต่างระหว่างค่าความชันของกราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมในเนื้อเมทริกซ์เทียบกับที่เตรียมในตัวทำละลาย พิจารณาความแตกต่าง "0" <20%, "+"= 20-50%, "++" = 50-100% และ "+++" >100%	32
ตารางที่ 2.3.5	ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารกำจัดศัตรูพืช 32 ชนิด ในเนื้อเมทริกซ์แบลงก์ที่แตกต่างกัน และเติมสารมาตรฐานแต่ละชนิดลงไปปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อกรัม ทำการทดลอง 3-8 ซ้ำ (ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้สารเทียบมาตรฐานภายใน diazinon)	34

ตารางที่ 2.3.6	ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับ (%recoveries) ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(%RSDs) และขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวัด(LODs) ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ General Mills แสดงเฉพาะสารกำจัดศัตรูพืช 32 ชนิด และใช้สารมาตรฐานภายใน d5-atrazine (IS) ใช้ตัวอย่าง flaxseed และเติมสารมาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น ทุกตัวอย่าง ทำสกัด 2 ซ้ำ (nd =not detectable)	37
ตารางที่ 2.4.1	LP-GC/TOFMS retention times ( $t_R$ ), MS ions ( $m/z$ ), average regression values in matrix and matrix effects (%ME) (typical n = 20), and average overall %recoveries and %RSD (typical n = 270), for the pesticide analytes. Average $R^2 < 0.990$ , average %ME $> \pm 20$ , recovery $< 70\%$ , and RSD $> 20\%$ are noted in bold text	44
ตารางที่ 2.4.2	ระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Lowest calibrated levels, LCLs) ของสารกำจัดศัตรูพืชที่ศึกษา โดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ที่แตกต่างกันในเนื้อเมทริกซ์ที่ต่างกัน (ND = not detected)	57
ตารางที่ 3.1	โครงสร้างทางเคมี ค่า pKa และสภาพที่ติดประจุของไกลโฟเสต และกรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก (AMPA)	69
ตารางที่ 3.2	การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ไกลโฟเสต และกรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิกในตัวอย่างชนิดต่างๆ	70
ตารางที่ 3.3	สมรรถนะ และข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลว ร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column ร่วมด้วยการตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์	83
ตารางที่ 4.2.1	สรุปวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างจากรายงานที่ผ่านมา	92
ตารางที่ 4.2.2	Molecular weights, retention times, $t_R$ (acceptable ranges, $\pm 3$ SD), ion transitions, optimized MS/MS parameters, and ion ratios (acceptable ranges, $\pm 3$ SD) vs. concentrations of the 24 veterinary drugs in HILIC-UPLC-ESI(+)-MS/MS.	104
ตารางที่ 4.2.3	Established maximum residue limit (MRL) for 24 veterinary drugs in chicken muscle and analytical limits of 24 analytes in chicken muscle extracts	107

ตารางที่ 4.2.4	Recovery, repeatability, within-laboratory reproducibility, and acceptable RSD values for chicken muscle at different spiking levels.	108
ตารางที่ 4.3.1	สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง	116
ตารางที่ 4.3.2	ตัวแปรต่างๆในระบบ Multiple reactions monitoring ของสารปฏิชีวนะในการวิเคราะห์ด้วยแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี	119
ตารางที่ 4.3.3	ผลของสารตัวทั้ง 3 ชนิดที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา	124
ตารางที่ 4.3.4	ผลของสารละลายตัวรับและค่า pH ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร	126
ตารางที่ 4.3.5	ความใช้ได้ของวิธีการจากการใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะหลายกลุ่มตกค้างในน้ำพร้อมกันในสภาวะที่เหมาะสม	129

## สัญลักษณ์และคำย่อ

ACN	Acetonitrile
Aliquat 336	Tricaprylmethylammonium chloride
AMOX	Amoxicillin
AMP	Ampicillin
AMPR	Amprolium
CC <sub>α</sub>	decision limit
CC <sub>β</sub>	detection capability
CIP	Ciprofloxacin
CTC	chlortetracycline
D2EHPA	Bis(2-ethylhexyl) monohydrogenphosphoric acid
DAN	Danofloxacin
DB	1-phenyldodecane
DHE	Dihexyl ether
DPX	Disposable pipette extraction
d-SPE	Dispersive solid phase extraction
DSTR	Dihydrostreptomycin
EKC	electrokinetic chromatography
ENR	enrofloxacin
ERY	Erythromycin
ESI+	positive mode electrospray ionization
GCB	Graphitized carbon black
HFBA	heptafluorobutyric acid
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HOAc	acetic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
IP	Identification point
LCL	lowest calibrated level
LIN	Lincomycin
LIX 84	2-Hydroxy-5-nonylaceto-phenoneoxime
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation

LP-GC	Low pressure – gas chromatography
MeOH	Methanol
MRL	Maximum residue limit
MRM	Multireaction monitoring
MS/MS	Tandem mass spectrometry
OTC	Oxytetracycline
OXO	oxolinic acid
PEN G	penicillin G
PIR	Pirlimycin
PSA	Primary secondary amine
QuEChERS	Quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe
RP	Reversed phase
RSD	ค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)
S/N	Signal to noise ratio
SDMX	Sulfadimethoxine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDZ	sulfadiazine
SIM	Selected ion monitoring
SMZ	Sulfamethazine
SPE	Solid phase extraction
SPEC	Spectinomycin
SPI	Spiramycin
STR	streptomycin
STZ	Sulfathiazole
TC	Tetracycline
TCA	Trichloroacetic acid
TIL	Tilmicosin
TOF	Time of flight
TYL	Tylosin
U-HPLC	Ultra-high performance liquid chromatography
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

## บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนและสารตกค้างในอาหาร เป็นงานวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี เริ่มจากการขยายขอบข่ายการใช้เทคนิค QuEChERS ในการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ให้ครอบคลุมตัวอย่างข้าว ธัญพืช และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากธัญพืช และให้ครอบคลุมกลุ่มสารกำจัดวัชพืชที่เป็นกลุ่มที่มีค่าการละลายสูง และตรวจวัดได้ยาก และใช้เทคนิคการตรวจวัดแบบ low-pressure gas chromatography ต่อร่วมกับแทนเดมแมสสเปกโตรเมทรี ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิด ครอบคลุมทุกกลุ่มของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการใช้มากและอยู่ในข่ายที่ต้องควบคุม ในเมทริกซ์ผักและผลไม้ สามารถลดระยะเวลาการตรวจวัดได้มากกว่า 4 เท่า จากเดิมที่ต้องใช้เวลามากกว่า 30 นาที ลงเหลือเพียง <math><6.5</math> นาทีเท่านั้น จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ ได้ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเที่ยง 70-120% และ <math><20</math>% RSD ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวัด <math><5</math> นาโนกรัมต่อกรัม จัดเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงมาก ตรวจวัดได้รวดเร็ว เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่ต้องทำการวิเคราะห์เป็นงานประจำ

นอกจากนี้ยังได้พัฒนาการตรวจวัดยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อไก่ ครอบคลุมยาปฏิชีวนะ 24 ชนิด จาก 8 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides 3 ชนิด, กลุ่ม  $\beta$ -lactam 3 ชนิด, กลุ่ม lincosamides 2 ชนิด, กลุ่ม macrolides 4 ชนิด, กลุ่ม quinolones 4 ชนิด, กลุ่ม sulfonamides 4 ชนิด, กลุ่ม tetracyclines 3 ชนิด และ amprollium สกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโตรเมทรี ใช้คอลัมน์แยกในระบบไฮโดรฟิลิก ได้วิธีการมีประสิทธิภาพสูง มีขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวัดที่ 0.1-10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมให้มีได้อยู่ที่ 53-99% และ  $\leq 15\%$  ตามลำดับ วิธีการนี้ได้ทดลองใช้ในตัวอย่างเนื้อไก่ กุ้ง และไข่ พบว่าใช้ได้ดีและสามารถใช้ได้ในงานวิเคราะห์ที่ทำประจำในห้องปฏิบัติการ และได้ใช้เทคนิคการสกัดด้วยเส้นใยกลวงสกัดยาปฏิชีวนะ 11 ชนิดในน้ำ เส้นใยกลวงมีรูพรุน ขนาดเล็ก ราคาถูก สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัดได้ถึง 156 เท่า มีขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึง 10-250 นาโนกรัมต่อลิตร ค่าร้อยละการคืนกลับของวิธีการนี้เป็นที่น่าพอใจที่ระดับ 78-118%

## Abstract

This research developed sample preparation techniques for efficient analyses of contaminants and residues in foods. This extended research started three years ago from modified QuEChERS methods for pesticide residues in rice grains and grain products. This unique QuEChERS procedure covers high water solubility herbicides that are very difficult to detect. Sample analysis was performed on low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry (LP-GC/MS-MS) that quantifies 150 pesticides in different agricultural matrices. The analysis time was reduced 4-fold, from 30 mins by GC/MS-MS to 6.5 min. The method was fully validated and was found to be reliable (average recoveries 70-120%, reproducibility < 20% RSD) with good sensitivity (LOD <5 ng/g) and offers high sample throughput which makes it suitable for routine analysis.

Simple and sensitive method for multiresidue analysis of 24 common veterinary drugs from 8 classes (3 aminoglycosides, 3  $\beta$ -lactams, 2 lincosamides, 4 macrolides, 4 quinolones, 4 sulfonamides, 3 tetracyclines, and amprolium) in chicken muscle was also developed. The method employed simple liquid-liquid extraction step followed by analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometric using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The method proved to be very efficient with 0.1-10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  limits of detection, recoveries ranged between 53-99% at 0.5-MRL, MRL, and 1.5-MRL spiking levels, satisfactory precision (RSD  $\leq$ 15%) were also observed. The method was successfully tested on real samples (chicken muscle, shrimp, and egg) and is suitable for routine monitoring purposes.

Alternative extraction method, a carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME), was evaluated on antibiotic residues in water matrix. Eleventh common antibiotics were selected and the HF-LPME procedure was optimized in water using small and inexpensive disposable hollow fiber membrane. The proposed HF-LPME procedure was much superior to traditional extraction technique and provided up to 156 times enrichment. The detection limits ranged from 10-250  $\text{ngL}^{-1}$  with relative recovery between 79-118%

## Executive Summary

This research aims to develop sample preparation techniques for efficient analyses of contaminants and residues in foods and is divided into three parts:

Part 1: Sample preparation techniques for pesticides in food and agricultural products which are divided into 3 projects:

- 1.1) The determination of the herbicide residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
- 1.2) Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts and doughs.
- 1.3) Fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables

Part 2: Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector.

Part 3: Determination of antibiotic residue in foods which divided into 2 parts:

- 3.1) Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle.
- 3.2) Simultaneous determination of multiclass antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

In Part 1, a new method for the analysis of 13 phenoxy acid herbicides in rice was successfully developed, based on dispersive SPE (QuEChERS) extraction followed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The extension of the method was further and evaluated for determination of pesticide residues in flaxseeds, doughs, and peanuts. This method gave efficient separation of pesticides from fat and removal of coextracted substances better than gel permeation chromatography or use of a freeze-out

step, which involved excessive use of organic solvent and/or lengthy. A new detection method of low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry (LP-GC/MS-MS) was also developed and evaluated for the identification and quantification of 150 pesticides in various fruits and vegetables. The analysis time was reduced 4-fold, from 30 mins by GC/MS-MS to 6.5 min. The method was fully validated and was found to be reliable (average recoveries 70-120%, reproducibility < 20% RSD) with good sensitivity (LOD <5 ng/g) and offers high sample throughput which makes it suitable for routine analysis.

In Part 2, a carrier-mediated supported liquid membrane micro-extraction using single hollow fiber membrane suitable for the determination of the herbicide glyphosate and its main metabolite aminomethylphosphonic acid in water was developed. The method detection limits are 0.22  $\mu\text{g/L}$  for glyphosate and 3.40  $\mu\text{g/L}$  for aminomethylphosphonic acid. The procedure was validated and showed good accuracy and precision over a large linear dynamic range.

In Part 3, we demonstrated the used of simple and sensitive method for multiresidue analysis of 24 common veterinary drugs from 8 classes (3 aminoglycosides, 3  $\beta$ -lactams, 2 lincosamides, 4 macrolides, 4 quinolones, 4 sulfonamides, 3 tetracyclines, and amprolium) in chicken muscle. The method employed simple liquid-liquid extraction step followed by analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometric using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The method proved to be very efficient with 0.1-10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  limits of detection, recoveries ranged between 53–99% at 0.5-MRL, MRL, and 1.5-MRL spiking levels, satisfactory precision (RSD  $\leq$ 15%) were also observed. The method was successfully tested on real samples (chicken muscle, shrimp, and egg).

Also, an alternative extraction method, a carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME), was evaluated on antibiotic residues in water matrix. Eleventh common antibiotics were selected and the HF-LPME procedure was optimized in water using small and inexpensive disposable hollow fiber membrane. The proposed HF-LPME procedure was much superior to traditional extraction technique and provided up to 156 times enrichment. The detection limits ranged from 10-250  $\text{ngL}^{-1}$  with relative recovery between 79-118%

New analytical method development research for the analysis of food contaminants is important for proficient monitoring of foods and agricultural products to ensure maximum

food safety for local consumption and export. Currently, foods can be tainted by obscured contaminants that cause serious health effect in human. The situation forces control authorities around the world to strictly set stringent safety limits of these compounds in foods and agricultural products. It is very important that Thailand stays in the forefront of this research to gain confidence from our trade partners and be able to maintain our national mission to be the Kitchen of the World. Our research in developing efficient and economical analytical methods for the monitoring of food contaminants and residuals support of this national mission.

---

## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันความปลอดภัยด้านอาหารถือเป็นประเด็นสำคัญที่มีการกล่าวถึงกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ เช่นสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ซึ่งวางมาตรการความปลอดภัยอาหารไว้อย่างเข้มงวด มีการกำหนดค่าสูงสุดของการปนเปื้อน สารตกค้างต่างๆ เช่นยาฆ่าแมลง ยาสัตว์ โลหะหนัก สารพิษชีวภาพ ครอบคลุมสินค้าการเกษตร หลากหลายชนิด ทำให้ประเทศไทยซึ่งส่งออกสินค้าเกษตรประสบปัญหาที่ต้องทำการควบคุมและตรวจสอบการปนเปื้อนตามรายการของประเทศคู่ค้า และเมื่อปี ค.ศ. 2006 ประเทศญี่ปุ่นประกาศใช้ระบบการกำหนดค่าสูงสุดที่จำกัดให้มีในอาหารได้ ที่เรียกว่าเป็น “Positive List System” ควบคุมการตรวจสอบสารมากกว่า 799 ชนิด หากสารชนิดใดไม่มีการกำหนดขีดการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ไว้ สารนั้นจะมีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 0.01 ส่วนในล้านส่วน หรือ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [1] สหภาพยุโรปได้ดำเนินมาตรการตามประเทศญี่ปุ่น มีการกำหนดเกณฑ์การควบคุมการตรวจสอบการปนเปื้อนออกมาหลายฉบับ [2,3] การตรวจสอบการปนเปื้อนของสารต่างๆ ในอาหารที่แตกต่างกัน เช่นในผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ นม น้ำผึ้ง ฯลฯ จะมีความยากง่ายแตกต่างกันออกไปและอาจเกิดข้อผิดพลาดขึ้นได้ง่าย อีกทั้งพืชผลการเกษตรหลายประเภทมีอายุการเก็บรักษาสั้นดังนั้นวิธีการตรวจสอบควรทำได้รวดเร็ว มีความเที่ยง ความแม่นยำ และมีค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อไม่ให้เป็นการเพิ่มต้นทุนของสินค้า และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้าด้วย

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว โดยจะนำเทคโนโลยีและเทคนิคปัจจุบันที่มีศักยภาพเข้ามาช่วยในการกำจัดสิ่งรบกวนการวิเคราะห์ที่มาจากเนื้อเมทริกซ์ของตัวอย่าง เทคนิคที่เลือกทำการศึกษได้แก่ เทคนิคการสกัดด้วยเส้นใยกลวง (Supported hollow fiber microextraction) เทคนิคการกระจายอนุภาคของแข็งลงในสารละลายสกัด (Matrix solid dispersion) [4-6] เป็นหลัก วิธีการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยจะต้องผ่านการประเมินความใช้ได้ของวิธีตามมาตรฐานวิธีการของสหภาพยุโรป [7] ซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มประเทศที่มีระเบียบมาตรฐานการตรวจสอบสูงสุด

#### 1.1 วัตถุประสงค์

พัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนทั้งกลุ่มกำจัดศัตรูพืช และยาสัตว์ ให้ตรวจวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายชนิดในวิธีการเดียว (multiclass, multiresidue methods) และศึกษาการตรวจวัดการปนเปื้อนในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน โดยมุ่งให้ได้วิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายต่ำ มีความเที่ยงและความแม่นยำสูงสุด

#### 1.2 ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็นโครงการย่อยทั้งหมด 3 โครงการ ดังนี้คือ

โครงการย่อยที่ 1: เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์การเกษตร และจำแนกย่อยออกตามชนิดของสารกลุ่มที่ต้องการตรวจสอบและ เนื้อเมทริกซ์ ได้แก่

โครงการย่อย 1.1 การตรวจวัดกลุ่มสารกำจัดวัชพืชในข้าวโดยการดัดแปรวิธีการ สกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

โครงการย่อยที่ 1.2 การขยายขอบข่ายวิธีการ QuEChERS เพื่อการสกัดสารกำจัด ศัตรูพืชครอบคลุมกลุ่มธัญพืช พืชที่มีน้ำมันมากเช่นถั่ว เมล็ดแฟลกซ์ (flaxseeds) และแป้ง (doughs)

โครงการย่อยที่ 1.3 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิดอย่างรวดเร็วโดยการ สกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อกับระบบแมสสเปกโทรเมตรีชนิด ไทม์ออฟไฟท์แบบความดันต่ำ

โครงการย่อยที่ 2: เทคนิคการสกัดแบบจุลภาคในการสกัดสารกำจัดวัชพืชชนิดไกลโฟเสทและ อนุพันธ์กรดอะมิโนเมทิลฟอสฟอนิก ตรวจวัดด้วยลิควิดโครมาโทกราฟีเชื่อมกับการเปลี่ยนรูป อนุพันธ์หลังการแยกและเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์

โครงการย่อยที่ 3: การตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายกลุ่มพร้อมกัน

โครงการย่อยที่ 3.1 การตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรฟิลิกลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี

โครงการย่อยที่ 3.2 การตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างในน้ำหลายกลุ่มพร้อมกัน ด้วยเทคนิคการสกัดตัวอย่างระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง

ในรายงานฉบับนี้จะได้นำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ทฤษฎี การทดลอง ผลการ ทดลอง และเอกสารอ้างอิงแยกตามโครงการย่อยตามที่ได้กล่าวข้างต้น

### 1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้จะเลือกเฉพาะเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว สามารถ ใช้ได้ในงานที่ทำเป็นประจำ ครอบคลุมการตรวจวัดสารกลุ่มยากำจัดศัตรูพืช และยาปฏิชีวนะที่นิยม ใช้ในการปศุสัตว์ และเป็นที่ยอมรับในการควบคุมการปนเปื้อนเป็นสำคัญ เนื้อเมทริกซ์อาหารจะเลือก ผัก ผลไม้ ที่สำคัญต่อเป้าหมายการส่งออก และเนื้อสัตว์ได้แก่ ไก่ เป็นต้น

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ตอบสนองความต้องการด้านการตรวจสอบสารปนเปื้อนชนิดยากำจัดศัตรูพืช และยาสัตว์ตกค้างในสินค้าเกษตรส่งออกของประเทศ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว เป็นที่ยอมรับ อีกทั้งวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ต้องเป็นที่ยอมรับและแพร่หลายในระดับนานาชาติ

#### 1.5 เอกสารอ้างอิง

1. Umetsu, N., "Japan Positive List System: Contribution of the Pesticide Science Society of Japan to Understanding of its Operation and Issues Regarding Pesticide Residues in Crops." Foods Food Ingredients J. Jpn., Vol. 211, No 8, 2006
2. Alexander J.Krynitsky and Steven J. Lehotay, "Overview of analytical technologies available to regulatory laboratories for the determination of pesticide residues." Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals. pp. 753-786 John Wiley&Sons Ltd., Chichester, 2002
3. คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, "โครงการศึกษามาตรการกีดกันการค้ารูปแบบใหม่ของสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรป" เสนอต่อกรมเศรษฐกิจระหว่างประเทศ กระทรวงต่างประเทศ มีนาคม 2549
4. Schenck, F.J, Lehotay, S.J., Vega, V., J.Sep.Sci, 25, 883-890, 2002
5. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. and Schenck, F.J., J.AOAC Int, 86, 412-431, 2003
6. Lehotay, S.J., J.AOAC Int 90(2) 485-520, 2007
7. Method Validation and Quality Control Procedure for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/10684/2009

## บทที่ 2

### โครงการย่อยที่ 1:

#### เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชใน ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์การเกษตร

##### 2.1 บทนำ

ในการพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์การเกษตรนั้น เป็นงานหลักที่ผู้วิจัยให้ความสำคัญ โดยเทคนิคการสกัดที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction) [1-4] การสกัดด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (subcritical water extraction) [5] การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลว (microextraction) [6] การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) [2, 7-15] การสกัดด้วยการดูดซับบนแท่งแม่เหล็กกวนสารละลาย (stir-bar sorptive extraction, SBSE) [16] การสกัดด้วยเมมเบรนที่มีของเหลวเป็นตัวช่วย (supported liquid membrane extraction, SLME) [17] การสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต (supercritical fluid extraction, SFE) [18] การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase microextraction, SPME) [19] ซึ่งการที่จะเลือกใช้วิธีสกัดแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์และเนื้อเมทริกซ์ที่ต้องการศึกษาเป็นสำคัญ อีกทั้งวิธีการส่วนใหญ่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก วิธีการยุ่งยากและใช้เวลานาน อีกทั้งยังไม่มีความสะดวกเฉพาะเพียงพอต่อการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้

ตั้งแต่ที่ Anastassiades และผู้ร่วมงาน [20] นำเสนอวิธีการสกัดที่ให้ชื่อว่า QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ในปี ค.ศ. 2003 โดยอาศัยหลักการการกระจายเฟสของแข็งในสารละลายสกัดตัวอย่าง วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่าย ใช้ปริมาณตัวอย่างและ ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย ทำในภาชนะปิดขนาดเล็ก 1-10 มิลลิลิตร ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ยุ่งยาก ใช้เฉพาะหลอดทดลอง การเขย่า และเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เท่านั้น นับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานสูง วิธีการนี้จึงเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปและขยายตัวสู่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ ในปี ค.ศ. 2007 Lehotay [21] ทำการทดสอบวิธีการโดยเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างห้องปฏิบัติการหลายประเทศ พบว่าผลที่ได้มีความเที่ยงและความแม่นยำเป็นที่ยอมรับและพัฒนาเป็นวิธีการมาตรฐาน AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในพืช ผัก ผลไม้ ในปีเดียวกันนั่นเอง

แต่จะเห็นได้ว่าวิธีการ QuEChERS นั้นไม่ครอบคลุมถึงตัวอย่างประเภทข้าว และพืชที่มีน้ำมันมาก อีกทั้งยังไม่ครอบคลุมกลุ่มของสารกำจัดวัชพืชที่มีสภาวะความเป็นกรดสูงที่นิยมใช้ใน

ประเทศไทย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงวางเป้าหมายการขยายขอบข่ายการนำวิธีการนี้มาทดลองใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซี (phenoxy acid) และต้องการทดลองวิธีการนี้ให้ครอบคลุมเมทริกซ์ที่มีน้ำมันสูงเช่น พืชตระกูลถั่ว หรือพืชให้น้ำมัน รวมถึงรัฐพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชเช่น แป้ง หากวิธีการสกัดเป็นไปตามเป้าหมายที่วางไว้ ผู้วิจัยมุ่งประสงค์ที่จะพัฒนาการตรวจวัดให้เร็วขึ้นกว่าเดิมโดยใช้เทคนิคการลดความดันที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีโดยต่อคอลัมน์ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.15 มม. เข้ากับคอลัมน์สั้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในใหญ่ (10 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มม.) เพื่อเร่งความเร็วในการตรวจวัดให้สั้นลง ทำให้การปฏิบัติงานการตรวจวัดทำได้รวดเร็ว รองรับปริมาณการตรวจวัดตัวอย่างต่อวันได้มากขึ้น สอดคล้องกับเป้าหมายการตรวจสอบเป็นเอนเพื่อการส่งออก โครงการนี้แบ่งออกเป็น 3 โครงการย่อย ได้แก่

โครงการย่อย 1.1 การตรวจวัดกลุ่มสารกำจัดวัชพืชในข้าวโดยการดัดแปรวิธีการสกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี

โครงการย่อย 1.2 การขยายขอบข่ายวิธีการ QuEChERS เพื่อการสกัดสารกำจัดศัตรูพืชครอบคลุมกลุ่มรัฐพืช พืชที่มีน้ำมันมากเช่นถั่ว เมล็ดแฟลกซ์ (flaxseeds) และแป้ง (doughs)

โครงการย่อย 1.3 การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิดอย่างรวดเร็วโดยการสกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อคู่กับระบบแมสสเปกโทรเมทรี

## 2.2 โครงการย่อย 1.1: การตรวจวัดกลุ่มสารกำจัดวัชพืชในข้าวโดยการดัดแปรวิธีการสกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี

สารกำจัดวัชพืชกลุ่มคลอโรฟีนอกซีหรือกรดฟีนอกซีจัดเป็นสารกำจัดวัชพืชที่นิยมใช้แพร่หลายในประเทศไทย [22] ใช้ในการกำจัดวัชพืชและพืชใบกว้าง เกษตรกรนิยมผสมกับปุ๋ยหว่านลงในไร่นาหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของพืชที่ไม่ต้องการ ดังนั้นโอกาสการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในพืชผลการเกษตรจึงเกิดขึ้นได้สูง ในสหภาพยุโรปกำหนดค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ยอมให้มีในพืชกลุ่มข้าวอยู่ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สารกลุ่มนี้จัดเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูงการสกัดและการตรวจวัดจะทำได้ยาก การตรวจวัดอาจทำได้ทั้งการใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) [4, 7] แก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมทรี (GC/MS) [1, 2, 8, 15, 18] แคปิลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (CE) [11, 13, 17] แต่หากใช้เทคนิค GC จะต้องทำการเปลี่ยนรูปสารกลุ่มนี้ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ก่อน แต่สารที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนรูป

อนุพันธ์นั้นส่วนใหญ่มีความเป็นพิษและว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง ไม่ปลอดภัยต่อการขนส่งระหว่างประเทศ มีการห้ามนำเข้าและห้ามผลิตในหลายประเทศ ดังนั้นในงานนี้จึงเลือกใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีต่อเชื่อมกับแท่นเดมแมสสเปกโทรเมทรี เพื่อให้มีสภาพไวในการตรวจวัดรองรับขีดปริมาณตกค้างสูงสุดที่หลายประเทศกำหนดไว้ได้

งานวิจัยนี้จะพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดสารกลุ่มกรดฟีนอกซี 13 ชนิดในเนื้อเมทริกซ์ข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญของไทย วางเป้าหมายให้ได้วิธีสกัดและตรวจวัดที่รวดเร็ว มีความเที่ยง ความแม่นยำสูง สามารถใช้ได้กับงานตรวจวัดที่ทำเป็นประจำ มีมาตรฐานการตรวจวัดเป็นไปตามมาตรการของสหภาพยุโรปซึ่งมีกฎระเบียบที่เข้มงวดที่สุดเมื่อเทียบกับประเทศคู่ค้าทั้งหมด สูตรโมเลกุลและโครงสร้างของสารที่ศึกษาแสดงในรูปที่ 2.2.1

## 2.2.1 การทดลอง

### 2.2.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

- ตัวทำละลายอินทรีย์ เมทานอล เอทิลอะซีเตต และอะซิโตนไตรล์ ที่มีความบริสุทธิ์สูง

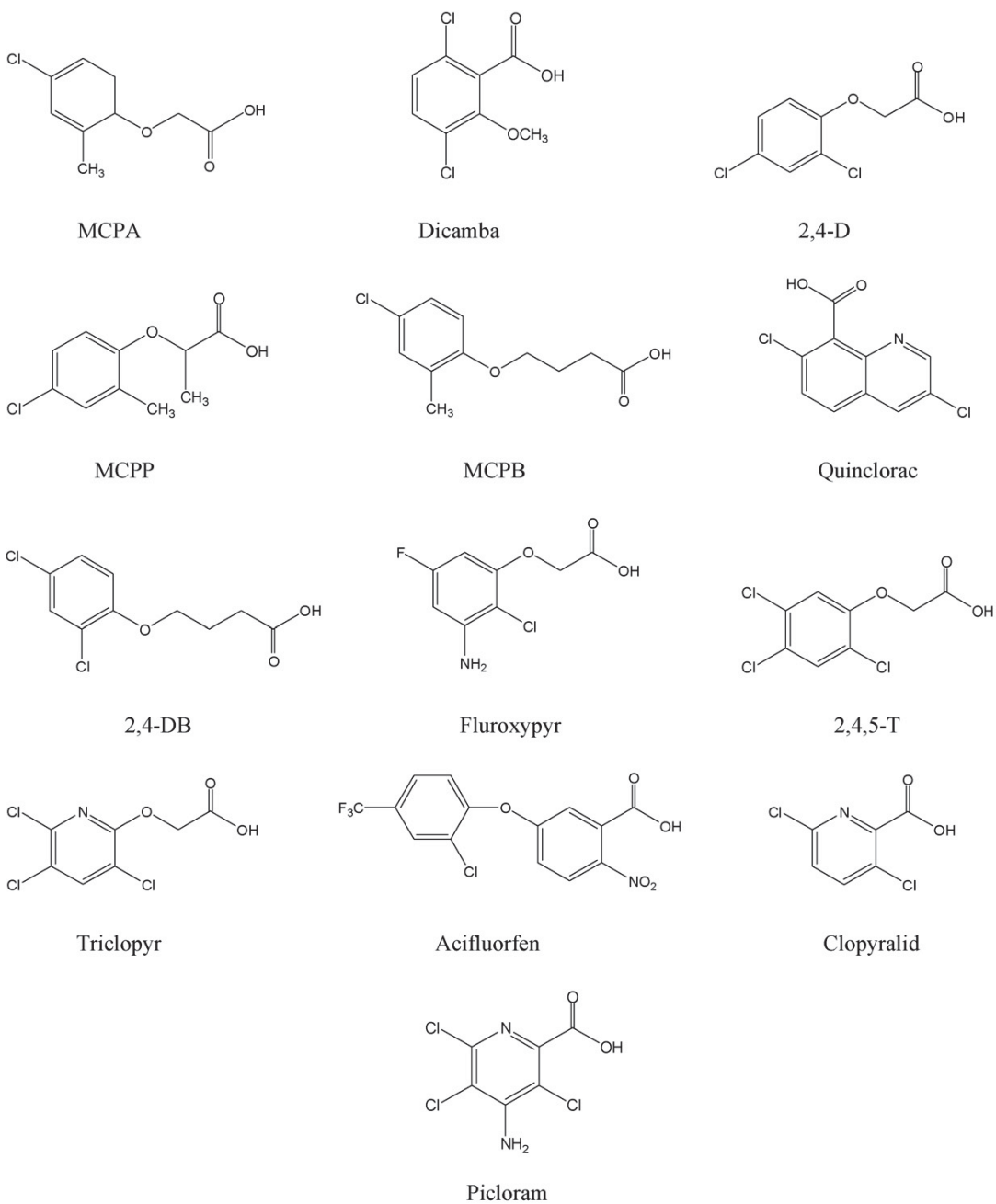
- เกลือที่ใช้สกัดและดูดความชื้น ได้แก่ magnesium sulfate, sodium chloride, tri-sodium citrate dehydrate (tri-Na) และ di-sodium hydrogencitrate sesquihydrate (di-Na) กรณีของเกลือ magnesium sulfate ก่อนใช้งานต้องอบที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นและเก็บในที่แห้งปราศจากความชื้น

- สารที่ใช้เป็นตัวดูดซับเมทริกซ์ ได้แก่ primary secondary amine (PSA, 40 µm), octadecyl (C18, 40 µm), alumina neutral (25 µm), graphitized carbon black (GCB, 400 meshes)

### 2.2.1.2 สารมาตรฐานกลุ่มกรดฟีนอกซี

สารมาตรฐานกลุ่มสารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซีทุกชนิดที่ระบุในรูปที่ 2.2.1 สั่งซื้อจากบริษัท Dr.Ehrenstorfen GmbH ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน มีความบริสุทธิ์สูงพิเศษ

สารมาตรฐานทุกชนิดที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้นเตรียมในตัวทำละลายเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1.00 กรัมต่อลิตร เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเก็บรักษาสารละลายไม่เกิน 2 เดือนหลังจากวันที่เตรียม นำสารละลายนี้มาเจือจางเพื่อใช้เป็นสารละลายเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณจะเตรียมในสารละลายเฟสเคลื่อนที่และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระหว่างรอการวิเคราะห์และเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน



รูปที่ 2.2.1 ชนิดและสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสาร Phenoxy acids 13 ชนิด ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

### 2.2.1.3 เครื่องมือและภาวะการทดลอง

เครื่องมือตรวจวัด: Micromass Quattro Premier™ XE benchtop tandem quadrupole mass spectrometer

ระบบเชื่อมต่อ: electrospray ionization (ESI)

เครื่องมือการแยก: Acquity Ultra Performance LC (UPLC) System (Waters)  
 คอลัมน์: Acquity BEH C18 (2.1mm × 100mm, 1.7\_μm) column (Waters).  
 เฟสเคลื่อนที่: (A) 0.1% (v/v) formic acid ใน water และ (B) 0.1% (v/v) formic acid ใน methanol  
 อัตราการไหล: 0.200 มิลลิลิตรต่อนาที  
 การเปลี่ยนแปลงเฟสเคลื่อนที่: 0.0 นาที 10% B, 5.0 min 90% B, 8.0 min 90% B 8.1 min/10% B และ 10.0 min/10% B ตามลำดับ  
 ปริมาตรการฉีด: 10.0 ไมโครลิตร  
 ระยะเวลาการตรวจวัดทั้งสิ้น 9 นาที

ภาวะเครื่องแทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี

แก๊สที่ใช้: ไนโตรเจน  
 อัตราการไหล: cone gas 30 ลิตรต่อชั่วโมง  
 desolvation gas 997 ลิตรต่อชั่วโมง  
 ศักย์ไฟฟ้า: capillary voltage 0.80 กิโลโวลต์  
 negative and positive ionization modes 1.20 กิโลโวลต์  
 extractor voltage 3.00 กิโลโวลต์  
 อุณหภูมิ: source temperature 120 องศาเซลเซียส  
 Mode: multiple reactions monitoring mode (MRM)

#### 2.2.1.4 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างข้าวจะเตรียมด้วยวิธีเดียวกับที่ใช้ในวิธีการของ QuEChERS คือ

ขั้นที่ 1 : ชั่งตัวอย่างข้าวที่ผ่านการบดละเอียดให้เข้ากันและเป็นเนื้อเดียวกันจำนวน 10 กรัม ลงในหลอดเซนตริฟิวส์พลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2: เติมน้ำ 5.0 มิลลิลิตร และตัวทำละลายอะซิโตนไตรัส จำนวน 10.0 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเขย่าแรงๆ ให้มั่นใจว่าตัวอย่างกระจายตัวดี ประมาณ 1 นาที

ขั้นที่ 3: เติมเกลือ anhydrous MgSO<sub>4</sub> จำนวน 4 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไรด์จำนวน 1 กรัม ตามลงไป เขย่าต่อประมาณ 1 นาที

ขั้นที่ 4: นำหลอดไปหมุนปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 3800 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนทั้งหมดใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ภายในบรรจุด้วยตัวดูดซับชนิด PSA ปริมาณ 0.25 กรัม และเกลือ anhydrous MgSO<sub>4</sub> ปริมาณ 1.50 กรัม เขย่าประมาณ 1 นาที และเซนตริฟิวส์ที่ภาวะเดิมอีก 1 นาที

ขั้นที่ 5: ดูดสารละลายชั้นบนปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลายออกให้แห้งด้วยการใช้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายสารที่แห้งเหลืออยู่ด้วยเฟส

เคลื่อนที่ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.20 ไมครอน ก่อนนำไป  
ตรวจวัดด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS

ในการเตรียมตัวอย่างข้าวที่ทราบปริมาณการปนเปื้อนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทำ  
โดยการเติมสารมาตรฐานผสมในระดับปริมาณความเข้มข้นที่ต้องการลงไปในตัวอย่งข้าวที่ทราบ  
ปริมาณและบดป่นให้ละเอียดก่อนนำมาสกัดด้วยวิธีการที่ระบุไว้ในขั้นที่ 1-5

2.2.1.5 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ การคิดค่าขีดจำกัดการตรวจวัด ทำโดย  
การเตรียมตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณการปนเปื้อนที่ระดับ 0.01 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำการสกัดตาม  
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์ จากนั้นคำนวณค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนที่  
ปรากฏ โดยค่าขีดจำกัดการตรวจวัดกำหนดที่ค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนอยู่ที่ระดับ 3  
เท่า

## 2.2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.2.2.1 ภาวะของเครื่องมือ UPLC-ESI-MS/MS ในการตรวจวัดสารทั้ง 13 ชนิดแสดง  
ดังตารางที่ 2.1 ภาวะที่เลือกใช้มีความเฉพาะเจาะจงพิเศษกับสารแต่ละชนิด เพื่อลดความเสี่ยงของ  
ผลตรวจสอบที่เป็นผลบวกเท็จ (false positive) และเป็นไปตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรปตาม  
เงื่อนไขเอกสาร SANCO/2007/3131 [23]

2.2.2.2 ภาวะการสกัดสารตัวอย่าง ตามที่กล่าวว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่ทำการสกัดยาก  
ขึ้นกับทั้งสมบัติของสารและเนื้อเมทริกซ์ จากการค้นคว้างานการศึกษาที่ผ่านมาสามารถสรุปวิธีการ  
สกัดและการตรวจวัดได้ดังตารางที่ 2.2.2 และในงานนี้วิธีการสกัดที่เลือกใช้จะเป็นไปตามหลักการ  
พื้นฐานของเทคนิค QuEChERS แต่จะเปลี่ยนแปลงตัวแปรการทดลองบางส่วน เช่นตัวทำละลาย ตัว  
ดูดซับ การปรับภาวะก่อนการทดลอง หรือการเปลี่ยนสมบัติกายภาพของตัวอย่าง เช่นการปรับค่า  
ความเป็นกรด-เบส เป็นต้น

การสกัดด้วยการกระจายตัวในเฟสของเหลว-ของเหลว

โดยทั่วไปแล้ววิธีการสกัดเนื้อเมทริกซ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะเป็นการแยกสารกลุ่มยา  
กำจัดวัชพืชที่มีความเป็นกรดออกจากเนื้อตัวอย่าง สารกลุ่มนี้มีสมบัติเป็นกรดค่อนข้างสูง ( $pK_a < 4$ )  
[9, 12] และมีความเสถียรในช่วงค่า พีเอชต่ำ ดังนั้นค่าพีเอชของสารละลายสกัดจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้อง  
ควบคุม ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการสกัดระหว่างการใช้ตัวทำละลายอะซิโตนไทรล์ เทียบกับ  
การปรับสภาวะของตัวทำละลายอะซิโตนไทรล์ให้มีความเป็นกรด ด้วยกรดฟอร์มิก (ในขั้นตอนที่ 2  
ของการเตรียมสารตัวอย่าง) พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายที่ปรับสภาวะความเป็นกรด (เติม 5% โดย  
ปริมาตรของกรดฟอร์มิกในตัวทำละลายอะซิโตนไทรล์) สารที่ต้องการตรวจวัด 12 ใน 13 ชนิดมีค่า  
ร้อยละการคืนกลับดีขึ้น มีเฉพาะสาร Clopyralid ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ไม่ว่าจะใช้การสกัดด้วยตัว

ตารางที่ 2.2.1 : ข้อมูลสูตรและน้ำหนักโมเลกุลและภาวะการตั้งค่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS

Compound	M.F.	M.W.	pKa [14,17]	Polarity	Retention time window (min)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)	MRM transition (m/z)	Precursor ion (MS1) > Product ion (MS2)
MCPA	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClO <sub>3</sub>	200.62	3.1	ES-	0.0-8.5	0.10	22.0	18.0	198.78 [M-H] <sup>-</sup> > 140.64 [M-H-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Dicamba	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	221.04	1.9	ES-		0.05	12.0	7.0	218.84 [M-H] <sup>-</sup> > 175.01 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
2,4-D	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	221.04	2.7	ES-		0.10	21.0	13.0	218.93 [M-H] <sup>-</sup> > 161.08 [M-H-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
MCPD	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>3</sub>	214.65	3.6	ES-	0.5-8.5	0.10	15.0	20.0	212.79 [M-H] <sup>-</sup> > 140.70 [M-H-CH <sub>3</sub> CHCO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
MCPB	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>3</sub>	228.67		ES-		0.10	18.0	12.0	227.01 [M-H] <sup>-</sup> > 141.28 [M-H-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Quinclorac	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	242.06		ES-		0.08	14.0	7.0	239.93 [M-H] <sup>-</sup> > 195.96 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
2,4-DB	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	249.09		ES-		0.10	15.0	10.0	246.65 [M-H] <sup>-</sup> > 160.59 [M-H-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Fluroxyppy	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	255.03		ES-		0.10	13.0	13.0	252.55 [M-H] <sup>-</sup> > 194.65 [M-H-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
2,4,5-T	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	255.48	2.8	ES-		0.10	10.0	15.0	254.60 [M-H] <sup>-</sup> > 196.53 [M-H-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Triclopyr	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	256.47		ES-		0.10	20.0	15.0	255.61 [M-H] <sup>-</sup> > 197.53 [M-H-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Acifluorfen	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	361.66		ES-		0.25	15.0	10.0	359.97 [M-H] <sup>-</sup> > 315.87 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	
Clopyralid	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	192.00	2.0	ES+	1.5-8.5	0.10	19.0	11.0	191.91 [M+H] <sup>+</sup> > 173.96 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
Picloram	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	241.46	1.97	ES+		0.10	24.0	13.0	240.95 [M+H] <sup>+</sup> > 194.90 [M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	

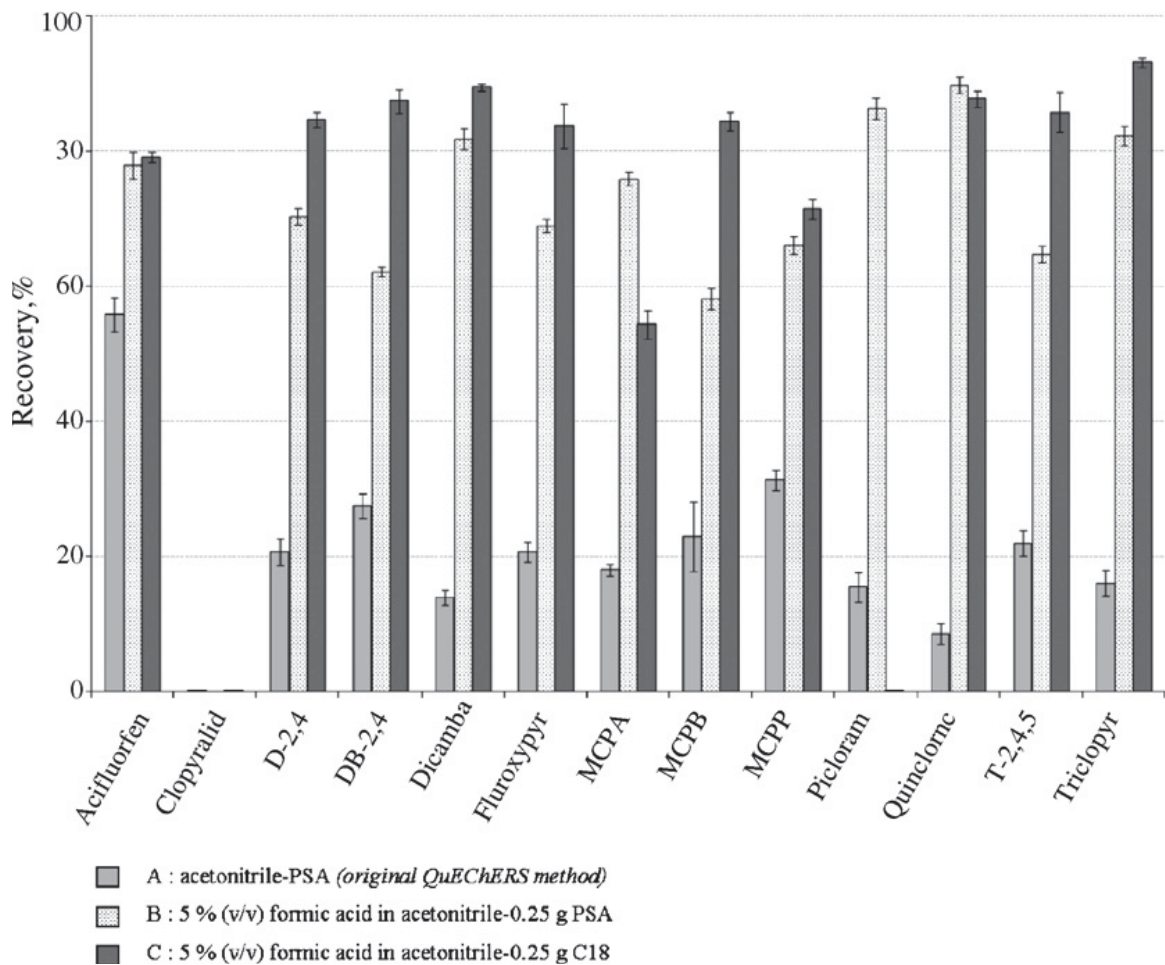
ตารางที่ 2.2.2 เปรียบเทียบวิธีการที่มีการพัฒนาการตรวจวัดสารกลุ่มยากำจัดวัชพืชด้วยวิธีการที่  
แตกต่างกันและในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน

Sample preparation	Matrix	Analysis/detection	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recovery (%)	Refs.
LLE	Water	GC-MS	0.01-0.06	NR	[1]
Subcritical water extraction	Soil	HPLC/DAD	NR	94-113	[5]
SPE	Water	HPLC/UV-vis	2.0-3.0	>95	[10]
SPE-solid phase derivatisation	Water	GC-ECD	NR	75-137	[7]
SPE	Water	GC-MS	NR	80-120	[25]
SPE	Water	LC-APCI-MS/MS	0.01-0.07	NR	[9]
SPE	Water	HPLC/UV-vis and GC-MS	0.05	>80	[2]
SPE	Water	LC-MS/MS	0.001-0.075	91-98	[11]
SPE	Water	MECC-CE/UV-vis	2.0-5.0	NR	[12]
SPE	Soil	HPLC/UV-vis and GC-MS	NR	82-90	[2]
SPE	Apple juice	Capillary-LC/UV-vis	5.0-18.0	84-99	[13]
SBSE	Water	GC-MS	0.001-0.8	70-130	[16]
SPME	Water	GC-MS	NR	87-112	[19]
SFE	Food crops	MEKC-CE/UV-vis	0.6 pg	95-99	[18]
SLM	Ground water	HPLC/PDA	0.3-0.6	80-126	[17]
D-LLLME	Water	HPLC/UV-vis	0.1-0.4	94-112	[6]
MIP	Water	HPLC/UV-vis and CZE-CE	NR	87.0-103.5	[14]
QuEChERS	Barley	LC-ESI-MS/MS	0.2-2.0	60-70%	[21]
QuEChERS	Fruit and vegetable	LC-TOF/MS and LC-ESI-MS/MS	15.0 and 5.0	NR	[20]
<i>Modified QuEChERS</i>	<i>Rice</i>	<i>UPLC-ESI-MS/MS</i>	<i>0.5-5.0</i>	<i>45-104</i>	<i>This work</i>

NR refers to not reported.

ทำละลายที่มีการปรับค่าพีเอชหรือไม่ ผลการเปรียบเทียบค่าร้อยละการคืนกลับของสารชนิดต่างๆ  
เมื่อมีการปรับค่าพีเอชของสารละลายสกัดแสดงดังรูปที่ 2.2.2

และในขั้นตอนที่ 3 ได้ทดลองทำการเปรียบเทียบการเติมเกลือในสารละลายสกัดระหว่าง  
การใช้ magnesium sulfate ร่วมกับ sodium chloride เทียบกับการใช้ magnesium sulfate ร่วมกับ  
sodium chloride และเติมบัฟเฟอร์ชนิดเกลือซเตรท (tri-Na + di-Na) เช่นเดียวกับวิธีการที่ทางสหภาพ  
ยุโรปนำเสนอในปี ค.ศ.2007 พบว่าเมื่อมีการใช้ซเตรทบัฟเฟอร์ (pH ~5-5.5) ร่วมกัน สารที่  
ต้องการสกัด 4 ใน 13 ชนิดมีค่าร้อยละการคืนกลับดีขึ้น โดยเฉพาะสาร MCPA มีค่าร้อยละการสกัดดี

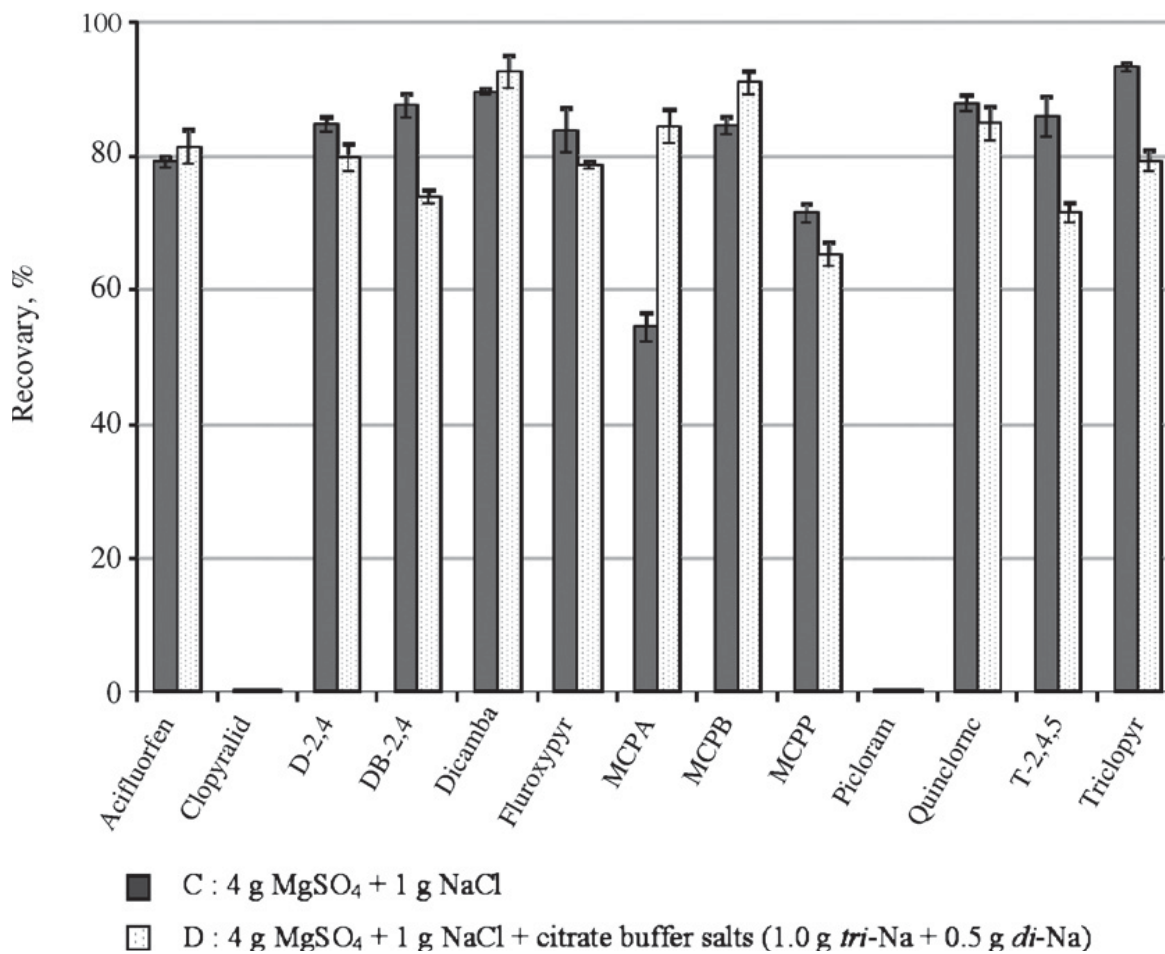


รูปที่ 2.2.2 ผลของการปรับค่าพีเอชของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่มีต่อร้อยละการคืนกลับของการตรวจวัดสารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซีทั้ง 13 ชนิด

ขึ้นถึงกว่าร้อยละ 45 แต่ สาร 7 ใน 13 ชนิด มีค่าร้อยละการคืนกลับลดลงประมาณร้อยละ 3-18 และสาร 2 ชนิดคือ clopyralid และ picloram ไม่สามารถตรวจวัดทั้งสองวิธีการสกัด ดังแสดงในรูป 2.2.3

การทำความสะอาดสารละลายสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการกระจายเฟสของแข็งลงในสารละลายสกัด (Dispersive-SPE clean up)

ภายหลังการสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้ออกจากเนื้อตัวอย่างเข้าสู่ตัวทำละลายสกัดแล้ว สารละลายสกัดนี้ยังคงมีสารอินทรีย์อื่นๆ จากเนื้อตัวอย่างปนเข้ามาอยู่ด้วยจำนวนมาก ดังนั้นการเลือกใช้ตัวดูดซับสิ่งรบกวนต่างๆ ในสารละลายสกัดนี้จึงต้องหาสารที่มีสมบัติจับสิ่งรบกวนออกให้ได้มากที่สุดและไม่จับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่อาจมีผลให้ค่าร้อยละการคืนกลับไม่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ รูปที่ 2.2.4 แสดงค่าร้อยละการสกัดที่ได้จากการเลือกใช้ของแข็งดูดซับต่างชนิดหรือต่างปริมาณกัน

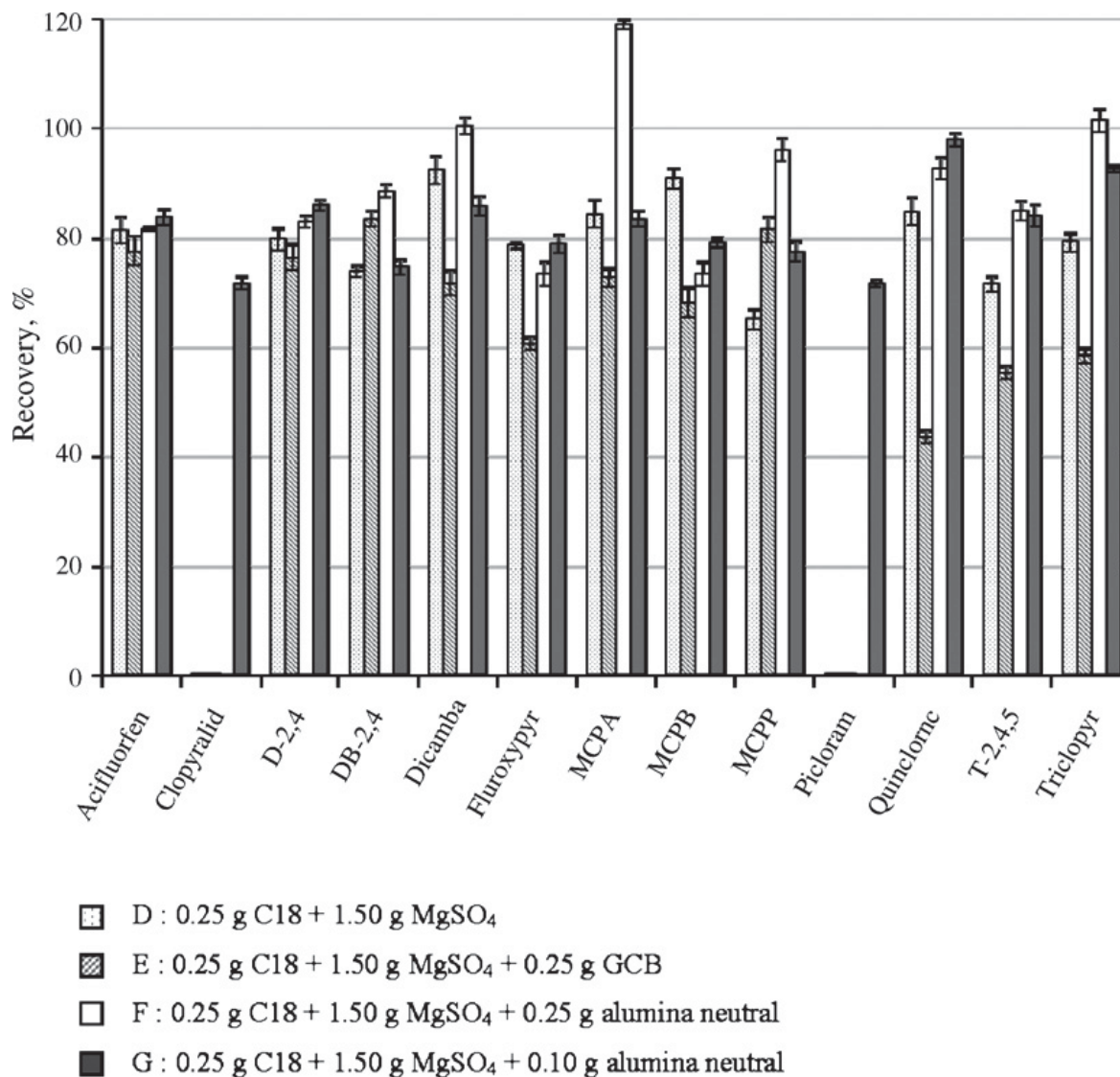


รูปที่ 2.2.3 ผลของการเติมซีเตรทบัฟเฟอร์ในขั้นตอนที่ 3 ของการสกัดตัวอย่างต่อค่าร้อยละการคืนกลับ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ในงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อเลือกใช้ตัวดูดซับผสมระหว่าง C18 และอลูมินาที่เป็นกลางจะให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีที่สุด และหากใช้ปริมาณ C18 0.25 กรัม ผสมกับ อะลูมินา 0.10 กรัม และมีเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต 1.50 กรัม จะให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารทั้ง 13 ชนิด ในช่วง 71.5-97.9 % ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ดีมาก ทั้งรูปกราฟแสดงค่าร้อยละการคืนกลับและภาพสัญญาณการตรวจวัดของสารทั้ง 13 ชนิด ในตัวอย่างข้าวที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในรูปที่ 2.2.4 และ 2.2.5 พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจและสัญญาณการตรวจวัดชัดเจน

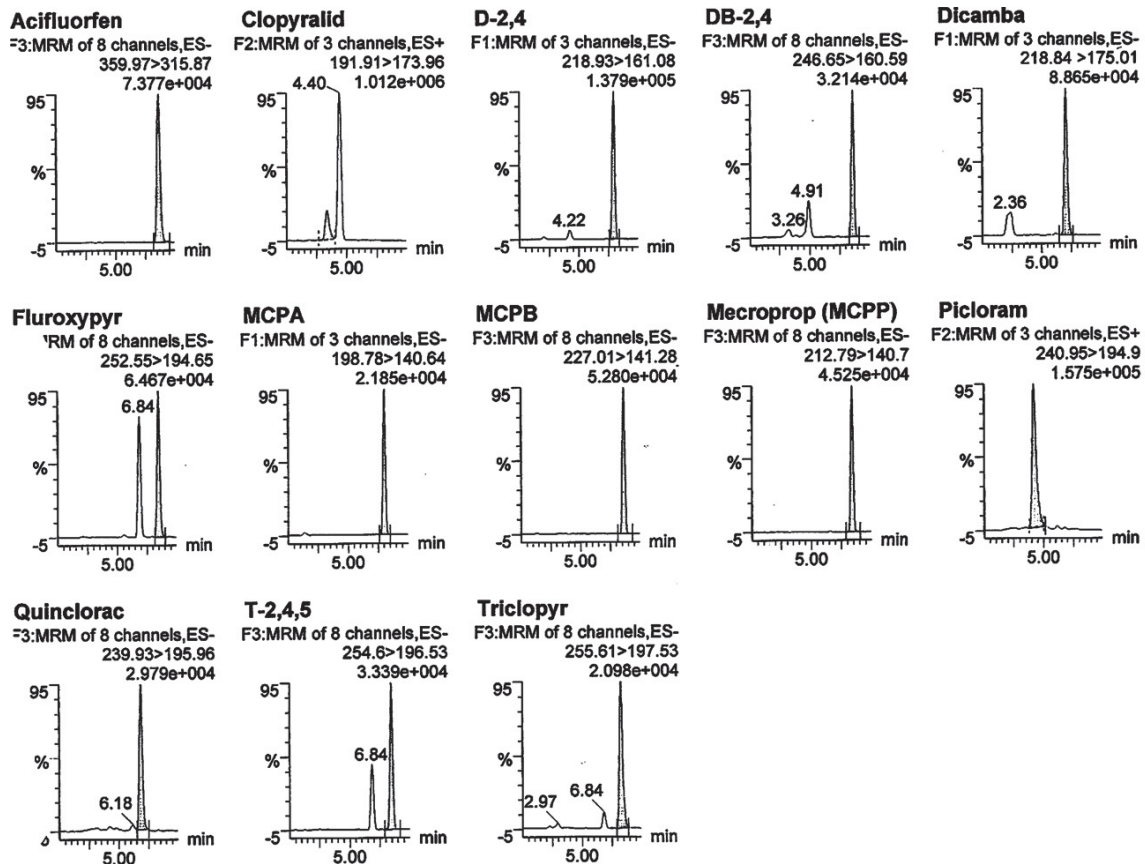
#### สมรรถนะของวิธีการ (Method performance)

จากตัวแปรที่ศึกษาการสกัดในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างทำให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการตรวจวัดและได้นาวิธีการนี้มาศึกษาหาความแม่นยำและความเที่ยง โดยสกัดตัวอย่างข้าวที่มีการเติมสารมาตรฐานลงไปแตกต่างกัน 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.005, 0.01, 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สกัดตัวอย่างทุกระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ได้ผลดังตารางที่



รูปที่ 2.2.4 ผลของการเลือกใช้ของแข็งดูดซับต่างชนิดและปริมาณที่มีต่อค่าร้อยละการคืนกลับของสาร

2.2.3 ทั้งค่ารีเทนชันไทม์ของสารทั้งหมด ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเที่ยงที่แสดงโดยใช้ค่าร้อยละของความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์ และค่าขีดจำกัดการตกค้างสูงสุดของกฎเกณฑ์การส่งออกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันประกอบไว้ด้วย



รูปที่ 2.2.5 สัญญาณการตรวจวัด Multiple-reaction monitoring, MRM ที่จากเครื่อง UPLC-ESI-MS/MS ของตัวอย่างข้าวที่เติมสารมาตรฐานกลุ่มสารกำจัดวัชพืชกรดฟีนอกซี 13 ชนิด ลงไปที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

### 2.2.3 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัดและตรวจวัดสารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซีจำนวน 13 ชนิดในตัวอย่างข้าว โดยได้ดัดแปรวิธีการสกัดจากเทคนิค QuEChERS ใช้ตัวอย่างข้าว 10 กรัม เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตรและสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไตรไซล์จำนวน 10 มิลลิลิตรที่ปรับสภาพ ให้เป็นกรดด้วยการผสมกรดฟอร์มิกร้อยละ 5 ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเติมเกลือแมกนีเซียม ซัลเฟต 4.0 กรัม ร่วมกับ 1.0 กรัมโซเดียมคลอไรด์และ 1.0 กรัม tri-Na และ 0.5 กรัม di-Na citrate เขย่าและเซนตริฟิวส์แยกชั้นสารละลาย เติมน้ำละลายอินทรีย์ชั้นบนลงในหลอดที่บรรจุ 1.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัม C18 และ 0.10 กรัมของอะลูมินาที่เป็นกลาง เขย่าประมาณ 1 นาที และดูดสารละลายอินทรีย์ชั้นบนจำนวน 5.00 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลายให้แห้งด้วยการพ่นแก๊ส ไนโตรเจนที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ละลายสารที่ได้ภายหลังระเหยตัวทำละลายด้วยเฟส เคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.20 ไมครอนและตรวจวัดด้วย UPLC-MS/MS ระยะเวลาการตรวจวัดทั้งสิ้น 9 นาที ดังแสดงภาพแผนผังการวิเคราะห์ในรูปที่ 2.2.6 วิธีการที่พัฒนา

ได้นี้มีค่าความแม่นยำแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับ ความเที่ยง สภาพไวการตรวจวัดและค่าขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพึงพอใจ สามารถใช้ได้ในงานตรวจวัดที่ทำเป็นประจำ และสามารถสนองตอบกฎเกณฑ์การตรวจวัดของประเทศคู่ค้าได้ นอกจากนี้วิธีการมีความง่าย สะดวก ปลอดภัย และมีราคาค่าวิเคราะห์ต่ำ สมควรต่อการนำไปใช้งานและขยายขอบข่ายให้ครอบคลุมสารชนิดอื่นๆ ที่ต้องการได้

**ตารางที่ 2.2.3** ค่ารีเทนชันไทม์ ค่าร้อยละการคืนกลับ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์ของสารกำจัดวัชพืชกลุ่มพีนอกซี 13 ชนิดในตัวอย่างข้าว

Compound	Retention time (min)	Mean recovery <sup>a</sup> (%)				LOD (mg kg <sup>-1</sup> )		MRL (mg kg <sup>-1</sup> ) [xx]
		0.005 mg kg <sup>-1</sup>	0.01 mg kg <sup>-1</sup>	0.02 mg kg <sup>-1</sup>	0.05 mg kg <sup>-1</sup>	This method	Ref[25].	
Clopyralid	3.45	94 ± 9.5	77 ± 2.0	68 ± 0.6	66 ± 1.2	0.005	–	NC
Picloram	4.27	53 ± 3.8	57 ± 1.5	54 ± 0.6	57 ± 0.6	0.005	–	NC
Quinclorac	6.93	104 ± 11.8	87 ± 7.8	70 ± 0.6	66 ± 1.2	0.005	–	NC
Dicamba	7.06	85 ± 5.6	92 ± 9.0	85 ± 1.5	89 ± 2.5	0.001	0.0012	NC
2,4-D	7.97	94 ± 5.5	94 ± 3.6	97 ± 4.0	84 ± 0.6	0.0005	0.0002	0.050
MCPA	8.01	67 ± 12.7	45 ± 3.2	70 ± 1.0	68 ± 5.3	0.005	0.0009	0.050
Triclopyr	8.29	85 ± 11.1	80 ± 1.5	81 ± 5.0	78 ± 4.4	0.003	–	NC
MCPP	8.41	61 ± 4.2	45 ± 2.0	53 ± 4.7	68 ± 9.2	0.005	0.0020	NC
2,4,5-T	8.45	78 ± 7.8	66 ± 4.9	81 ± 7.5	76 ± 2.5	0.001	–	0.050
Fluroxypyr	8.49	85 ± 5.3	84 ± 13.0	83 ± 3.1	74 ± 0.6	0.001	–	0.050
2,4-DB	8.58	76 ± 13.3	59 ± 2.1	86 ± 5.1	72 ± 2.0	0.001	–	0.050
MCPB	8.62	95 ± 8.2	93 ± 2.6	95 ± 4.0	74 ± 0.6	0.003	–	0.050
Acifluorfen	8.62	90 ± 1.0	91 ± 3.5	92 ± 4.2	79 ± 0.6	0.0005	–	NC

Weigh 10 g of homogenized rice sample into 50 mL centrifuge tube  
↓  
Add 10 mL of 5% (v/v) formic acid in acetonitrile and 5 mL of water  
↓ *shake vigorously 1 min*  
Add 4.0 g of MgSO<sub>4</sub>, 1.0 g of NaCl, 1.0 g of *tri*-Na, and 0.5 g of *di*-Na  
↓ *shake 1 min and centrifuge*  
Take all aliquot  
and add 1.50 g of MgSO<sub>4</sub>, 0.25 g of C18 and 0.10 g of alumina neutral  
↓ *shake 1 min and centrifuge*  
Take 5 mL of aliquot into round bottom flask  
↓ *evaporate to dryness at 40 °C*  
Reconstitute in 1 mL of mobile phase  
↓ *filter through 0.2 μm*  
Analyze by UPLC-MS/MS

**รูปที่ 2.2.6** แผนผังสรุปวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนามาเพื่อการตรวจสอบสารกำจัดวัชพืชกลุ่มกรดฟีนอกซีในข้าว

#### 2.2.4 เอกสารอ้างอิง

- [1] M.I. Catalina, J. Dalluge, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 877 (2000) 153.
- [2] C.W. Thorstensen, O. Lode, A.L. Christiansen, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5829.
- [3] S. Roy, S.B. Singh, J. Chromatogr. A 1065 (2005) 199.
- [4] M.J. Santos-Delgado, E. Crespo-Corral, L.M. Polo-Diez, Talanta 53 (2000) 367.
- [5] J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, J. Chromatogr. A 959 (2002) 25.
- [6] J. Wu, K.H. Ee, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 1082 (2005) 121.
- [7] L.Z. Yu, M.J.M. Wells, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 16.
- [8] C.W. Thorstensen, A. Christiansen, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4199.
- [9] R.B. Geerdink, A. Kooistra-Sijpersma, J. Tiesnitsch, P.G.M. Kienhuis, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 863 (1999) 147.
- [10] M. Biesaga, A. Jankowska, K. Pyrzyńska, Microchim. Acta 150 (2005) 317.

- [11] A. Lagana, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 187.
- [12] A. Farran, S. Ruiz, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 267.
- [13] N. Rosales-Conrado, M.E. Leon-Gonzalez, L.V. Perez-Arribas, L.M. Polo-Diez, *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 202.
- [14] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 35.
- [15] H. Zhang, T. Song, W. Zhang, W. Hua, C. Pan, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 6089.
- [16] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27.
- [17] J.-F. Liu, L. Torang, P. Mayer, J.A. Jonsson, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 56.
- [18] F.M. Lanc, as, S.R. Rissato, M.S. Galhiane, *Chromatographia* 50 (1999) 35.
- [19] I. Rodriguez, E. Rubi, R. Gonzalez, J.B. Quintana, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 259.
- [20] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, *J. AOAC Int.* 2003, 86, 412.
- [21] S. J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 2007, 90, 485–520.
- [22] Data of Imported Agricultural Hazardous Substances: January 2003, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.
- [23] Document no. SANCO/2007/3131, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, 31/October/2007, [http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf). (accessed December 2007).
- [24] The Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission Home Page. [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm) (accessed January 2008).

### 2.3 โครงการย่อย 1.2: การขยายขอบข่ายวิธีการ QuEChERS เพื่อการสกัดสารกำจัดศัตรูพืชครอบคลุมกลุ่มธัญพืช พืชที่มีน้ำมันมากเช่นถั่ว เมล็ดแฟลกซ์ (flaxseeds) และแป้ง (doughs)

เมล็ด flaxseeds เป็นแหล่งโภชนาการที่สำคัญมีคุณค่าทางอาหารสูงและให้ประโยชน์ต่อร่างกาย มีปริมาณ กรดไขมันชนิด  $\alpha$ -linoleic acid (ซึ่งเป็นหนึ่งในกรดไขมันจำเป็นในกลุ่ม omega-3) ช่วยป้องกันโรคหัวใจ นอกจากนี้ยังมีใยอาหาร ลิกนิน แมกนีเซียม และสาร antioxidant สูง มีประสิทธิภาพในการลดความเสี่ยงต่อโรคเบาหวาน ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ควบคุมน้ำตาล ระดับอินซูลิน และควบคุมการทำงานของระบบขับถ่ายในร่างกาย [1,2] ดังนั้นความต้องการบริโภคจึงเพิ่มสูงขึ้นมาก เมล็ด flaxseeds นี้นิยมใช้ในการผสมลงในแป้งขนมปัง แป้ง อาหารเข้าประเภทซีเรียล รวมถึงกระบวนการแปรรูปแป้งเป็นขนมประเภทต่างๆ

และด้วยเหตุที่สารกำจัดศัตรูพืชเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมและเพิ่มผลผลิตการเกษตร ดังนั้นโอกาสที่สารเหล่านี้จะเข้ามาปนเปื้อนในสินค้าเกษตรกรรมจึงมีความเป็นไปได้สูง เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคหลายประเทศจึงมีมาตรการในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารในอาหารอย่างเข้มงวด

เมล็ด flaxseeds และพืชที่มีปริมาณไขมันสูงนับเป็นความเสี่ยง เพราะสารกำจัดศัตรูพืชที่มีสมบัติไม่มีสภาพขี้จะละลายได้ในชั้นไขมันของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ดังนั้นจะเพิ่มโอกาสของการตกค้างของสารเหล่านี้ในพืช ผล หรือผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ได้มาก ตารางที่ 2.3.1 แสดงค่าองค์ประกอบพื้นฐานของพืชผลในกลุ่มนี้ ซึ่งได้จากข้อมูลโภชนาการจากการศึกษาของ USDA (United State Department of Agricultural) [3] การตรวจวัดและการควบคุมการปนเปื้อนสารปริมาณน้อยในพืชผลกลุ่มนี้ทำได้ยาก เนื่องจากปริมาณไขมันจะรบกวนการสกัดและการวิเคราะห์ อีกทั้งยังส่งผลต่อความเสียหายและสกรปรกของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัด ดังนั้นการศึกษาการปนเปื้อนในตัวอย่างกลุ่มนี้ จึงเป็นงานที่ทำทายนักวิเคราะห์ที่จะต้องคิดหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันรบกวนออกและสามารถตรวจวัดการตกค้างของสารปนเปื้อนที่สนใจได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ

ที่ผ่านมาเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย [4], เทคนิค gel permeation chromatography (GPC) [5] หรือ การตกตะกอนไขมันที่อุณหภูมิต่ำ [6-8] เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการกำจัดไขมันในเบื้องต้นนอกจากเนื้อเมทริกซ์ที่มีปริมาณไขมันสูงก่อนที่จะนำไปเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนอื่นต่อไป แต่วิธีการที่กล่าวนั้นล้วนแต่ต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์สูง ใช้อุปกรณ์เครื่องแก้วปริมาณมาก ขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลานาน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ตามจำนวนที่

ต้องการ มีการใช้เทคนิคอื่นๆ เข้ามาช่วยในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดปริมาณสารตกค้าง กลุ่มสารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างเนื้อเมทริกซ์ที่มีปริมาณไขมันสูงเช่น Solid-phase extraction (SPE) [9], microwave assisted extraction (MAE) [10], matrix solid-phase dispersion (MSPD) [11, 12] และเมื่อไม่นานมานี้มีการนำเสนอวิธีการ SPE ที่ใช้ตัวดูดซับชนิด carbon nanotubes มาร่วมด้วย [13] แต่วิธีการทั้งหมดที่กล่าวมามีทั้งข้อดีและข้อเสีย และหลายเทคนิคยังไม่สามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่ต้องทำงานประจำและมีปริมาณตัวอย่างจำนวนมากได้

### ตารางที่ 2.3.1 ส่วนประกอบของเนื้อตัวอย่าง\* ที่สนใจในงานวิจัยนี้

	Flax seeds	Peanuts, raw	Biscuit dough	Cinnamon roll dough	Pie crust
Water (%)	7.0 ± 1.6, n=3	6.50 ± 0.09, n=31	33.5	28	19.2
<b>Lipids (%)</b>	<b>42.2 ± 3.2, n=6</b>	<b>49.2 ± 0.3, n=98</b>	<b>13.8</b>	<b>11.4</b>	<b>25.5</b>
Carbohydrates (%)	28.9	16.1	41.4	52.3	51.1
Protein (%)	18.3 ± 0.9, n=7	25.8 ± 0.2, n=78	6.9	4.5	3.0

\*USDA Food Composition Database (4) - [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/)

ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะทดลองใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ที่ประสบความสำเร็จและเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ และงานที่ได้ทำไว้ในตอนที่ 2.2 และเป็นที่น่าสนใจว่าวิธีการนี้สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันสูง เช่นในกรณีของเมล็ด flaxseeds ถั่ว หรือแป้งที่มีส่วนผสมของธัญพืชได้หรือไม่

ดังนั้นงานวิจัยในโครงการย่อยนี้ จึงมีเป้าประสงค์ที่จะทดสอบการใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS กับตัวอย่างทางการเกษตรหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปการเกษตรที่มีปริมาณไขมันสูง (>20%) โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เชื่อมต่อกับแมสสเปกโตรเมทรีระบบไทม์ออฟไฟท์ (Time-of-flight, TOF) ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการผู้ร่วมวิจัย เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ต่อไป สาเหตุที่เลือกใช้เทคนิค GC เนื่องจากเทคนิคนี้มีข้อจำกัดในการตรวจวัดสารที่มีปริมาณไขมันสูง เสี่ยงต่อความเสียหายของเครื่องมือ ซึ่งหากประสบความสำเร็จจะสามารถขยายขอบข่ายงานออกไปได้อีกมาก

#### 2.3.1 การทดลอง

##### 2.3.1.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้

สารมาตรฐานกลุ่มยากำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในการศึกษานี้ทั้งหมด 34 ชนิด ได้แก่ atrazine, azoxystrobin, bromopropylate, carbaryl, *cis*-chlordane, chlorothalonil, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, coumaphos, cypermethrin, deltamethrin, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, diazinon, dichlorvos, dimethoate, endosulfan sulfate, ethoprophos, fenthion, folpet, heptachlor, hexachlorobenzene, lindane, malathion, metolachlor, mirex, oxyfluorfen, permethrin, pirimiphos-methyl, procymidone, quintozone, tolylfluanid, trifluralin, และ vinclozolin เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) และ US Environmental Protection Agency's National Pesticide Repository (Fort Meade, MD; USA) มีความบริสุทธิ์สูง >95%.

สารละลายมาตรฐานทุกชนิดที่ใช้เป็นสารละลายตั้งต้นมีความเข้มข้น  $\geq 2,000$  นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในตัวทำละลายโทลูอีน อะซิโตนไตรไซล์ หรือ เอทิลอะซิเตท ขึ้นกับสภาพตัวของสารนั้นๆ สำหรับสารละลายที่ใช้ในการปฏิบัติงาน (working standard solution) เตรียมเป็นสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในตัวทำละลายอะซิโตนไตรไซล์ สารละลายที่ใช้เป็นสารเทียบมาตรฐานภายใน (internal standard, IS) ได้แก่ diazinon และสารที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานเพื่อควบคุมคุณภาพ (quality control, QC) คือ procymidone เตรียมที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันคือ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในตัวทำละลายอะซิโตนไตรไซล์

สารตัวอย่าง flaxseeds สายพันธุ์สีน้ำตาลและสีทอง (brown and golden varieties) ที่บดแล้ว, ถั่วบดทั้งเปลือก (ground peanut with shell), และแป้ง (dough) ชนิดต่างๆ ได้แก่ pie crust, Buttermilk Grand biscuits, และ Flaky Supreme cinnamon rolls ได้รับจากบริษัท General Mills (Golden Valley, MN; USA)

ตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับงานการวิเคราะห์ (analytical grade) ของบริษัท J.T. Baker (Phillipsburg, NJ; USA) เกลือและสารที่ใช้ในการกำจัดสิ่งรบกวน ได้แก่ anhydrous magnesium sulfate (anh.  $MgSO_4$ ) และ 150 mg anh.  $MgSO_4$ , 150 mg primary-secondary amine (PSA), and 50 mg octadecylsilane (C-18) ที่บรรจุสำเร็จรูปพร้อมใช้งานในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เป็นของบริษัท UCT, Inc. (Bristol, PA; USA) เกลือโซเดียมคลอไรด์ เกรด ACS ของบริษัท Mallinckrodt (Paris, KY; USA).

### 2.3.1.2 เครื่องมือและสภาวะการทดลอง

#### เครื่อง **Gel-permeation chromatography**, GPC

เครื่อง GPC: J2 Scientific (Accuprep MPS, Columbia, MO; USA)

คอลัมน์: Biobeads S-X3 (2.5 cm i.d. × 22.5 cm)

เฟสเคลื่อนที่: 1:1 (v:v) EtOAc:cyclohexane  
อัตราการไหล: 5 mL/min  
ปริมาตรการฉีด: 5 mL  
เครื่องตรวจวัด: UV

นำน้ำมันสกัดจากเมล็ด flaxseed ที่มีสารมาตรฐานกำจัดศัตรูพืชที่เป็นตัวแทนในงานวิจัยนี้จำนวน 34 ชนิด แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง มาจำนวน 2 กรัม ละลายใน 10 mL ของสารละลายผสมEtOAc:cyclohexane อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (equivalent to 25 mg injected flaxseed oil) เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย GPCสารที่ต้องการวิเคราะห์จะผ่านออกมาในช่วงเวลา 10-16 นาที เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาในช่วงเวลานี้ใส่ในหลอดทดลอง นำมาระเหยตัว ทำละลายออกให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง Zymark Turbovap evaporator (Hopkinton, MA;USA) ภายใต้แก๊สไนโตรเจน ละลายสิ่งที่แห้งเหลืออยู่ด้วยตัวทำละลายอะซิโทไนโตรลล์ถ่ายใส่ขวดฉีดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-TOF ในขั้นตอนต่อไป

เครื่อง *Gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry*, GC-TOF

เครื่องมือ: Agilent Technologies (Palo Alto, CA; USA) Model 6890 gas chromatograph เชื่อมต่อกับ Leco (St. Joseph, MI; USA) Pegasus 4D TOF mass spectrometer  
คอลัมน์: Rtx-5MS with Integra-Guard (20 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness) ต่อเชื่อมกับคอลัมน์ Rtx-CPL Pesticides II (1.5 m × 0.10 mm × 0.10 μm thickness) ของบริษัท Restek (Bellefonte, PA; USA) ต่อปลายคอลัมน์ที่สองนี้เข้ากับเครื่องตรวจวัด (เมื่อต่อคอลัมน์ทั้งสองนี้แล้ว ค่าที่ใช้ในการปรับค่าการไหลจะใช้ค่าเป็นคอลัมน์ 5.34 m × 0.18 mm i.d.)  
สภาวะการแยก: ใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่ใช้ในรายงานการวิจัยของ Mastovska *et al.*[16] คือ  
แก๊สพา: ฮีเลียม  
อัตราการไหล: 1.5 mL/min  
ปริมาตรการฉีด: 2 ไมโครลิตร  
การนำเข้าตัวอย่าง: pulsed splitlessใช้ความดัน 75 psig เป็นเวลา 1 นาที  
อุณหภูมิอินเลท: 250°C  
อุณหภูมิเตาอบ: โปรแกรมอุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 60°C 2 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 20°C/นาที จนถึง 180°C จากนั้นเพิ่มด้วยอัตรา5°C/นาที จนถึง230°C แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 20°C/นาที จนถึง 280°C และ40°C/นาที จนถึง 300°C รักษาอุณหภูมิคงที่ต่อไปอีก 12 นาที  
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์: ~25 นาที

อุณหภูมิ transfer line:	280°C
อุณหภูมิ ion source:	250°C
พลังงานในการไอไอไนซ์:	-70 eV
ช่วงของมวลที่วิเคราะห์:	<i>m/z</i> 70-600
ศักย์ไฟฟ้าที่จุดตรวจวัด:	1800 V
อัตราเร็วในการเก็บข้อมูลสเปกตรัม:	10 spectra ต่อวินาที
การประมวลผลข้อมูล:	Leco ChromaTOF software
คลังข้อมูลสเปกตรัม:	NIST mass spectral library และ Agilent's pesticide and endocrine disruptor database

ค่าเวลารีเทนชันใหม่ ( $t_R$ ) ของไอออนทุกชนิดที่วิเคราะห์ด้วย GC-TOF แสดงในตารางที่ 2.3.2 ค่าพื้นที่ใต้พีคที่แสดง เป็นค่าที่เทียบอัตราส่วนกับสารที่ใช้เทียบมาตรฐานภายในแล้วในการเทียบมาตรฐานหาปริมาณจะใช้สารละลายมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายที่สกัดจากเมทริกซ์แบลนจ์

ในบางการทดลองจะใช้การฉีดแบบ large volume injection (LVI) เพื่อให้ได้ค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ต่ำโดยใช้ Atas-GL International (Veldhoven, The Netherlands) Optic 3 programmable temperature vaporizer ฉีดสารปริมาณ 10 ไมโครลิตร ตัวแปรที่ใช้ในการฉีดคือ

#### ตัวแปรในการฉีดแบบ LVI

อุณหภูมิการฉีด:	75°C เป็นเวลา 18 วินาที และเพิ่มด้วยอัตรา 8°C ต่อวินาที จนถึง 280°C
ฉีดแบบ:	splitless เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิมินิมอล:	250°C
อัตราการ split:	50 มิลลิลิตร ต่อนาที

#### 2.3.1.3 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างโดยการตัดแปรวิธีการ QuEChERS จะใช้ตามวิธีการที่ระบุในงานวิจัยของ Mastovska, *et al.*[16] คือ นำตัวอย่างที่ปั่นละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์โพริลิโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร น้ำหนักที่ชั่งอยู่ประมาณ 2.5 ถึง 5 กรัม ขึ้นกับชนิดของเมทริกซ์และการทดลอง เติมสารละลายมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์รวมทั้งสารละลายมาตรฐานภายในลงไปในตัวอย่างตามความเข้มข้นที่ต้องการและตั้งทิ้งไว้ในตัวอย่างและสารละลายที่เติมผสมกันประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร และ อะซิโตนไตรล 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุตัวอย่างผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง automatic vortexer ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงให้สารละลายซึมเข้าในเนื้อเมทริกซ์ก่อนนำมาทำการสกัด เติม 4 กรัม anhydrous  $MgSO_4$  และ 1 กรัม NaCl ลงในหลอดและเขย่าด้วยมือแรงๆ ประมาณ 1 นาที จนแน่ใจว่า

ไม่มีผงเกลือเกาะกันเป็นก้อนเหลืออยู่ นำไปเซนตริฟิวส์ที่ 3,000 rcf เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดสารละลายอะซิโตนในไตรล์ที่อยู่ชั้นบนมา 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตรที่ภายในบรรจุด้วย 150 mg anh. MgSO<sub>4</sub>, 150 mg PSA, และ 50 mg C-18 เขย่า 30 วินาที จากนั้นนำหลอดนี้ไปเซนตริฟิวส์ที่ 3,000 rcf เป็นเวลา 3 นาที ถ่ายสารละลายชั้นบนที่สกัดได้ปริมาณ 200

**ตารางที่ 2.3.2** ค่ารีเทนชันไทม์ และไอออนที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์สารแต่ละชนิด รวมถึงค่าความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานในเนื้อเมทริกซ์แบลงก์ของสารสกัด flaxseeds ฉีด 10 µL ผ่าน PTV Optic-3 injection.

Pesticide	t <sub>R</sub> (s)	Quant. ion (m/z)	Other Ions (m/z)	Linearity <sup>a</sup> (linear regression)
Dichlorvos	457.61	109	185, 220	0.998
Ethoprophos	646.04	158	139, 200	0.999
Trifluralin	666.83	264	306, 335	0.999
Hexachlorobenzene	709.46	284	214, 249	0.998
Dimethoate	715.72	125	229	0.998
Atrazine	722.85	200	215	0.999
Lindane	744.88	181	111, 219	0.995
Quintozene	750.95	237	249, 295	0.999
Diazinon (IS)	756.41	137	179, 304	-
Chlorothalonil	787.81	266	229	0.992
Vinclozolin	835.47	285	212, 198	0.995
Chlorpyrifos-methyl	837.17	125	286	0.994
Carbaryl	848.36	144	115	-
Heptachlor	852.16	272	237, 372	0.997
Pirimiphos-methyl	881.00	290	276, 305	0.997
Malathion	897.08	173	125, 158	0.999
Metolachlor	910.81	162	238	0.998
Fenthion	914.87	278	125, 169	0.999
Chlorpyrifos	916.74	197	258, 314	0.999
Tolyfluanid	987.26	137	238, 346	-
Folpet	1009.74	260	147, 297	-
Procymidone (QC)	1010.74	283	255	-
cis-Chlordane	1051.29	373	237, 410	0.996
p,p'-DDE	1088.37	246	176, 318	0.994
Oxyfluorfen	1103.97	252	302, 361	0.995
o,p'-DDT	1157.74	235	165, 354	0.999
Endosulfan sulfate	1197.51	272	387, 422	0.996
Bromopropylate	1245.82	341	155, 183	0.999
Mirex	1283.91	272	237, 332	0.999

Permethrin	1315.95	183	163	0.987
Coumaphos	1331.57	226	210, 362	0.986
Cypermethrin	1358.48	163	181, 209	0.997
Deltamethrin	1454.51	253	172, 181	0.998
Azoxystrobin	1480.67	344	388, 403	0.998

ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็กเติม 20 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐานควบคุมคุณภาพภายใน แล้วนำหลอดเล็กนี้ไปใส่ในขวดฉีดสารเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-TOF

## 2.3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

### 2.3.2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม

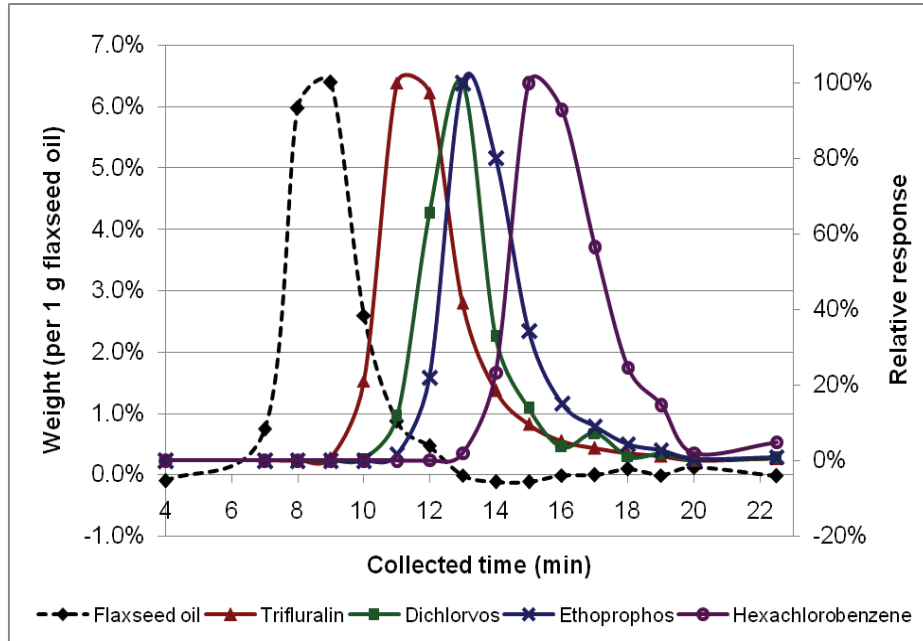
#### การกำจัดไขมันด้วยเทคนิค GPC

ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GC ในเนื้อตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันสูงนั้น ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะปริมาณไขมันที่เหลืออยู่แม้เพียงเล็กน้อยจะมีผลให้สัญญาณลดลงและคอลัมน์เสื่อมสภาพได้ง่าย จากตารางที่ 2.3.1 จะเห็นได้ว่าเนื้อเมทริกซ์ flaxseeds และ peanuts มีปริมาณไขมันมากกว่า 40% โดยทั่วไปในกรณีนี้สารตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันสูง เทคนิค GPC จะเป็นที่ยอมรับใช้ในการกำจัดไขมันออกจากสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยของเหลวในขั้นตอนแรก การแยกใน GPC จะขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์ที่เหมาะสมกับขนาดโมเลกุลของสาร เช่นหากสารที่ต้องการวิเคราะห์โมเลกุลเล็กจะหลุดออกจากคอลัมน์ช้ากว่าโมเลกุลของไขมันที่มีขนาดใหญ่กว่า ในงานวิจัยนี้จะเปรียบเทียบการใช้เทคนิค GPC ในการกำจัดไขมันด้วยเช่นกัน

รูปที่ 2.3.1 แสดงการแยกน้ำมัน flaxseeds 1 กรัม โดยเก็บสารแต่ละส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาที่เวลาต่างๆ และวิเคราะห์ด้วย GC-TOF น้ำหนักของน้ำมันจะบันทึกในทุกนาทีของแต่ละส่วนที่ผ่านออกมา จากงานวิจัยที่ผ่านมาหากต้องการแยกไขมันจากเนื้อสัตว์ เช่น ไขมันปลา (cod liver oil, whale blubber, lard) ออกจากสารกำจัดศัตรูพืชหรือสารอินทรีย์ปนเปื้อนทางสิ่งแวดล้อมที่ต้องการวิเคราะห์จะทำได้ง่าย แต่การแยกสารในไขมันจากพืชพบว่าทำได้ยากกว่า เวลาการออกของไขมันจะใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ออกมาในช่วงต้นเช่น trifluralin หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดใดที่ใช้เวลาผ่านคอลัมน์ออกมา <13 นาที จะไม่สามารถแยกออกจากไขมันของ flaxseeds ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.3.3

ดังนั้นการลดภาระคืนกลับที่ได้ในการใช้เทคนิคการกำจัดไขมันด้วย GPC นั้นมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับโดยเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีสภาพขี้สูง วิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารที่ต้องการตรวจวัดด้วยเทคนิคคลิวิตโครมาโทกราฟีเช่นกัน ดังนั้นจึงควรทดลองหาวิธีการอื่นที่มีความเหมาะสมกว่า แม้ว่าวิธีการนี้จะสามารถใช้ได้กับวิธีการ GC โดยอาจเลือกใช้คอลัมน์ GPC ที่ยาวมากขึ้นแต่จะเป็นการสิ้นเปลืองตัวทำลายมากอีกทั้งระยะเวลาที่ใช้จะมาก

ขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจึงวางเป้าหมายการทดลองใช้เทคนิค QuEChERS ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างเมล็ดธัญพืช [16] มากกว่าที่จะใช้เทคนิค GPC



รูปที่ 2.3.1: การแยกไขมันในเมล็ด flaxseed ในระบบ GPC ออกจากสารกำจัดศัตรูพืชที่ศึกษา โดยฉีดตัวอย่างน้ำมันสกัด 1 กรัม และเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ GPC ทุก 1 นาที

ตารางที่ 2.3.3 เวลาการผ่านออกมาจากระบบคอลัมน์ GPC ของสารกำจัดศัตรูพืชที่เลือกศึกษา จำนวน 34 ชนิด โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 1:1 EtOAc : cyclohexane อัตราการไหล 5 mL/min ปริมาตรการฉีด 5 มิลลิลิตร

Elution time (min)	Pesticides
11	Trifluralin
12	atrazine, cypermethrin, deltamethrin, diazinon, endosulfan sulfate, malathion, oxyfluorfen, permethrin, procymidone, tolylfluanid, vinclozolin
13	carbaryl, cis-chlordane, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, coumaphos, p,p'-DDE, o,p'-DDT, dichlorvos, dimethoate, ethoprophos, heptachlor, lindane, metolachlor,

	pirimiphos-methyl
14	chlorothalonil, fenthion, folpet, mirex, quintozene
15	Hexachlorobenzene

### ขั้นตอนแรกของการสกัด

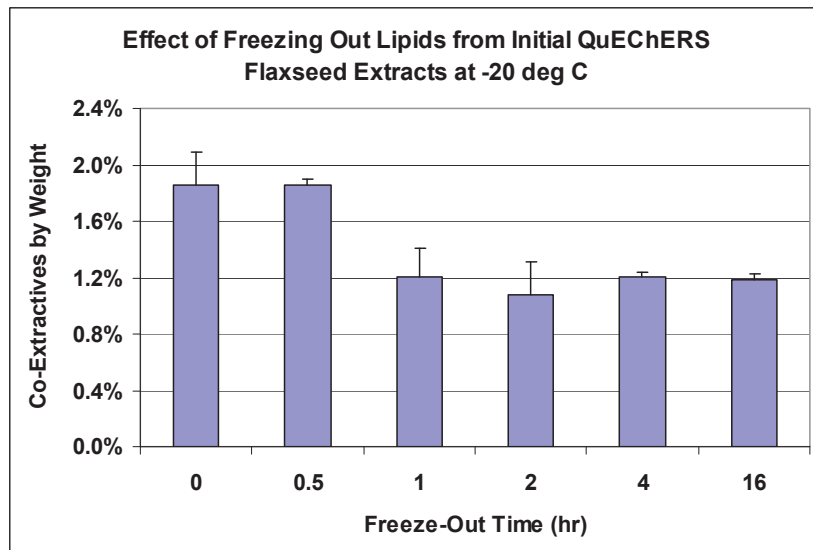
วิธีการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS มีแนวทางในการลดการรบกวนของไขมันอยู่แล้ว เนื่องจากไขมันมีค่าการละลายในตัวทำละลายอะซิโตนไทรลิต์ต่ำ ดังนั้นคาร์บอนการคืนกลับของสารกลุ่มยากำจัดศัตรูพืชจึงมีค่าสูง ไม่ว่าจะเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูง ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC หรือสารกลุ่มที่มีสภาพขั้วปานกลางที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC การปรับปริมาณตัวทำละลายให้เหมาะสมกับปริมาณไขมันของเนื้อตัวอย่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ใช้ปริมาณตัวอย่าง 2 กรัมของเมล็ด flaxseeds บด สกัดกับตัวทำละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยการใช้เครื่อง vortex ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที โดยเลือกใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ 1:1 EtOAc:cyclohexane (GPC mobile phase), EtOAc และ MeCN จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกให้แห้งและชั่งน้ำหนักหาปริมาณสารที่เหลืออยู่ที่มีโอกาสสามารถวิเคราะห์ พบว่าน้ำหนักของสารเหลืออยู่ประมาณ 18.9% และ 17.9% เมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นเมื่อใช้ 1:1 EtOAc:cyclohexane และ EtOAc ตามลำดับ กรณีที่ใช้ acetonitrile จะเหลือน้ำหนักเพียง 4.3% เท่านั้น เมื่อเทียบกับวิธีการ GPC แล้ว พบว่า หาก เก็บสารละลายในช่วง 10-20 นาที ปริมาณสารที่มีอยู่จะอยู่ที่ 3.5-4.7% ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้วิธีการ QuEChERS ดังนั้นวิธีการ QuEChERS จึงเป็นทางเลือกในการสกัดที่ดียิ่ง

กรณีที่ตัวอย่างเป็นเมทริกซ์ที่แห้ง (น้ำ <25%) การเติมน้ำลงไปในตัวอย่างไม่ช่วยให้ตัวทำละลายสกัดสามารถแทรกซึมลงไปเนื้อตัวอย่างทำให้ประสิทธิภาพการสกัดดีขึ้นได้ Mastovska *et al.*[16] พบว่ากรณีตัวอย่างแห้ง 2.5 ถึง 5 กรัม ต้องเติมน้ำลงไป 10 มิลลิลิตรและอะซิโตนไทรลิต์อีก 10 มิลลิลิตร และควรที่จะเติมตัวทำละลายลงไปพร้อมกันในระหว่างขั้นตอนการทำให้สารตัวอย่างบวมขึ้นนั้น ส่วนปริมาณตัวทำละลายนั้นจะขึ้นกับปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างไม่นั้น ในงานวิจัยนี้ทำการเปรียบเทียบการใช้ปริมาณตัวอย่างแบ่งที่แตกต่างกันเป็น 2.5 และ 5 กรัม

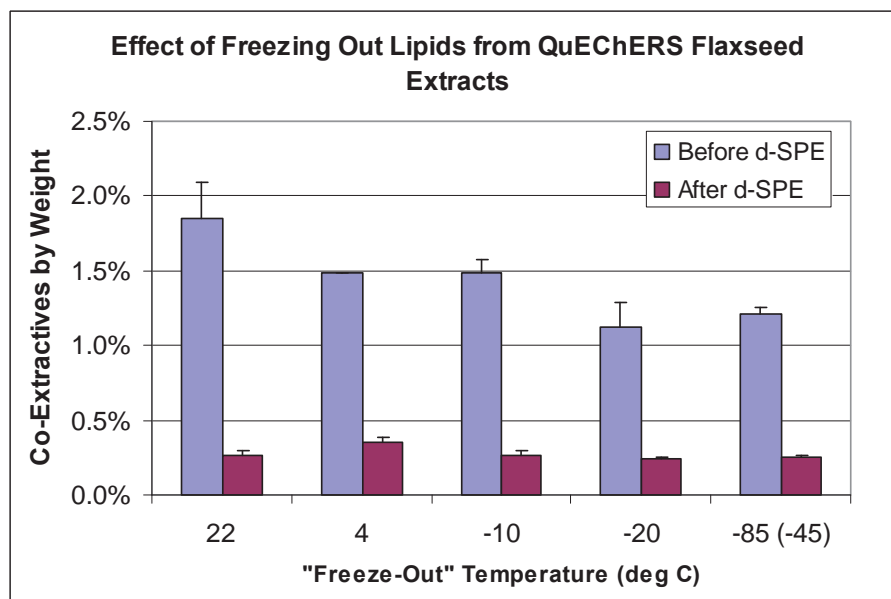
การเติม 4 กรัมของ anhydrous MgSO<sub>4</sub> and 1 กรัมของ NaCl จะช่วยในการแยกเฟสและช่วยให้สารที่ต้องการวิเคราะห์กระจายตัวเข้าไปอยู่ในชั้นของตัวทำละลายได้มากขึ้น และเพิ่มค่าการเลือกในกระบวนการสกัดให้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว และพบว่าเวลาที่ใช้ในการเขย่าไม่มีความแตกต่างของน้ำหนักสารเจือปนเท่าใดนัก

การกำจัดไขมันด้วยวิธีการตกตะกอนไขมันที่อุณหภูมิต่ำและการกระจายของแข็งดูดซับในสารละลายสกัด

แม้ว่าขั้นตอนการสกัดด้วยอะซิโตนไตรล์จะเป็นการลดปริมาณสารไขมันที่เข้ามารวมในสารละลายสกัดแล้วแต่ขั้นตอนการทำความสะอาดสารสกัดเพิ่มเติมยังคงมีความจำเป็นหากต้องการนำสารสกัดนี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC วิธีการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไขมันตกตะกอนและแยกตัวออกจากสารละลายเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการกำจัดไขมัน ซึ่งจะช่วยลดปริมาณสารที่มี



รูปที่ 2.3.2 ผลของเวลาที่มีต่อการตกตะกอนสารสกัดร่วมในสารละลายสกัด QuEChERS flaxseed (ก่อนขั้นตอน cleanup ด้วย d-SPE) ที่ -20°C



**รูปที่ 2.3.3** ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการตกตะกอนไขมันในสารสกัด QuEChERS flaxseed โดยเก็บเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ที่อุณหภูมิ  $-85^{\circ}\text{C}$  จะเพิ่มอุณหภูมิถึง  $-45^{\circ}\text{C}$  ก่อน จึงจะสามารถละลายอะซิโตนไตรโตนและนำออกเพื่อทำการชั่งน้ำหนักสารได้)

สภาพขั้วต้อออกจากสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหรือตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงได้ดี [6-8] วิธีการนี้จัดว่าง่าย ราคาไม่แพง และไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆ เพิ่มเติม ใช้เฉพาะแต่เวลาที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนการทำให้เย็นและตู้แช่แข็งเท่านั้นหรืออุปกรณ์ใดๆ ที่สามารถใช้ในการลดอุณหภูมิตัวอย่างลง พบว่าภายหลังการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS ตามที่กล่าวแล้วคือใช้ตัวอย่าง flaxseeds จำนวน 2.5 กรัม เติมน้ำ 10 มิลลิลิตรร่วมกับ 10 มิลลิลิตรของตัวทำละลายอะซิโตนไตรโตน จากนั้นเติม 4 กรัมของ  $\text{anh. MgSO}_4$  และ 1 กรัมของ  $\text{NaCl}$  ปริมาณของสารที่คงค้างในสารละลายจะลดลงจาก 4% (กรณีที่ใช้เฉพาะตัวทำละลายอะซิโตนไตรโตนอย่างเดียว) เหลือเพียง 1.9% และจากรูปที่แสดงใน 2.3.2 ปริมาณสารคงค้างจะลดลงเหลือเพียง ประมาณ 1.2% เมื่อเก็บสารละลายสกัดที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือนานกว่า สารที่มาจากการสกัดร่วม ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นไขมันจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นขวด รูปที่ 2.3.3 แสดงผลของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการเก็บสารละลาย ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จะให้ผลที่ดีที่สุด และได้ทดลองใช้น้ำแข็งแห้งอุณหภูมิ  $-85^{\circ}\text{C}$  ในการทำให้เย็น พบว่าไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างกัน

จากข้อมูลที่ได้แม้จะพบว่าจากการสังเกตด้วยตา การชั่งน้ำหนัก และโครมาโทแกรมที่ได้จาก GC-TOF ของสารละลายก่อนและหลังการตกตะกอนในขั้นตอนการเก็บที่อุณหภูมิต่ำจะมีความแตกต่างกัน แต่ภายหลังการสกัดและเข้าสู่ขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารผสม 150 mg  $\text{anh. MgSO}_4$ , 150 mg PSA, และ 50 mg C-18 ต่อสารละลายสกัด 1 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายที่สกัดที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าน้ำหนักและโครมาโทแกรมที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันเลย น้ำหนักของสารสกัดร่วมจะเหลือเพียงประมาณ 0.25% โดยน้ำหนักเท่านั้นไม่ว่าสารละลายสกัดที่นำมาใช้จะผ่านขั้นตอนการตกตะกอนมาก่อนหรือไม่ก็ตาม ดังนั้นจึงสรุปว่าขั้นตอนการแช่แข็งสารละลายสกัดเพื่อตกตะกอนไขมันนั้นไม่มีความจำเป็นแต่อย่างใด

ในขั้นตอนของการกระจายเฟสของแข็งเพื่อทำความสะอาดตัวอย่างนั้น เกลือแมกนีเซียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำจะช่วยในการกำจัดน้ำที่อาจยังคงมีเหลืออยู่ในสารสกัด PSA มีสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุลบอย่างอ่อนใช้จับสารกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิก เช่นกรดไขมันในสารละลายสกัด และเพิ่มปริมาณจาก 25 มิลลิกรัมจากวิธีการดั้งเดิมเป็น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [14] และจะเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสารรบกวนชนิดกรดไขมันได้มากขึ้น [16] C-18 เป็นสารดูดซับประเภทไม่มีสภาพขั้วช่วยในการลดไขมันปริมาณน้อยที่มีในสารสกัดตัวอย่างลงได้ และมีงานวิจัย

ที่รายงานไว้ว่ามีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้กับตัวอย่างประเภทนมและไข่ [12] ในวิธีการเริ่มต้นของ QuEChERS และ งานการศึกษาการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการยังไม่มีการใช้ C18 แต่ในการศึกษาต่อมาพบว่าสารนี้ช่วยลดความสกปรกในสารสกัดและไม่มีผลต่อค่าร้อยละการคืนกลับของสารกำจัดศัตรูพืชที่ต้องการวิเคราะห์ ปัจจุบันจึงมีการเพิ่มตัวดูดซับชนิด C18 ในวิธีการสกัดแบบ QuEChERS ด้วยนอกจากนี้เมื่อเติม 7.5 มิลลิกรัม graphitized carbon black (GCB) ต่อกรัมตัวอย่าง[18] ลงไปด้วย จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำความสะอาดสารสกัดตัวอย่างให้ดีขึ้น แต่พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของ hexachlorobenzene (ซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน) มีค่าลดลงร้อยละ 30 ในเมทริกซ์ตัวอย่างที่มีไขมันต่ำ เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันสูงจึงเลือกที่จะไม่ใช้ตัวดูดซับชนิด GCB

โครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง flaxseed ด้วยวิธี QuEChERS จะสะอาดกว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการ GPC โดยเฉพาะสารที่ระเหยง่ายที่จะปรากฏในช่วงต้นของโครมาโทแกรม ดังนั้นจากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการเตรียมตัวอย่าง flaxseed เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน วิธีการกระจายอนุภาคของแข็งในสารสกัดจะลดการรบกวนในสารสกัดได้ดีกว่าวิธีการ GPC และการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ

### 2.3.2.2 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

ในการสกัดสารตัวอย่างที่มีไขมันสูงไม่ว่าจะเป็นการใช้ GPC หรือการปรับปรุงเทคนิค QuEChERS จะใช้ตามขั้นตอนเดิมที่เคยนำเสนอไว้ [16] เพราะให้ประสิทธิภาพการสกัดตัวอย่างที่ดีและเหมาะสมกับงานที่ทำเป็นประจำ กรณีสารกำจัดศัตรูพืชที่มีสมบัติละลายได้ดีในไขมันนั้นมักจะมีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำและมีขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สูง แต่สิ่งสำคัญในการศึกษาคือค่าร้อยละการคืนกลับควรมีค่าคงที่และมีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเป็นไปตามความต้องการของการวิเคราะห์ ประสิทธิภาพของวิธีการต้องให้ข้อมูลที่ดีทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ทั้งนี้จะตรวจสอบวิธีการในเทอมของค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด (linearity) อิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ (matrix effect) ค่าร้อยละการคืนกลับ (recoveries) ความสามารถในการตรวจวัด (detectability) และค่าความเที่ยง (precision) เป็นต้น

#### 2.3.2.2.1 ความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด

สารละลายที่ใช้เป็นกราฟเทียบมาตรฐานใช้สารละลายที่อยู่ในตัวทำละลายเนื้อเมทริกซ์ ซึ่งเตรียมโดยการเติมสารมาตรฐานชนิดสารกำจัดศัตรูพืชปริมาณ 0.25 ถึง 1.5 ไมโครกรัมต่อกรัมในเนื้อเมทริกซ์แบล็กทั้งหมด 6 ชนิดคือ เมล็ด flaxseed สีน้าตาล เมล็ด flaxseed สีทอง ถั่วแป้งขนมปังเนย (butter biscuit dough) แป้งขนมปังซินนามอน (cinnamon roll dough) และแป้งขนมพาย (pie crust dough) วาดกราฟโดยใช้ค่าอัตราส่วนพื้นที่ฟีกของสารที่วิเคราะห์ต่อสารมาตรฐานภายใน diazinon (IS) ต่อความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด พบว่ากราฟเทียบ

มาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐานดีกว่า 0.999 กับสารทุกชนิดที่ทำการตรวจวัด

ในการวิเคราะห์ทางแก๊สโครมาโทกราฟี ผลของเมทริกซ์ที่มีต่อสัญญาณการตรวจวัดเป็นประเด็นสำคัญที่ต้องทราบ และมีการศึกษาในตัวอย่างเมทริกซ์หลายชนิด [22, 24] พิกมีแนวโน้มสูงขึ้นในการตรวจวัดสารบางประเภท เมื่อองค์ประกอบของสารในเนื้อเมทริกซ์เข้าไปช่วยลดความว่องไวปฏิกิริยาที่ตำแหน่งการฉีดสาร คอลัมน์ และแหล่งกำเนิดไอออนของแมสสเปกโตรเมตรีเมื่อเทียบกับในกรณีที่ไม่มีเนื้อเมทริกซ์ สารที่ตรวจวัดจะเป็นตัวที่ปลดความกัมมันต์นี้จึงทำให้สัญญาณการตรวจวัดสารนั้นๆ น้อยลง ดังนั้นในการทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณสัญญาณการตอบสนองจึงเป็นไปในเชิงบวก ในการประมาณค่าการเปลี่ยนแปลงนี้ทำโดยการพิจารณาเส้นความชันของกราฟเทียบมาตรฐานระหว่างกราฟที่ได้จากการเตรียมจากเนื้อสารในตัวทำละลายกับการเตรียมสารในเนื้อเมทริกซ์ พบว่าเมทริกซ์ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณในช่วง -1 ถึง 306% ขึ้นกับชนิดของสารที่ตรวจวัด เนื้อเมทริกซ์ และสภาวะการทดลอง

ผลจากเนื้อเมทริกซ์นี้ไม่สามารถระบุเป็นค่าที่แน่นอนได้ ในตารางที่ 2.3.4 แสดงภาพรวมการเปรียบเทียบอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ที่มีต่อการเพิ่มขึ้นของการตรวจวัดสารแต่ละชนิด โดยเลือกเฉพาะสารที่มีการเปลี่ยนแปลงให้เห็นอย่างชัดเจน ในการทดลองนี้ทำการศึกษาทั้งในเทคนิคการฉีดแบบ pressure-pulsed splitless injection (PSI) และ large volume injection (LVI) โดยใช้ปริมาณการฉีดที่แตกต่างกันเพื่อความเหมาะสมของเทคนิคแต่ละชนิดตามที่ระบุไว้ในตารางนั้น

ข้อสรุปเป็นไปตามที่มีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ [22-24] คือสารที่มีสภาพขั้วน้อยที่สุด เนื้อเมทริกซ์จะมีผลน้อยที่สุดด้วยเช่นกัน และสารที่มีสภาพขั้วสูงเนื้อเมทริกซ์จะแสดงผลการเพิ่มขึ้นของสัญญาณสูงที่สุด ในเนื้อเมทริกซ์ที่ศึกษาพบว่า แป้งชนิด cinnamon roll แสดงผลการเปลี่ยนแปลงมากกว่าแป้งชนิดอื่นซึ่งเป็นผลมาจากการที่เนื้อแป้งชนิดนี้มีปริมาณน้ำตาลมากกว่าเนื้อเมทริกซ์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา และเนื้อแป้งพาย (pie crust dough) ให้ผลของเมทริกซ์ต่ำที่สุด ในการฉีดที่แตกต่างกันพบว่าชนิดของสารที่ตรวจวัดให้ผลของการเพิ่มสัญญาณในทิศทางเดียวกัน แต่ผลจะมากขึ้นเมื่อการฉีดนั้นมีปริมาณเนื้อเมทริกซ์มาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกใช้การสร้างกราฟเทียบมาตรฐานจากเนื้อเมทริกซ์เพื่อความถูกต้องของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

#### 2.3.2.2.2 ค่าร้อยละการคืนกลับ (ค่าความแม่นยำของวิธีการ)

ทำการเติมสารมาตรฐานของสารที่ต้องการตรวจวัดทุกรายการในปริมาณที่แน่นอนในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกันทุกประเภทที่เลือกศึกษา และคำนวณหาค่าปริมาณที่ตรวจวัดได้เทียบกับปริมาณที่เติมลงไปนั้น รายงานค่าร้อยละการคืนกลับที่ได้ ปริมาณสารมาตรฐานที่

เติมลงไปนี้จะเติมในปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อเนื้อตัวอย่าง 1 กรัม ตารางที่ 2.3.5 แสดงผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน

สารที่ต้องการตรวจวัดส่วนใหญ่ให้ค่าร้อยละการคืนกลับเป็นที่น่าพอใจในช่วง 70-120% และมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน <20% ในช่วงการทดลองที่ทำต่างวันกัน สารประเภทที่มีสภาพขี้ด้า (quintozene, chlorpyrifos, cis-chlordane, hexachlorbenzene, heptachlor, p,p'-DDE, o,p'-DDT, และ mirex) ในตัวอย่างเมล็ด flaxseed และถั่ว มีค่าร้อยละการคืนกลับ <70% เพราะเนื้อตัวอย่างมีปริมาณไขมันมากกว่า 40% แต่ในเนื้อตัวอย่างประเภทแป้งให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีกว่ามาก ดังนั้นค่าร้อยละการคืนกลับจึงขึ้นกับประเภทของเนื้อเมทริกซ์ โดยเฉพาะเนื้อเมทริกซ์ที่มีปริมาณไขมันสูงจะให้ค่าที่ต่ำลง สำหรับสารบางชนิดที่ให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ไม่ดี หรือไม่สามารตรวจวัดได้ พบว่าจะให้ค่าการตรวจวัดที่ดีได้ถ้าเปลี่ยนวิธีการตรวจวัดเป็นเทคนิค LC-MS/MS เช่น สารcarbaryl, dimethoate, และ azoxystrobin และสารที่มีสมบัติไวต่อสภาพความเป็นเบส เช่น folpet, chlorothalonil, และ tolylfluanid สารจะเกิดการเสื่อมสภาพในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เวลาการเก็บตัวอย่างหลังการสกัด และในขั้นตอนการฉีดที่ใช้ตัวทำละลายเป็นอะซิโตนไนโตรล์ และพบว่าตัวทำละลายนี้มีผลต่อการลดลงของการตรวจวัด deltamethrin ด้วยเช่นกัน [25]

**ตารางที่ 2.3.4:** การเปรียบเทียบอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ที่มีต่อสัญญาณการตรวจวัดใน GC-TOF ในกรณีที่ใช้การฉีดแบบ pressure-pulsed splitless injection (PSI) โดยฉีด 2 ไมโครลิตรของสารละลายที่ผ่านการสกัด คิดเป็น 0.5 กรัมเนื้อสารต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร และ large volume injection (LVI) โดยฉีด 10 ไมโครลิตรของสารละลายที่ผ่านการสกัด คิดเป็น 0.25 กรัมเนื้อสารต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร ผลของเมทริกซ์คำนวณโดยคิดค่าความแตกต่างระหว่างค่าความชันของกราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมในเนื้อเมทริกซ์เทียบกับที่เตรียมในตัวทำละลาย พิจารณาความแตกต่าง “0” <20%, “+”= 20-50%, “++” = 50-100% และ “+++” >100%

Pesticide	Biscuit		Cinnamon Roll		Pie Crust	
	PSI	LVI	PSI	LVI	PSI	LVI
Dichlorvos	++	+++	+++	+++	+	0
Trifluralin	0	+	++	++	+	+
Hexachlorobenzene	0	+	+	++	0	+
Atrazine	0	+++	++	+++	0	+
Lindane	0	++	++	++	+	0
Vinclozolin	+	0	++	+++	0	+
Chlorpyrifos methyl	+	+	+++	++	+	0
Pirimiphos-methyl	0	+	++	++	+	0
Malathion	++	++	+++	+++	++	+
Metolachlor	+	+	++	++	0	0

Fenthion	0	+	++	++	0	0
Chlorpyrifos	0	+	++	++	0	0
cis-Chlordane	0	0	+	+	0	0
p,p'-DDE	0	+	+	++	0	0
o,p'-DDT	0	+	++	++	0	0
Endosulfan sulfate	+	+	+	++	0	0
Bromopropylate	++	++	+++	+++	++	+
Mirex	0	0	++	++	0	0
Permethrin	++	+	+++	+++	+	0

ในการหาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่ละลายได้ดีในไขมัน ผลการตรวจวัดซ้ำในวัดเดียวกันและระหว่างวันจะมีค่าความผันแปรสูง โดยเฉพาะในตัวอย่าง flaxseed ที่มีปริมาณไขมันสูง (ตามตารางที่ 2.3.1) ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการทดลองต่างวันกันมีค่าสูง >26% รูปที่ 2.3.4 แสดงค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารที่ตรวจวัด 20 ชนิดในตัวอย่าง flaxseed ที่แตกต่างกัน 3 ตัวอย่าง ที่ทำการวิเคราะห์ในช่วงเวลา 6 วัน จะเห็นได้ว่าสารที่มีสภาพขี้ต้ำจะมีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ ตามที่กล่าวไว้แล้ว ดังนั้นหากต้องการค่าเชิงปริมาณที่ถูกต้องมากขึ้น อาจใช้การสกัดแบบ GPC มาช่วยยืนยันความถูกต้องของผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

สารที่มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำจะทำให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์สูง แต่สารที่ต้องการตรวจวัดส่วนใหญ่มีความเสถียรและให้สัญญาณการตรวจวัดที่ดีในเครื่องแมสสเปกโทรมetri ในการทดลองหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์ทำโดยการใช้ตัวอย่างแบล็กที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อกรัมและตรวจวัดสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน คำนวณค่าความเข้มข้นที่จะให้สัญญาณการตรวจวัดต่อสัญญาณรบกวนมีค่าเท่ากับ 3 สาร hexachlorobenzene และ chlorpyrifos มีค่า 0.009 และ 0.013 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อใช้ตัวอย่าง 2.5 กรัม และฉีด 10 ไมโครลิตรในเนื้อเมทริกซ์ถั่ว flaxseed และแป้ง ค่าที่ได้มีต่ำตามเกณฑ์การตรวจวัดที่ต้องการและสามารถใช้ในงานตรวจวัดที่เป็นประจำได้ แม้จะใช้ตัวอย่างมากขึ้นเป็น 5 กรัม พบว่าจะไม่สามารถทำให้ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำลงได้

รูปที่ 2.3.5 แสดงโครมาโทแกรมของไอออนทั้งหมดที่ปรากฏในตัวอย่างที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าถั่วและแป้ง cinnamon roll ที่มีปริมาณกรดไขมันมากกว่าเมื่อเทียบกับ flaxseed และแป้งอื่นๆ พีกกรดไขมันปรากฏที่เวลา 1200 s ไม่รบกวนการวิเคราะห์และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเครื่องมือวิเคราะห์

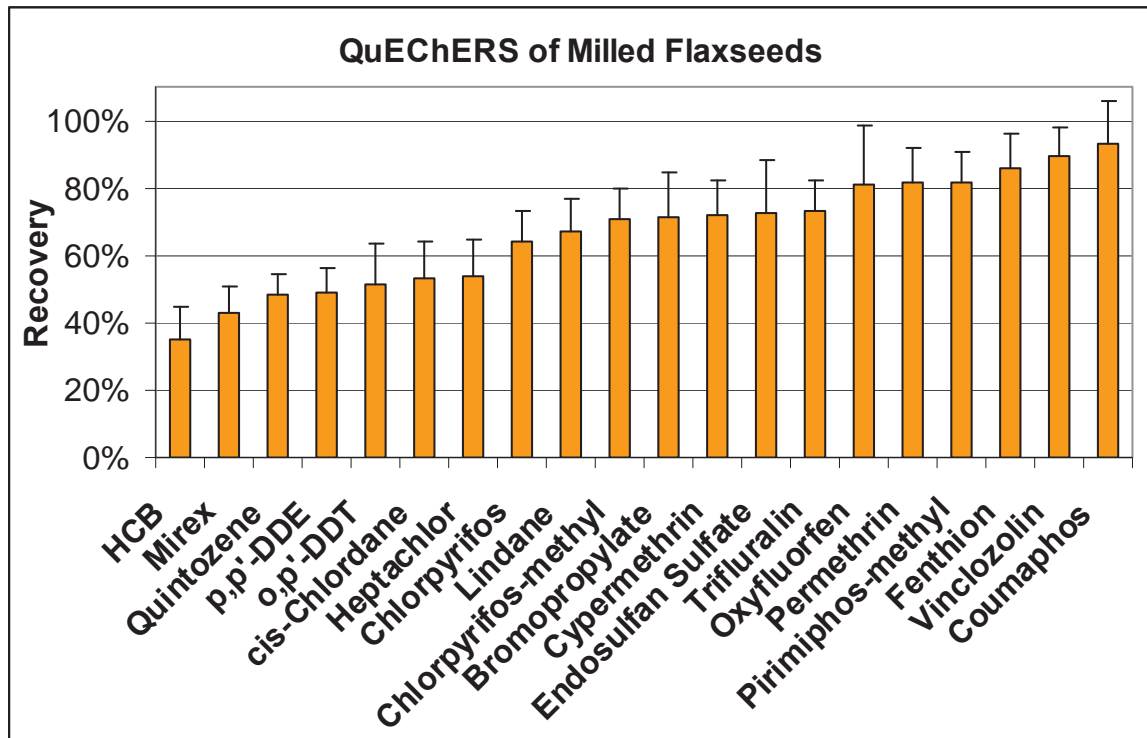
### 2.3.2.2.3 การทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

ในงานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบการทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ flaxseed ระหว่างห้องปฏิบัติการโดยมีห้องปฏิบัติการบริษัท General Mills เข้าร่วมใน

การศึกษาเปรียบเทียบ ศึกษาการตรวจวัดการตกค้างของสารกลุ่มยากำจัดศัตรูพืชทั้งหมด 180 ชนิด ครอบคลุมถึงสารที่ตรวจวัดได้ด้วย UPLC-MS/MS ที่มีการทวนสอบวิธีการในตัวอย่างธัญพืชประเภท ซีเรียล cereal grains [16] มาแล้ว การทดสอบนี้เติมสารกลุ่มที่ต้องการตรวจวัดลงไปในระดับต่ำสุด (Limit of detection, LOD) ลงไปในตัวอย่างเมล็ด flaxseed แบบล่งก์ ส่วนวัสดุที่ใช้ การเตรียมตัวอย่าง สภาวะการทดลอง การใช้สารมาตรฐานภายใน d5-atrazine การประมวลผลข้อมูล รวมถึงการควบคุม คุณภาพ ใช้วิธีการเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบธัญพืชเช่นเดียวกัน[16] เติมสารมาตรฐาน 3 ระดับ

**ตารางที่ 2.3.5:** ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารกำจัดศัตรูพืช 32 ชนิด ในเนื้อเมทริกซ์แปลงที่แตกต่างกัน และเติมสารมาตรฐานแต่ละชนิดลงไปในปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อกรัม ทำการทดลอง 3-8 ซ้ำ (ในการวิเคราะห์ใช้ปริมาณใช้สารเทียบมาตรฐานภายใน diazinon)

Pesticide	Peanut (with shell)		Flaxseeds (6 sets)		Doughs, 2.5 g (3 sets)		Doughs, 5 g (3 sets)	
	Mean	RSD	Mean	Avg RSD	Mean	Avg RSD	Mean	Avg RSD
Dichlorvos	112	13	113	10	99	6	105	3
Ethoprophos	106	4	114	4	103	4	114	4
Trifluralin	95	5	73	3	102	3	111	8
Hexachlorobenzene	47	4	35	2	66	4	52	2
Dimethoate	113	4	96	9	nd		nd	
Atrazine	101	5	114	6	102	6	115	4
Lindane	90	6	67	3	97	3	85	5
Quintozene	74	6	48	4	88	5	76	2
Chlorothalonil	22	1	nd		39	5	42	2
Vinclozolin	104	5	89	3	104	3	109	3
Chlorpyrifos methyl	96	5	71	4	99	3	104	4
Carbaryl	102	6	nd		nd		105	4
Heptachlor	65	2	54	4	84	5	50	8
Pririmphos-methyl	102	5	82	3	101	4	118	4
Malathion	113	4	106	5	103	4	117	4
Metolachlor	103	4	110	4	101	4	112	4
Fenthion	96	5	86	4	99	4	113	3
Chlorpyrifos	86	4	64	4	96	4	107	4
Tolylfluanid	29	1	nd		36	1	9	0
Folpet	nd		nd		nd		nd	
cis-Chlordane	73	6	53	4	85	3	87	6
p,p'-DDE	59	1	49	3	72	3	73	2
Oxyfluorfen	94	8	81	5	103	5	120	5
o,p'-DDT	59	4	51	4	75	3	73	3
Endosulfan sulfate	98	4	73	6	101	5	112	6
Bromopropylate	87	5	71	4	95	6	102	5
Mirex	36	1	43	3	48	2	39	2
Permethrin	80	5	81	6	92	12	88	4
Coumaphos	111	2	93	10	111	8	111	5
Cypermethrin	104	9	72	8	102	8	106	12
Deltamethrin	nd		nd		105	7	71	5
Azoxystrobin	103	7	145	22	107	5	122	13

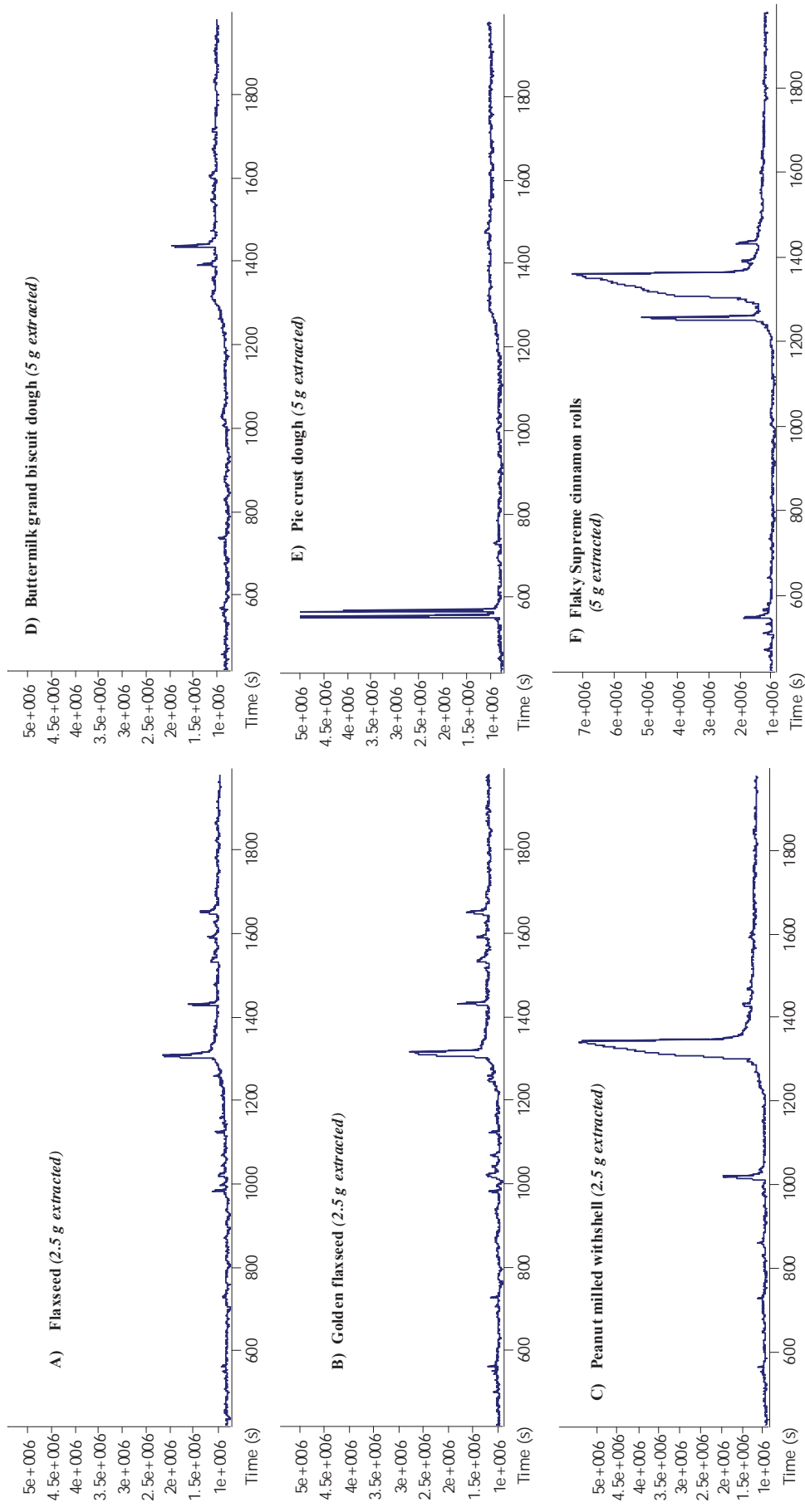


รูปที่ 2.3.4: ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองซ้ำ 6 วัน ของสารที่ตรวจวัด 20 ชนิด แสดงตามค่าการเพิ่มขึ้นของค่าร้อยละการคืนกลับ และเป็นไปตามค่าการลดลงของค่าการละลายในไขมัน ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างเมล็ด flaxseed ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด และสกัดด้วยวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

ความเข้มข้นลงในแต่ละชุดตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างจะอยู่ในช่วง 0.06 ถึง 0.40 ไมโครกรัมต่อกรัม

ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าขีดจำกัดการตรวจวัดแสดงในตารางที่ 2.3.6 เพื่อความง่ายจึงจะเลือกแสดงเฉพาะสาร 32 ชนิดที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-TOF เท่านั้น และผลที่ทำที่ห้องปฏิบัติการ General Mills สอดคล้องกับผลที่ทำที่ห้องปฏิบัติการ USDA แม้ว่าสารที่ละลายได้ดีในไขมันจะมีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ (~30-50% )แต่ GC-TOF สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับ 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัมหรือน้อยกว่า และสารบางชนิดที่แสดงสัญญาณตอบสนองต่ำและสามารถตรวจวัดได้ด้วย UPLC-MS/MS จะให้ค่าการเลือกและสภาพไวที่ดีขึ้นกว่าเดิม รวมถึงสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่มีปัญหาเช่น folpet, tolylfluanid, pyrethroids บางชนิด และ chlorothalonil กรณีสาร folpet ที่สลายตัวเป็น phthalimide จะตรวจวัดได้ง่ายและใช้สารนี้ในการระบุการตรวจพบสาร folpet แทนได้

รูปที่ 2.3.5: GC/TOF-MS total ion chromatograms ของ (A-B) flaxseeds, (C) peanut, and (D) biscuit และ (E) pie crust และ (F) cinnamon roll



ตารางที่ 2.3.6 ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับ (%recoveries) ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(%RSDs) และขีดจำกัดต่ำสุดการตรวจวัด(LODs)ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ General Mills แสดงเฉพาะสารกำจัดศัตรูพืช 32 ชนิด และใช้สารมาตรฐานภายใน d5-atrazine (IS) ใช้ตัวอย่าง flaxseed และเติมสารมาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น ทุกตัวอย่างทำสกัด 2 ซ้ำ (nd =not detectable)

Pesticide	0.40 µg/g		0.12 µg/g		0.06 µg/g		LOD (µg/g, extracted)
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	
Dichlorvos <sup>a</sup>	82	1	109	3	64	18	0.01
Ethoprophos	94	5	107	6	95	4	0.005
Trifluralin	74	8	58	8	47	26	0.005
Hexachlorobenzene	34	9	32	8	25	21	0.005
Dimethoate <sup>a</sup>	106	2	132	15	nd		0.06
Atrazine <sup>a</sup>	96	3	109	3	102	0	0.005
Lindane	65	16	58	2	70	23	0.03
Quintozene							
Chlorothalonil	nd		nd		nd		
Vinclozolin	80	8	80	5	76	4	0.005
Chlorpyrifos-methyl	71	13	65	11	56	1	0.005
Carbaryl <sup>a</sup>	111	13	111	23	nd		0.04
Heptachlor	48	5	54	4	53	2	0.005
Pirimiphos-methyl <sup>a</sup>	76	10	69	4	69	7	0.005
Malathion <sup>a</sup>	96	3	82	0	82	2	0.01
Metolachlor <sup>a</sup>	92	7	92	0	95	1	0.005
Fenthion	82	11	72	1	66	7	0.005
Chlorpyrifos <sup>a</sup>	61	3	54	11	55	4	0.01
Tolyfluanid <sup>a</sup>	nd		nd		nd		
Folpet <sup>b</sup>	nd		nd		nd		
cis-Chlordane	54	8	55	17	49	4	0.01
p,p'-DDE	52	15	43	22	52	12	0.005
Oxyfluorfen	71	10	56	7	42	21	0.01
o,p'-DDT	47	10	37	45	22	31	0.01
Endosulfan sulfate	65	24	nd		nd		
Bromopropylate	61	2	54	10	57	3	0.005
Mirex	41	10	35	35	24	10	0.005
Permethrin <sup>a</sup>	97	11	119	7	nd		0.1 <sup>c</sup>
Coumaphos <sup>a</sup>	79	31	nd		nd		
Cypermethrin	52	13	nd		nd		
Deltamethrin <sup>a</sup>	nd		nd		nd		
Azoxystrobin <sup>a</sup>	93	5	120	5	100	8	5

<sup>a</sup>Analyte is UPLC-MS/MS amenable.

<sup>b</sup>Phthalimide is the primary degradation product of folpet, and was qualitatively identified at all levels.

<sup>c</sup>LOD based on *trans* isomer only. *cis* isomer was not resolved due to matrix interference.

### 2.3.3 สรุปผลการทดลอง

วิธีการ QuEChERS สามารถนำมาขยายขอบข่ายให้ครอบคลุมการตรวจวัดสารที่มีปริมาณไขมันสูงได้ ให้ผลการตรวจวัดที่ดี ไม่ต้องใช้วิธีการ GPC ถึงแม้ว่าสารที่ต้องการตรวจวัดที่ละลายได้ดีในไขมันจะให้ค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ แต่ผลการวิเคราะห์มีความแน่นอนและสม่ำเสมอ ซึ่ดจำกัดต่ำสุดการตรวจวัดอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจสามารถใช้ในงานตรวจวัดที่ทำเป็นประจำได้เป็นอย่างดี มีความง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายต่ำ

### 2.3.4 เอกสารอ้างอิง

1. Oomah, B.D.; Sitter, L., Characteristics of flaxseed hull oil. *Food Chem.* **2009**,*114*, 623-628.
2. Popova, I.E.; Hall, C.; Kubátová, A., Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**,*1216*, 217-229.
3. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21, 2008, Nutrient Data Laboratory Home Page, [www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl](http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl)
4. Pizzutti, I.R.; de Kok, A.; Zanella, R.; Adaime, M.B.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O.D., Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **2007**,*1142*, 123-136.
5. Fernandez Moreno, J. L.; Arrebola Lieanas, F.J.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L., Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**,*1111*, 97-105.
6. Li, L.; Xu, Y.; Pan, C.; Zhou, Z.; Jiang, S.; Liu, F., Simplified Pesticide Multiresidue Analysis of Soybean Oil by Low-Temperature Cleanup and Dispersive Solid-Phase Extraction Coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.* **2007**, *90*, (5), 1387-1393.
7. Li, L.; Zhang, H.; Pan, C.; Zhou, Z.; Jiang, S.; Liu, F., Multiresidue analytical method of pesticides in peanut oil using low-temperature cleanup and dispersive solid phase extraction by GC-MS. *J. Sep. Sci.* **2007**,*30*, 2097-2104.

8. Lentza-Rizos, C.; Avramides, E.J.; Visi, E., Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **2001**,*921*, 297-304.
9. Amvrazi, E. G.; Albanis, T.A., Multiclass Pesticide Determination in Olives and Their Processing Factors in Olive Oil: Comparison of Different Olive Oil Extraction Systems. *J. Agric. Food Chem* **2008**,*56*, 5700–5709.
10. Papadakis, E. N.; Vryzas, Z.; Papadopoulou-Mourkidou, E., Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave-assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**,*1127*, 6-11.
11. Blasco, C.; Font, G.; Pico, Y., Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**,*1028*, 267-276.
12. Lehotay, S. J.; Maštovská, K.; Yun, S. J., Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *J. AOAC Int.* **2005**,*88*, 630-638.
13. López-Feriaa, S.; Cárdenasb, S.; Valcárcel, M., One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic–mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *J. Chromatogr. A* **2009**, Article in press.
14. Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J., 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.* **2003**,*86*, 412-231.
15. Lehotay, S.J., Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* **2007**, *90*, 485-520.
16. Mastovska, K.; Dorweiler, K.; Lehotay, S.J.; Wegscheid, J.; Szpylka, K., Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. *J. Agric. Food Chem.*, submitted.
17. Cunha, S.C.; Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Fernandes, J.O.; Oliveira, B.M.P.P., Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *J. Sep. Sci.* **2007**,*30*, 620-632.
18. European Committee for Standardization (CEN) standard method EN 15662, 2008. ([www.cen.eu](http://www.cen.eu) and [www.quechers.com](http://www.quechers.com))

19. Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A., Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.***2007**, 389, 1697-1714.
20. Hoh, E.; Lehotay, S.J.; Pangallo, K.C.; Mastovska, K.; Ngo, H.L.; Reddy, C.M.; Vetter, W., Simultaneous Quantitation of Multiple Classes of Organohalogen Compounds in Fish Oils with Direct Sample Introduction-Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography and Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2653-2660 (2009).
21. Food and Drug Administration, *Pesticide Analytical Manual Volume I: Multiresidue Methods, 3rd Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, 1999. [www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html](http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html)
22. Erney, D.R.; Gillespie, A.M.; Gilvydis, D.M.; Poole, C.F., Explanation of the matrix-induced chromatographic enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr.***1993**, 638, 57-63.
23. Hajslová, J.; Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *J. Chromatogr. A***2003**, 1000, 181-197.
24. Schenck, F.J.; Lehotay, S.J., Does Further Clean-Up Reduce the Matrix Enhancement Effect in GC Analysis of Pesticide Residues in Food? *J. Chromatogr. A***2000**, 868, 51-61.
25. Mastovska, K.; Lehotay, S.J., Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1040, 259-272.

## 2.4 โครงการย่อย 1.3: การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิดอย่างรวดเร็วโดยการสกัดแบบ QuEChERS และตรวจวัดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อคู่กับระบบแมสสเปกโทรเมทรีชนิดไทม์ออฟไฟท์ แบบความดันต่ำ

สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการเกษตรนั้นมีอยู่เป็นจำนวนมาก โอกาสการปนเปื้อนในอาหารที่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความปลอดภัยของผู้บริโภคได้กำหนดค่าขีดจำกัดสูงสุดของการยอมรับการปนเปื้อนหรือที่เรียกว่าค่า MRL “Maximum residue limits” ขึ้นในพืชผลการเกษตรหลากหลายชนิด [1-2] แต่การกำหนดค่าเหล่านี้ หมายความว่า ห้องปฏิบัติการต้องมีความสามารถในการตรวจวัดสารทุกประเภทตามที่มีข้อกำหนดเพื่อให้สอดคล้องในทางปฏิบัติ การตรวจวัดสารหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสารนั้นๆ มีสมบัติที่แตกต่างกันนับเป็นงานยาก ห้องปฏิบัติการทุกแห่งจึงต้องการได้วิธีการที่ง่ายสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ปลอดภัยต่อผู้วิเคราะห์ และสภาพแวดล้อมรวมถึงพร้อมต่อการรับมือกับตัวอย่างปริมาณมากได้

ปัจจุบันการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชในอาหาร วิธีการหลักที่นิยมใช้กันมากคือเทคนิค QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) [3-16] ซึ่งมีขั้นตอนและวิธีแตกต่างกันไปบ้าง ได้แก่ วิธีการดั้งเดิมที่ไม่ใช้สารบัฟเฟอร์ [4] วิธีการที่มีการตรวจสอบความใช้ได้ระหว่างห้องปฏิบัติการนานาชาติที่ใช้บัฟเฟอร์ชนิดอะซิเตท (AOAC Official method 2007.01) [5,6] หรือใช้บัฟเฟอร์ชนิดซิเตรท (CEN Standard method EN 15662) [7,8] นอกจากนี้ยังมีการดัดแปรวิธี QuEChERS ออกไปมากมายให้เหมาะกับการใช้งานที่แตกต่างกัน และแพร่หลายไปทั่วโลก ปัจจุบันในเชิงการค้ามีบริษัทมากกว่าสิบแห่งที่วางตลาดผลิตภัณฑ์พร้อมใช้สำหรับเทคนิค QuEChERS ในรูปของหลอดบรรจุสารสำเร็จรูปตามหลักการกระจายวัฏภาคของแข็งในสารละลาย (dispersive solid-phase extraction, d-SPE) และการสกัดแยกในส่วนปลายปิเปต (disposable pipette extraction, DPX) [17, 18]

เทคนิค QuEChER โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายอะซิโทไนไตรล์ (MeCN) ในการสกัดสารตัวอย่าง 10-15 กรัม อาศัยเทคนิคการเข้าแทนที่ของเกลือในน้ำจากตัวอย่าง โดยใช้เกลือแมกนีเซียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (anhydrous magnesium sulphate, anh MgSO<sub>4</sub>) เกลือโซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับบัฟเฟอร์อื่นๆ จากนั้นจะทำความสะอาดสารละลายสกัดโดยใช้เทคนิคการกระจายวัฏภาคของแข็งในสารสกัด โดยใช้เกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ปราศจากน้ำ, สารปฐมภูมิและทุติยภูมิของเอมีน (primary secondary amine, PSA) หรือใช้ C-18, ถ่านดำกราฟิไทต์คาร์บอน (graphitized carbon black, GCB) การเลือกใช้สารหรือวัสดุของแข็งชนิดใดๆ ในกระบวนการ QuEChERS นั้นอาจเลือกแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการตรวจวัด เนื้อเมทริกซ์ เครื่องมือวิเคราะห์ หรือสมรรถนะที่ต้องการ มีงานวิจัยการเปรียบเทียบการเลือกใช้สารชนิดต่างๆ และระบุวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมกับผัก ผลไม้ เพื่อการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ตกค้างได้แก่การเลือกใช้ 150

มิลลิกรัมของ  $MgSO_4$  + 50 มิลลิกรัม PSA + 50 มิลลิกรัม C18 + 7.5 มิลลิกรัม GCB ต่อ มิลลิลิตร ของสารละลายสกัด [9]

ในด้าน การตรวจวัด ปัจจุบันวิธีการ Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) สามารถตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่เหมาะสมกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีได้อย่างรวดเร็วมากเมื่อเทียบกับเทคนิค LC แบบเดิม มีรายงานการใช้เทคนิค UHPLC-MS/MS ในการตรวจวัดสารละลายที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS ตรวจวัดสารปนเปื้อนกลุ่มนี้ได้ในระดับต่ำมาก ตรวจวัดสารได้มากกว่า 100 ชนิด ในเวลาน้อยกว่า 10 นาที [19-21] และเทคนิคการสกัดแบบ QuEChERS นั้นมีความเหมาะสมต่อการนำไปตรวจวัดทั้งทางด้าน LC (liquid chromatography) และ GC (gas chromatography) ดังนั้นสารที่ผ่านการสกัดในครั้งเดียวสามารถแบ่งออกเพื่อนำไปตรวจวัดทาง GC สำหรับสารที่เหมาะสมกับการตรวจด้วยเทคนิค GC และ LC สำหรับกลุ่มที่เหมาะสมกับการตรวจด้วยเทคนิค LC แม้ว่าห้องปฏิบัติการสามารถใช้เทคนิค UHPLC-MS/MS ตรวจวัดสารกลุ่มที่เหมาะสมได้ภายใน 10 นาที แต่สำหรับสารกลุ่มที่ต้องตรวจด้วยเทคนิค GC ด้วยเครื่อง GC-MS นั้น ยังคงใช้เวลานานราว 25-45 นาที ดังนั้นการตรวจวัดให้ครอบคลุมสารทุกกลุ่มยังคงต้องใช้เวลาในการตรวจวัดนานมาก

แนวทางในการเพิ่มความเร็วการตรวจวัดด้วยเทคนิค GC-MS นั้นมีผู้สรุปไว้ในบทความวิจัยเช่นกัน [22] เช่นการใช้เทคนิค GC-MS โดยใช้ super molecular beam สามารถเร่งอัตราการไหลของแก๊สได้ถึง 90 มิลลิลิตรต่อนาที โดยไม่สูญเสียสภาพโวลการตรวจวัด วิเคราะห์ได้รวดเร็ว [23, 24] แต่ยังไม่สามารถนำไปใช้ได้อย่างแพร่หลาย อีกทางเลือกหนึ่งคือการใช้เทคนิคความดันต่ำ low pressure-GC-MS บางครั้งเรียก Rapid-MS , sub-ambient หรือ vacuum outlet GC-MS จะช่วยเพิ่มความจุตัวอย่าง ความทนและสภาพโวล รวมถึงลดการสลายตัวของสารตัวอย่าง ลดความกว้างของฐานพีค ใช้งานง่าย สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชต่างกลุ่มที่เหมาะสมกับเทคนิค GC ได้ [22, 25-33] วิธีการนี้อาจทำให้สูญเสียประสิทธิภาพด้านการแยก เพราะสารที่เข้ามามีความเร็วสูง แต่อาจแก้ไขได้ด้วยการใช้ประสิทธิภาพความเฉพาเจาะจงของการตรวจวัดเข้ามาช่วย

โดยทั่วไปการใช้ LP-GC/MS จะใช้คอลัมน์สั้นและเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก (3m x 0.15 mm i.d. หรือ 0.1 m x 0.1 mm i.d.) ที่ไม่มีสารเคลือบอยู่ภายในต่อเข้าที่ตำแหน่งทางเข้าสารตัวอย่าง และต่อปลายเข้ากับคอลัมน์วิเคราะห์ที่มีความยาวสั้นและเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ (10m x 0.53 mm i.d. x 1  $\mu$ m film thickness) คอลัมน์นี้จะอยู่ในภาวะสุญญากาศโดยระบบปั๊มของแมสสเปกโตรเมตรี ทำให้แก๊สฮีเลียมมีความความหนืดต่ำและไหลเร็วเท่ากับแก๊สไฮโดรเจน วิธีการนี้ไม่ต้องการเปลี่ยนแปลงเครื่องมือแต่อย่างใด และระบบ GC-MC ทั่วไปสามารถดัดแปรมาให้ใช้กับ LC-GC/MS ได้ และคอลัมน์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวดำเนินการไหลยังทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันคอลัมน์ด้วย และพบว่าการใช้คอลัมน์ที่ยาวและมีขนาดใหญ่จะทำให้การใช้งานดีขึ้น [26, 27]

ประโยชน์และความหลากหลายของการนำเทคนิค LP-GC/MS มาใช้นั้นเป็นไปอย่างกว้างขวาง [25-33] แต่ยังไม่มีการนำไปใช้ในงานตรวจวัดที่ทำเป็นประจำ น่าจะเป็นเพราะเทคนิคนี้มีการจดลิขสิทธิ์แต่พบว่าไม่มีการต่อลิขสิทธิ์ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นโอกาสของการขยายวิธีการนี้ลงสู่งานประเภทอื่นๆ ได้ อีกประการหนึ่งคือก่อนหน้าที่จะมีการใช้เทคนิค UHPLC ความเร็วของการตรวจวัด GC และ LC ไม่ได้แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อมีเทคนิค UHPLC เข้ามา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดทาง GC ให้เร็วเทียบเท่ากับ UHPLC

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาการตรวจวัด เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค LP-GC/TOFMS โดยความคาดหวังของวิธีการเพื่อการตรวจวัดสารกลุ่มสารกำจัดศัตรูพืชที่ต้องใช้วิธีการทาง GC 150 ชนิดที่สามารถใช้นักวิเคราะห์ 2 คน ทำงานรองรับตัวอย่าง 32 ตัวอย่าง ให้เสร็จสิ้นในเวลา 9 ชั่วโมงได้ โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างนั้นจะทำการเปรียบเทียบทั้งการใช้บัพเฟอร์และไม่ใช้บัพเฟอร์ในการสกัดสารด้วยเทคนิค QuEChERS ทั้ง d-SPE และ DPX ในขั้นตอนการทำ ความสะอาดสารละลายสกัดใช้ 150 มิลลิกรัมของ MgSO<sub>4</sub> + 50 มิลลิกรัมของ PSA + 50 มิลลิกรัม C18 + 75 มิลลิกรัม GCB ต่อมิลลิลิตรของสารละลายสกัด เพื่อหาจุดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด งานนี้จะเน้นงานทางด้าน การวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่านั้น ส่วนงานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพนั้นจะได้นำเสนอในงานวิจัยถัดไป [35]

#### 2.4.1 การทดลอง

##### 2.4.1.1 สารเคมีและอุปกรณ์

สารที่ต้องการตรวจวัดในงานวิจัยนี้จำนวน 150 ชนิด แสดงในตารางที่ 2.4.1 สารมาตรฐานทุกชนิดมีความบริสุทธิ์  $\geq 95\%$  (ส่วนใหญ่  $> 99\%$ ) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Environmental Protection Agency's National Pesticide Repository (Fort Meade, MD, USA), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) และ บริษัท Chemservice (West Chester, P.S., USA) สารชนิด ไอโซโทปที่ใช้เป็นสารเทียบมาตรฐานภายใน (Isotopically-labeled internal standards, IS) ได้แก่ atrazine-*d*<sub>5</sub> (ethyl-*d*<sub>5</sub>) และ fenthion-*d*<sub>6</sub> (o,o-dimethyl-*d*<sub>6</sub>) เป็นผลิตภัณฑ์ของ C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Quebec; Canada) สารที่ใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพใช้เติมในขั้นตอนสุดท้ายของสารทุกชนิดทั้งสารสกัด แบลงก์ และสารละลายเทียบมาตรฐาน คือ Triphenylphosphate (TPP), Acetonitrile (MeCN) และ ethyl acetate (EtOAc) ใช้ HPLC-grade ของบริษัท J.T. Baker (Phillipsburg, NJ; USA), toluene ของบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; USA) Glacial acetic acid (HOAc) ใช้เกรดเพื่อการวิเคราะห์ของบริษัท J.T. Baker ในการทดลองตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการเลือกใช้เมทริกซ์มะเขือเทศ (tomato) สตอเบอรี่ (strawberry) มันฝรั่ง (potato) ส้ม (orange) และ mixed lettuces ซึ่งจากห้างสรรพสินค้าที่กำหนดผลิตภัณฑ์เกษตรอินทรีย์

ตารางที่ 2.4.1 LP-GC/TOFMS retention times ( $t_R$ ), MS ions ( $m/z$ ), average regression values in matrix and matrix effects (%ME) (typical n = 20), and average overall %recoveries and %RSD (typical n = 270), for the pesticide analytes. Average  $R^2 < 0.990$ , average %ME  $> \pm 20$ , recovery  $< 70\%$ , and RSD  $> 20\%$  are noted in bold text.

Pesticide	$t_R$ (s)	Quant. Ion	Qual. Ions	Avg $R^2$	Avg $\pm$ SD %ME	Overall %Rec.	Overall %RSD
mevinphos	134.0	127	192, 224	<b>0.984</b>	<b>-30 <math>\pm</math> 34</b>	106	17
propham	138.0	179	119, 137	0.991	-10 $\pm$ 24	101	17
methacrifos	142.6	208	180, 240	0.998	-11 $\pm$ 28	102	10
phthalimide	144.5	147	104	<b>0.973</b>	<b>125 <math>\pm</math> 145</b>	89	<b>26</b>
o-phenylphenol	147.9	170	115, 141	0.999	-1 $\pm$ 16	97	9
heptenophos	153.4	250	124, 126	0.998	-3 $\pm$ 36	104	9
tecnazene	157.6	261	203, 259	0.999	7 $\pm$ 16	91	9
propoxur	158.6	110	152	0.997	7 $\pm$ 25	105	9
propachlor	159.0	176	120, 211	0.998	-7 $\pm$ 28	103	9
demeton-S-methyl	161.4	142	109, 142	0.999	1 $\pm$ 25	102	12
diphenylamine	161.4	169	168	0.994	1 $\pm$ 14	92	14
ethoprophos	162.0	242	158, 200	0.995	0 $\pm$ 19	101	10
ethalfluralin	162.3	333	276, 316	0.998	-3 $\pm$ 13	100	11
trifluralin	164.0	306	264, 335	0.999	-2 $\pm$ 13	99	6
chlorpropham	164.9	213	171, 215	0.993	<b>24 <math>\pm</math> 19</b>	100	9
dicrotophos	168.4	127	193, 237	0.995	-7 $\pm$ 20	93	11
cadusafos	168.9	159	213, 270	0.999	-3 $\pm$ 14	98	7
phorate	170.3	260	121, 231	0.999	0 $\pm$ 12	100	8
$\alpha$ -BHC	173.0	219	217, 181	0.998	2 $\pm$ 18	99	9
hexachlorobenzene	174.3	284	249, 286	<b>0.983</b>	-2 $\pm$ 11	<b>54</b>	<b>21</b>
pentachloroanisole	175.3	265	267, 280	0.997	3 $\pm$ 12	81	10
ethoxyquin	176.0	202	174, 217	0.993	2 $\pm$ 20	<b>64</b>	<b>61</b>
carbofuran	177.6	164	131, 149	0.998	17 $\pm$ 44	109	12
dicloran	178.1	176	178, 206	<b>0.970</b>	<b>27 <math>\pm</math> 33</b>	88	13
simazine	178.4	186	173, 201	0.998	-4 $\pm$ 22	95	7
atrazine- $d_5$ (IS)	178.8	220	222, 205	n/a	n/a	n/a	n/a
atrazine	179.0	200	202, 215	0.997	-7 $\pm$ 16	100	8
terbuthylazine	179.4	214	216, 229	<b>0.954</b>	-9 $\pm$ 25	96	9
propazine	179.6	229	231, 187	0.999	-8 $\pm$ 17	101	7
propetamphos	181.0	194	222, 236	<b>0.988</b>	4 $\pm$ 16	101	8

quintozene (PCNB)	181.6	295	249, 297	0.993	6 ± 14	82	11
$\beta$ -BHC <sup>a</sup>	181.7	219	217, 181	<b>0.974</b>	-3 ± 15	103	11
terbufos	181.9	231	153, 288	<b>0.962</b>	3 ± 16	100	8
lindane ( $\gamma$ -BHC) <sup>a</sup>	182.2	219	217, 181	<b>0.974</b>	-3 ± 15	103	11
dimethoate	182.8	229	143, 229	<b>nd</b>	nd	nd	nd
diazinon	182.9	304	179, 276	<b>0.989</b>	3 ± 15	100	8
cyanophos	183.2	243	109, 125	<b>0.975</b>	4 ± 21	105	9
propyzamide	183.6	255	173, 257	0.995	8 ± 14	102	8
fonofos	184.2	246	109, 137	0.990	1 ± 11	99	8
pyrimethanil	185.7	198	199	0.997	7 ± 11	<b>67</b>	<b>33</b>
disulfoton	189.0	274	153, 186	0.999	3 ± 13	98	9
chlorothalonil	189.1	266	229, 268	<b>0.971</b>	-2 ± 29	78	<b>72</b>
$\delta$ -BHC	191.6	219	217, 181	0.997	-16 ± 57	104	12
dichlofenthion	195.4	279	251, 281	0.999	7 ± 13	96	8
phosphamidon	196.7	127	138, 264	<b>0.979</b>	-3 ± 26	109	17
chlorpyrifos-methyl	197.8	286	288, 321	0.997	5 ± 16	96	8
vinclozolin	198.9	212	214, 285	0.999	10 ± 12	100	7
alachlor	200.0	160	188, 237	0.994	-1 ± 16	101	9
tolclofos-methyl	201.0	265	250, 267	<b>0.977</b>	0 ± 16	100	8
metribuzin	201.4	198	144, 214	<b>nd</b>	nd	nd	nd
methyl parathion	201.5	125	109, 263	<b>0.988</b>	18 ± 13	102	10
heptachlor	202.7	372	272, 274	0.998	1 ± 16	96	9
fenchlorphos	203.3	285	167, 287	0.992	7 ± 16	94	8
metalaxyl	203.6	206	220, 249	0.997	16 ± 20	100	12
carbaryl	204.3	144	115	<b>0.976</b>	<b>81 ± 61</b>	104	11
pirimiphos-methyl	205.3	290	276, 305	0.997	3 ± 17	98	7
fenitrothion	207.4	277	247, 260	0.995	12 ± 29	102	9
methiocarb	208.3	168	109, 153	0.993	<b>51 ± 61</b>	100	15
malathion	208.9	173	127, 158	0.998	10 ± 27	102	7
pentachlorothioanisole	210.2	296	263, 298	0.998	-2 ± 12	<b>54</b>	<b>25</b>
chlorpyrifos	211.4	314	197, 316	0.998	-9 ± 18	92	9
metolachlor	211.7	162	238, 240	0.994	-17 ± 23	101	10
fenthion- <i>d</i> <sub>6</sub> (IS)	212.2	284	115, 131	n/a	n/a	n/a	n/a
fenthion	212.8	278	153, 169	0.996	-11 ± 22	99	10
demeton-S-methylsulfone	213.2	169	109, 142	<b>0.986</b>	<b>-32 ± 25</b>	98	16
aldrin	213.5	263	265, 329	0.995	-17 ± 27	94	15
parathion	214.1	291	155, 186	0.997	-6 ± 25	97	8
triadimefon	215.1	208	181, 210	0.999	-1 ± 21	100	8

fensulfothion	215.4	292	156, 308	0.999	<b>25 ± 25</b>	104	11
tetraconazole	216.2	336	171, 338	0.992	5 ± 16	101	8
pirimiphos-ethyl	216.3	304	318, 333	0.993	-2 ± 17	97	7
dichlorobenzophenone	216.6	250	139, 252	0.999	3 ± 16	89	11
bromophos	217.9	331	329, 333	0.998	2 ± 19	91	10
pendimethalin	221.3	281	169, 252	<b>0.951</b>	-4 ± 24	92	9
cyprodinil	222.6	224	225	0.997	5 ± 14	<b>59</b>	<b>43</b>
isofenphos	223.6	213	185, 255	<b>0.983</b>	-2 ± 18	102	9
chlorfenvinphos	224.6	267	269, 323	0.998	6 ± 25	103	9
heptachlor epoxide	225.2	353	355, 390	0.997	-5 ± 17	99	9
penconazole	226.1	248	159, 250	0.997	-1 ± 29	97	9
fipronil	227.9	367	351, 369	0.994	15 ± 29	105	10
procymidone	228.3	283	255, 285	0.999	4 ± 17	101	7
captan	229.4	151	149	<b>nd</b>	nd	nd	nd
bromophos-ethyl	230.2	359	303, 357	0.997	8 ± 16	85	13
folpet	231.1	260	262, 297	<b>nd</b>	nd	nd	nd
<i>o,p'</i> -DDE	231.9	246	248, 318	<b>0.978</b>	6 ± 14	94	10
<i>trans</i> -chlordane	232.5	373	375, 410	<b>0.989</b>	4 ± 16	95	9
methidathion	233.2	145	125	0.999	<b>23 ± 52</b>	105	10
tetrachlorvinphos	233.4	329	240, 331	0.997	<b>27 ± 68</b>	102	10
chinomethionat	234.7	234	174, 206	0.996	4 ± 28	<b>36</b>	<b>44</b>
<i>cis</i> -chlordane	235.6	373	375, 410	0.995	-11 ± 15	97	15
$\alpha$ -endosulfan	236.2	170	195, 339	0.994	-19 ± 19	102	<b>21</b>
<i>trans</i> -nonachlor	237.5	409	407, 444	<b>0.989</b>	-12 ± 19	99	20
disulfoton sulfone	237.9	213	125, 153	<b>0.975</b>	<b>40 ± 39</b>	106	12
fenamiphos	239.4	288	217, 303	0.997	17 ± 30	98	9
profenofos	240.9	374	337, 339	0.998	11 ± 44	99	16
<i>p,p'</i> -DDE	241.1	246	248, 318	<b>0.986</b>	-11 ± 19	94	18
oxyfluorfen	242.2	252	361, 363	0.998	3 ± 22	101	13
buprofezin	242.9	305	172, 190	<b>0.982</b>	16 ± 17	99	13
kresoxim-methyl	243.6	116	131, 206	0.993	-6 ± 22	106	20
bupirimate	243.8	273	208, 316	0.992	1 ± 20	101	9
dieldrin	244.1	263	265, 380	0.990	-4 ± 19	99	13
<i>o,p'</i> -DDD	244.4	235	237, 320	<b>0.969</b>	-3 ± 20	98	13
myclobutanil	245.9	179		0.992	14 ± 22	103	11
endrin	250.1	317	319, 345	0.999	-5 ± 18	100	11
ethion	252.2	384	153, 384	0.995	10 ± 20	102	8
<i>p,p'</i> -DDD <sup>b</sup>	253.1	235	237, 320	<b>0.957</b>	8 ± 19	97	9

o,p'-DDT <sup>b</sup>	253.4	235	237, 354	<b>0.957</b>	8 ± 19	97	9
β-endosulfan	254.4	265	195, 339	0.994	3 ± 25	99	12
cis-nonachlor	254.6	409	407, 444	0.994	2 ± 17	95	9
fenthion sulfone	255.9	310	125, 136	0.999	<b>33 ± 22</b>	104	20
sulprofos	256.8	322	156, 280	0.999	9 ± 13	95	8
oxadixyl	258.3	163	132, 233	nd	nd	nd	nd
triazophos	258.5	257	161, 313	0.999	<b>23 ± 35</b>	101	11
carfentrazone ethyl	258.9	330	333, 411	0.999	10 ± 20	102	9
kepone (chlordecone)	259.7	272	274, 355	0.995	3 ± 114	nd	nd
carbophenothion	259.9	342	157, 344	0.999	12 ± 22	96	8
famphur	261.1	218	125	0.996	13 ± 57	104	15
propiconazole	261.7	259	173, 261	0.998	11 ± 15	96	10
p,p'-DDT	262.6	235	237, 354	0.995	8 ± 23	94	19
endosulfan sulfate	264.3	387	272, 389	0.997	-3 ± 40	105	13
propargite	265.7	135	231, 350	0.997	3 ± 19	101	8
piperonyl butoxide	266.3	176	149, 338	0.998	10 ± 12	96	9
resmethrin	266.8	123	143, 171	0.994	6 ± 13	89	16
TPP (QC)	268.0	326	215, 233	n/a	n/a	n/a	n/a
tebuconazole	268.8	250	163, 252	0.996	<b>28 ± 21</b>	96	14
captafol	271.0	151		<b>nd</b>	nd	nd	nd
bifenthrin	272.4	181	165, 166	0.997	8 ± 13	91	9
iprodione	274.0	314	186, 316	0.999	<b>55 ± 51</b>	99	<b>24</b>
bromopropylate	275.0	341	183, 339	0.995	10 ± 13	99	9
EPN	275.4	157	169, 323	0.999	13 ± 21	96	10
fenpropathrin	275.9	265	181, 349	0.998	10 ± 14	99	9
methoxychlor	276.2	227	-	0.993	-4 ± 17	103	16
endrin ketone	276.9	317	315, 345	0.996	-4 ± 18	101	14
phosmet	277.4	160	317	0.994	<b>82 ± 127</b>	99	<b>24</b>
fenoxycarb	277.9	255	116, 186	0.995	20 ± 41	100	11
tetradifon	283.3	356	354, 229	0.998	12 ± 14	95	9
leptophos	284.6	377	171, 375	0.998	16 ± 23	<b>65</b>	<b>32</b>
phosalone	285.8	367	182, 184	0.996	<b>32 ± 46</b>	96	14
λ-cyhalothrin	286.7	181	197, 208	0.998	15 ± 19	101	10
azinphos-methyl	288.0	160	132	<b>nd</b>	nd	nd	nd
mirex	291.7	272	274, 404	0.997	2 ± 15	80	16
fenarimol	295.1	251	253, 330	0.995	19 ± 15	98	12
azinphos-ethyl	296.7	132	160	0.992	<b>32 ± 49</b>	93	16
cis-permethrin	301.3	183	163, 185	0.998	15 ± 12	91	10
trans-permethrin	303.7	183	163, 185	0.998	17 ± 27	93	10

dioxathion	307.3	271	125, 153	0.995	<b>46 ± 44</b>	99	15
coumaphos	307.4	362	226, 364	0.992	<b>76 ± 95</b>	74	<b>37</b>
cyfluthrin	312	206	199, 227	0.994	<b>25 ± 26</b>	96	14
cypermethrin	322	163	165, 181	0.994	<b>33 ± 28</b>	90	18
flucythrinate	326	199	157, 207	0.992	19 ± 23	104	16
fenvalerate	345.1	167	169, 419	<b>0.989</b>	<b>30 ± 26</b>	99	15
fluvalinate	348.8	250	181, 252	<b>0.982</b>	<b>24 ± 31</b>	99	13
esfenvalerate	351.5	167	169, 252	<b>0.987</b>	16 ± 23	96	12
deltamethrin	371.3	253	181, 251	<b>0.978</b>	<b>35 ± 43</b>	91	13

#### 2.4.1.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานตั้งต้นของสารกำจัดศัตรูพืชทุกชนิด สารมาตรฐานภายใน และสารควบคุมคุณภาพ เตรียมที่ความเข้มข้น 4000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรในตัวทำละลายโทลูอีน หรือ เอทิลอะซีเตท เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ  $-18^{\circ}\text{C}$  สารละลายที่ใช้เทียบมาตรฐานเป็นสารผสมทั้ง 150 ชนิด อยู่ในตัวทำละลายอะซีโทไนโตรล์ที่มี 0.1% HOAc มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้เติมในเมทริกซ์แบลงก์ นำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1.25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรโดยใช้ตัวทำละลายอะซีโทไนโตรล์ที่มี 0.1% HOAc และสารละลายผสมของสารมาตรฐานภายในความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและสารละลายควบคุมคุณภาพ TPP 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเตรียมในตัวทำละลายอะซีโทไนโตรล์ที่มี 0.1% HOAc เช่นเดียวกัน

การเตรียมสารละลายเทียบมาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 0.25, 1, 4 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรของสารที่ตรวจวัดทั้ง 150 ชนิด รวมกับ สารมาตรฐานภายใน 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเตรียมในตัวทำละลายอะซีโทไนโตรล์ที่มี 0.1% HOAc สารละลายนี้ใช้เตรียมกราฟเทียบมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 10, 25, 100, 400, และ 1000 นาโนกรัมต่อกรัม ของสารที่ตรวจวัดและ 200 นาโนกรัมต่อกรัมของสารเทียบมาตรฐานภายใน เตรียมโดยเติม 50 ไมโครลิตรของสารละลายเหล่านั้น ลงใน 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายสกัดแบลงก์ในกรณีสารละลายมาตรฐานเนื้อเดียวกับเนื้อเมทริกซ์ หรือใช้ 0.5 มิลลิลิตรของ MeCN ในกรณีสารมาตรฐานในตัวทำละลาย การเติมกรดใน MeCN และการใช้ขวดแก้วสีชาพบว่าช่วยลดการสลายตัวของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่ไวต่อความเป็นเบสได้ [36]

#### 2.4.1.3 วิธีเตรียมตัวอย่าง

ทำการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัด 2 วิธีการคือวิธีดั้งเดิม และวิธีมาตรฐานของ AOAC official method 2007.01 ส่วนขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างเปรียบเทียบ 2 วิธีการระหว่างการใช้ d-SPE และ DPX กรณี d-SP จะทำในหลอดเซนตริฟิวส์ ส่วน DPX จะทำในปลายปิ

เปตที่มีแผ่นโลหะความพรุน 2 ไมครอนกันที่ส่วนปลาย ใช้ฟองอากาศในการผสมสารดูดจับกับสารละลายสกัด

ตัวอย่างพืชผัก ผลไม้ จะผ่านการหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เก็บแช่แข็งจนแข็ง จากนั้นปั่นละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น chopper ขนาด 2 ลิตร (Robotcoupe, Jackson, MS, USA) และใส่น้ำแข็งแห้งเพื่อช่วยในการปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียว ก่อนเก็บแช่แข็งและปล่อยให้ละลายก่อนนำมาทำการสกัด

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทำดังนี้คือ

1. ชั่งสารตัวอย่าง 15 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ชนิดโพลีโพรพีลีนขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติม 300 ไมโครลิตร ของสารมาตรฐาน และ 150 ไมโครลิตรของสารเทียบมาตรฐานภายในผสมด้วยระบบ vortex 1 นาที
3. เติม 15 มิลลิลิตรของ MeCN (สำหรับระบบที่ไม่ใช้บัฟเฟอร์) และ 15 มิลลิลิตรของ 1% HOAc ใน MeCN (สำหรับระบบบัฟเฟอร์) ลงในตัวอย่าง เขย่าแรงๆ ด้วยมือประมาณ 30 วินาที
4. เทตัวอย่างและสารสกัดลงในหลอดที่บรรจุ 6 กรัมของ anh. MgSO<sub>4</sub> และ 1.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (ไม่ใช้บัฟเฟอร์) และ หลอดที่บรรจุ 6 กรัมของ anh. MgSO<sub>4</sub> และ 1.5 กรัมของ anh NaOAc (บัฟเฟอร์)
5. เขย่าหลอดแรงๆ 1 นาที ระวังอย่าให้ MgSO<sub>4</sub> เกาะกันเป็นก้อน
6. นำหลอดไปเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 3000 rcf ใช้เวลา 2 นาที
7. ถ่ายสารละลายชั้นบน MeCN 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาดเล็กที่บรรจุ d-SPE 150 มิลลิกรัม ของ anh MgSO<sub>4</sub>, 50 มิลลิกรัม PSA, 50 มิลลิกรัม C18, และ 7.5 มิลลิกรัม GCB
8. vortex หลอด d-SPE ประมาณ 30 วินาที และ เซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 3000 rcf ใช้เวลา 2 นาที
9. ถ่ายสารละลายสกัดสุดท้ายนี้ 0.5 มิลลิลิตรใส่ขวดฉีดตัวอย่างขนาดเล็ก
10. เติม 50 ไมโครลิตรของสารควบคุมคุณภาพ และสำหรับตัวอย่างสกัดให้เติม 50 ไมโครลิตรของ MeCN (ที่ทำให้เป็นกรดด้วย 0.1% HOAc) เพื่อหักล้างกับการเติมสารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืชในเนื้อเมทริกซ์และในตัวทำละลายในสารละลายที่ใช้เตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน

กรณีทำความสะอาดด้วยวิธี DPX ในขั้นตอน 7 และ 8 จะทำดังนี้คือ

- (a) เตรียม DPX tip ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วย 150 มิลลิกรัมของ anh MgSO<sub>4</sub>, 50 มิลลิกรัม PSA, 50 มิลลิกรัม C18 และ 7.5 มิลลิกรัมของ GCB
- (b) ถ่ายสารละลายสกัด MeCN 1 มิลลิลิตร จากขั้นที่ 6 ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร และวางหลอดในที่ตั้งหลอดทดลอง

- (c) ดึงสารสกัด 1 มิลลิลิตรผ่านเข้า ออกที่ปลาย tip 2 ครั้ง ดึงอากาศเข้าที่ปลาย tip ให้เหมาะสมเพื่อให้ตัวดูดจับผสมกับสารละลายสกัด
- (d) ปล่อยสารละลายสกัดสุดท้ายกลับเข้าสู่หลอดเซนตริฟิวส์เดิม และทำตามขั้นตอนที่ 9 และ 10

#### 2.4.1.4 สภาวะการทดลอง LP-GC/TOFMS

ในการศึกษานี้ใช้เครื่องมือ GC รุ่น 6890 (Palo Alto, CA, USA) ต่อเชื่อมกับ Lego Pegasus 4D TOFMS (St. Joseph, MI, USA) ระบบฉีดสารอัตโนมัติใช้เครื่อง combi-PAL (Leap technologies, Carrboro, NC, USA) ร่วมกับ Optic-3 programmable temperature vaporization (PTV) (Atas-GL International Veldhoven, The Netherlands). ใช้แก๊สฮีเลียม ความบริสุทธิ์สูง (Airgas; Radnor, PA, USA) เป็นแก๊สพาใช้ความดัน 20 psi (138 kPa) โดยใช้ค่าความดันคงที่ ปริมาตรการฉีดสาร 10  $\mu$ L ผ่านใน liners ที่ภายในบรรจุด้วย sintered glass (Atas-GL International part # A100133) ค่าโปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้กับ PTV ตั้งค่าดังนี้คือ อุณหภูมิเริ่มต้น 75°C เป็นเวลา 18 วินาที (ค่า vent time 15 s) อัตราเร็วการ split 50 mL/min ใช้ mode splitless เป็นเวลา 2 min จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 280°C ด้วยอัตราเร็ว 8°C/min จากนั้นลดค่า split flow ลงเหลือ 20 mL/min และลดอุณหภูมิลงเป็น 250°C จนสิ้นสุดการตรวจวัด

คอลัมน์แยกใช้คอลัมน์ Rti-5ms ขนาด 10 m  $\times$  0.53 mm i.d.  $\times$  1  $\mu$ m film thickness ต่อร่วมกับคอลัมน์แคปิลารีที่ใช้เป็นตัวต้านการไหล (restrictor) ที่ไม่มีการเคลือบวัสดุภายใน ขนาด 3 m  $\times$  0.15 mm i.d. (Restek) ต่อคอลัมน์นี้เข้าที่ส่วนฉีดตัวอย่าง โดยใช้อุปกรณ์เชื่อมต่อ column connector (Agilent part # 0101-0594) การเชื่อมต่อคอลัมน์จะตั้งค่าในโปรแกรม โดยใช้ค่า 3.13 m  $\times$  0.15 mm i.d. อุณหภูมิในเตาอบ GC ตั้งค่าเริ่มต้นที่ 90°C (1 นาที) เพิ่มขึ้นไปที่ 180°C ด้วยอัตราเร็ว 80°C/min จากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 40°C/min จนถึง 250°C และเปลี่ยนอัตราการเพิ่มเป็น 70°C/min จนถึงอุณหภูมิ 290°C คงไว้ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 4 นาทีควรใส่แผ่นบุรองภายในเตาอบเพื่อลดขนาดเตาอบ ทำให้การเพิ่มและลดอุณหภูมิทำได้เร็วขึ้น เวลาในการตรวจวัดทั้งหมด 9.45 นาที (เวลาที่สารที่ต้องการตรวจวัดตัวสุดท้าย deltamethrin ออกมาที่ 6.18 นาที) โดยใช้เวลาน้อยกว่า 3 นาทีในการทำให้อุณหภูมิลบเข้าสู่สมดุลที่จุดเริ่มต้น

อุณหภูมิของส่วน transfer line และ แหล่งกำเนิดไอออนในแมสสเปกโตรเมตรี ตั้งค่าที่ 280°C และ 250°C ตามลำดับ พลังงานที่ใช้ในการเกิดไอออนตั้งค่าที่ -70 eV ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ส่วนตรวจวัดตั้งค่าที่ 1,800 V ที่ตำแหน่ง filament ตั้งค่าล่าช้าไว้ที่ 130 วินาที การเก็บข้อมูลสเปกตรารตั้งค่าที่ 10 สเปกตรารต่อวินาที และเก็บข้อมูล m/z 70-600 ตามที่มีผู้ศึกษามาก่อนในการวิเคราะห์แบบ 1 D [10] ใช้ Leco ChromaTOF software version 3.22 ในการควบคุมเก็บและบันทึกข้อมูล

คลังการเปรียบเทียบข้อมูลใช้ NIST 2005, Agilent's pesticide และ endocrine disruptor ในการเปรียบเทียบสเปกตรัมและระบุพีคที่ปรากฏ ตั้งค่าการฉีดแบบต่อเนื่อง ฉีด 48 ครั้งต่อวัน ต่อเนื่อง 10 วัน ก่อนที่จะเริ่มทุกชุดการฉีด จะทำการตั้งและปรับค่า TOFMS แบบอัตโนมัติ และเพื่อลดการสะสมของสารที่ไม่ระเหยที่อาจรบกวนการตรวจวัด จะทำการเปลี่ยน sintered glass liner และตัดคอลัมน์ที่ใช้เป็นตัวดำเนินการไหล 5 เซนติเมตร ทุก 96 ครั้งของการฉีดตัวอย่าง หรือ 2 ชุดของการวิเคราะห์

#### 2.4.1.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ

การทดลองหาค่าร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงของการวิเคราะห์ทำโดยการเติมสารมาตรฐานลงในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด (มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ ส้ม มันฝรั่ง และผักกาด) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 25, 100 และ 400 นาโนกรัมต่อกรัม โดยในแต่ละชุดตัวอย่างทำซ้ำ 5 ครั้ง ทำการเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างทั้งแบบใช้บัฟเฟอร์และไม่ใช้บัฟเฟอร์ในการสกัด และการใช้ทั้ง d-SPE และ DPX ในขั้นตอนการทำความสะอาดสารสกัดตัวอย่าง ตัวอย่างเช่น ในชุดการทดลองในวันที่ 1 ใช้ตัวอย่างมะเขือเทศสกัดด้วยวิธี QuEChERS แบบไม่ใช้บัฟเฟอร์และในขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างใช้ทั้ง d-SPE และ DPX (สารสกัดตัวอย่างจากการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้นความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ รวม 30 สารสกัด และ แบลงก์ 2 ตัวอย่าง) สารเทียบมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายเมทริกซ์ (matrix-matched calibration standards) 10 ชนิด และ สารเทียบมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย 5 ชนิด และ 1 รีเอเจนต์แบลงก์ ทำการทดลองและวิเคราะห์ซ้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเปลี่ยนชนิดเมทริกซ์เป็น มันฝรั่ง สตอเบอร์รี่ ส้ม และผักกาด ในทุกการทดลองใช้ Atrazine-*d*<sub>5</sub> เป็นสารเทียบมาตรฐานภายใน ค่าร้อยละการคืนกลับคำนวณเทียบกับสารมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายเมทริกซ์กับสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นนั้นที่เติมลงไปเนื้อตัวอย่าง และใช้สารละลายมาตรฐานที่ละลายในตัวทำละลายในการประเมินค่าอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ (Matrix effect, ME) ค่าร้อยละของอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์คำนวณจากค่าร้อยละของความแตกต่างระหว่างค่าความชันของกราฟเทียบมาตรฐาน ที่เตรียมจากเนื้อเมทริกซ์เทียบกับความชันของกราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย

#### 2.4.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

##### 2.4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมของ LP-GC/TOFMS

สารกำจัดศัตรูพืชที่เลือกทำการศึกษามีจำนวน 150 ชนิด เลือกจากสารที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC และอยู่ในรายการที่ต้องควบคุมการตกค้างตามรายการบังคับของบริษัท General Mill [10] และสารที่เลือกใช้นี้เป็นสารที่อยู่ในรายการที่หลายประเทศทั่วโลกมีการวางมาตรการการควบคุมและการตรวจสอบการปนเปื้อน นอกจากนี้สารเหล่านี้ยังสามารถใช้เป็นตัวแทนสารชนิดอื่นๆ ที่ตรวจพบการปนเปื้อนในผักและผลไม้เป็นประจำได้อีกด้วย

เป้าหมายของงานวิจัยนี้ต้องการลดเวลาในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิด ให้เหลือเพียง <math><10</math> นาที โดยใช้เทคนิค LP-GC/TOFMS และปรับสภาวะของเครื่องมือให้สามารถทำงานได้ตามที่ต้องการ การตรวจวัดที่รวดเร็วมักจะทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารด้อยลง และมีผลต่อคุณภาพวิเคราะห์ของการอ่านผลในการตรวจวัดด้วยแมสสเปกโตรเมตรี รวมถึงการวิเคราะห์เชิงปริมาณหากมีพีคของสารที่ออกมาพร้อมกันหรือมีการรบกวนจากเน้ไม่ทริกซ์ ในการทดลองที่ทำนั้นสามารถแยกสารทั้ง 150 ชนิด ได้ในเวลาเพียง 6.18 นาที และหลังจากนั้นจะทิ้งระยะเวลาไว้อีก 3.5 นาที ที่อุณหภูมิการแยก  $290^{\circ}\text{C}$  เพื่อกำจัดสารรบกวนที่ยังคงมีอยู่และออกมาหลังจากสารที่ต้องการตรวจวัด อาจเลือกที่จะใช้เวลาในการกำจัดสารรบกวนช่วงหลังน้อยกว่านี้ได้แต่อาจเพิ่มความเสี่ยงของการลดลงของประสิทธิภาพคอลัมน์และอาจทำให้ความแกร่งของวิธีการลดลง เมื่อนำมาใช้ในงานประจำ

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS ปริมาณของสารละลายสกัดตัวอย่างจะอยู่ที่ประมาณ 1 กรัมตัวอย่างต่อมิลลิลิตรของสารละลายสกัด และต้องการได้ขีดจำกัดการตรวจวัด <math><25</math> ng/g ในการฉีดสารเข้าสู่ระบบเครื่อง GC จะใช้เทคนิคการฉีดสารปริมาณมาก (Large-volume injection, LVI) โดยฉีด  $10\ \mu\text{L}$  คิดเป็นเนื้อสารประมาณ 10 มิลลิกรัม และใช้อินเลทการฉีดสารแบบ PTV (Programmed Temperature Vaporization) ภายในบรรจุ liner แบบ sintered glass wall-coated liner และลดค่าเวลาในการไล่ตัวทำละลายให้น้อยลง ภาวะการฉีดในการทดลองนี้ใช้เหมือนกับที่ทำในการศึกษากับ AOAC International ในการเปรียบเทียบค่าระหว่างห้องปฏิบัติการของวิธีการเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ผลการทดลองที่ได้มีค่าเท่ากับการฉีดในเครื่อง GC-MS (quadrupole) ที่ใช้ selected ion monitoring (SIM) mode [5] การฉีดสารในภาวะอุณหภูมิที่อินเลทต่ำกว่าจุดเดือดจะช่วยลดการสลายตัวของสารที่ไม่เสถียรกับความร้อนลงได้

การเลือกใช้ liner ชนิด wall-coated sintered glass liners ทำให้มีพื้นที่ผิวภายในมากช่วยในการจับสารตัวอย่างปริมาณมาก และไม่ทำให้สารหยดลงด้านล่างของส่วนฉีดเร็วเกินไป อีกทั้งมีความเฉื่อยมากกว่าการใช้ liner ที่บรรจุภายในด้วยใยแก้วที่นิยมใช้ใน LVI liner ทั่วไป จากการคำนวณด้วย Agilent FlowCalc software เมื่อฉีดตัวทำละลาย Acetonitrile  $10\ \mu\text{L}$  ใน PTV ที่  $280^{\circ}\text{C}$  ที่ความดันอินเลท 20 psi ไออของอะซิโตนไนไตร์จะมีปริมาตร 3.66 มิลลิลิตร แต่การขยายตัวของไอจะเกิดขึ้นช้าๆ ในช่วงเวลา 26 วินาที จนกว่าอุณหภูมิของ PTV จะถึงค่าสูงสุดที่ตั้งไว้

ในการทดลองนี้ใช้ขนาดของ LP-GC คอลัมน์เช่นเดียวกับที่ระบุในงานของ Mastovska et al ที่ให้ค่าความแกร่งของวิธีการที่ดีในการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS(SIM) ในระบบ quadrupole [26] ในการหาค่าความดันที่เหมาะสมกับสภาพไวการตรวจวัดของ TOFMS พบว่าที่ 120 psi ให้พีคการตรวจวัดสารที่สูงที่สุด ซึ่งความดันค่านี้เป็นค่าเดียวกับที่ใช้กับระบบเครื่อง quadrupole MS จะเห็นได้ว่าทั้งสองระบบใช้ระบบบ่มชนิดเดียวกัน ทำให้มีข้อจำกัดในการเพิ่มค่าอัตราการไหลในการเร่งความเร็วในการตรวจวัดเมื่อใช้ระบบ GC-MS ที่นิยมใช้กันทั่วไป

จากการใช้ Agilent FlowCalc software คำนวณค่าอัตราการไหลที่เหมาะสมของแก๊สฮีเลียมผ่านคอลัมน์ตามเงื่อนไขที่กำหนด จะต้องใช้อัตราการไหล 2.46 มิลลิลิตรต่อนาที หรือเท่ากับ 101 cm/s ที่จุดเริ่มต้นของคอลัมน์ขนาด 10 เมตร 0.53 mm id และจะลดลงเหลือ 1.15 มิลลิลิตรต่อนาที หรือ 73 cm/s ที่ส่วนปลายของคอลัมน์ที่ต่อเข้าแมสสเปกโตรเมตรี โดยทั่วไปการใช้คอลัมน์แบบ megabore อัตราการไหลที่เหมาะสมและไม่สูญเสียค่าการแยกควรอยู่ที่ 250 cm/s หรือไม่เกิน 350 cm/s ซึ่งจะประมาณเท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อนาที หรือเท่ากับ 72-105 psi แต่ในความเร็วของการไหลขนาดนี้ ระบบปั๊มของแมสสเปกจะไม่สามารถกำจัดโมเลกุลของแก๊สพาออกได้ทันที เมื่อเทียบกับกรณี LP-GC/MS จะเห็นได้ว่าอัตราการไหลที่ใช้มีค่าต่ำกว่ามาก

นอกจากจะใช้ค่าอัตราเร็วในการเคลื่อนที่สูงและลดความหนืดของแก๊สพาแล้ว การตั้งค่าโปรแกรมอุณหภูมิในเตาอบที่บรรจุคอลัมน์สูงจะเป็นสิ่งที่ช่วยลดเวลาการวิเคราะห์ให้สั้นลงได้อีก แต่ต้องพิจารณาถึงเวลาที่จำเป็นต้องใช้ในการทำให้คอลัมน์กลับสู่ค่าอุณหภูมิเริ่มต้น และการรอระบบเข้าสู่สมดุลมาประกอบด้วยจึงจะทำให้วิธีการตรวจวัดรวดเร็วและถูกต้องได้ตามที่ต้องการ หากใช้แผ่นรองเสริมในเตาอบจะช่วยทำให้การเพิ่มและลดอุณหภูมิทำได้เร็วขึ้น เช่นสามารถเวลาในการลดอุณหภูมิจาก 290°C เหลือ 90°C ลงจาก 2.44 นาทีเหลือเพียง 2.27 นาที หรือลดได้ 8 นาทีใน 1 รอบการวิเคราะห์จำนวน 48 ตัวอย่าง

การตรวจวัดด้วยเทคนิค TOFMS นับเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับเทคนิค LP-GC/MS เนื่องจากระบบของ TOFMS สามารถที่จะ 1. ทำการสแกนสเปกตรัมที่สมบูรณ์ใช้ข้อมูลเชิงคุณภาพวิเคราะห์ได้ และสามารถตรวจวัดได้ทั้งสารเป้าหมายและสารอื่นที่อาจมีปนอยู่ด้วยได้ 2. เพิ่มสภาพไวการตรวจวัดเมื่อเทียบกับการสแกนสเปกตรัมด้วยระบบ quadrupole 3. อัตราเร็วในการตรวจจับข้อมูลสูงทำให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อความเชื่อมั่นเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ 4. สามารถจำแนกสเปกตรัมจากพีกของสารที่ซ้อนทับกันออกจากกันได้และหักล้างแบลคกราวนด์ของสเปกตรัมได้ ดังนั้นจึงคาดว่า TOFMS จะมีประโยชน์ในการบ่งชี้และหาปริมาณสารที่ออกจากระบบ LP-GC ที่อาจจะมีสารที่ไม่สมบูรณ์และมีสารที่ออกมารวมกันอยู่มากได้

การเพิ่มอัตราเร็วการไหลของแก๊สพาที่สูง จะลดสภาพไวการตรวจวัดในระบบแมสสเปกโตรเมตรี และการเพิ่มอัตราเร็วในการจับข้อมูลจะลดสภาพไวการวิเคราะห์หลังได้อีก [22, 37] ค่าที่เหมาะสมของการจับข้อมูลควรอยู่ที่ 100 spectra/sec จะช่วยให้การจำแนกสเปกตรัมของสารที่ออกมาพร้อมกันทำได้ดีโดยไม่ต้องทำการอินทิเกรตพีกของสารที่ละเอียดอ่อน แต่นอกจากที่จะต้องทำให้ได้สเปกตรัมที่ดีแล้ว เราคงต้องการที่จะได้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำในระดับ 10 นาโนกรัมต่อกรัมด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงตั้งค่าอัตราการตรวจจับสัญญาณที่ 10 spectra/s ซึ่งจะทำให้ได้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณที่ <25ng/g และให้ค่าการจำแนกสัญญาณเชิงคุณภาพที่ดีในการตรวจวัดสารที่ต้องการได้มากกว่า 125 ชนิดไอออนที่ใช้ในการจำแนกชนิดของสารทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 2.3.1 นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบค่าการเทียบสเปกตราระหว่าง

สารที่ตรวจวัดกับสเปกตราก็ได้จากการจำแนกสัญญาณ และสเปกตราก็มาจากคลังข้อมูลเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการยืนยันการบ่งชี้ชนิดของสาร ข้อมูลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพในระบบการตรวจวัดสารปริมาณมากนั้นได้แยกเขียนไว้ในอีกบทความหนึ่ง เพื่อให้เข้าใจได้อย่างชัดเจนมากขึ้น [35]

จากการจำแนกสเปกตร้าในการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถจำแนกสารทั้ง 153 ชนิด (รวมสารควบคุมคุณภาพ และสารที่ใช้เป็นสารเทียบมาตรฐานภายในอีก 2 ชนิด) เริ่มจากสาร mevinphos ที่มีคาร์บอนชั้นไหม้ 2.23 นาที่ ไปจนถึงสารตัวสุดท้ายที่ออกมาที่เวลา 6.18 นาที่ ตามตารางที่ 2.3.1 จะมีเฉพาะสารบางคู่เท่านั้นที่มีแมสสเปกตร้าเหมือนกันจนไม่สามารถแยกขาดจากกันหรือจำแนกไม่ได้ว่าเป็นสารชนิดใด ได้แก่  $\beta$ -BHC กับ  $\gamma$ -BHC (lindane) และ o,p'-DDT กับ p,p'-DDD ส่วนกรณีของคู่  $\alpha$ -BHC กับ  $\delta$ -BHC และ p,p'-DDT กับ o,p'-DDD แม้ว่าจะมีแมสสเปกตร้าเหมือนกันแต่เวลาในการผ่านออกมาจากคอลัมน์ต่างกัน จึงสามารถจำแนกความแตกต่างจากกันได้ ส่วนสารตัวอื่นๆ เวลาการแยกจะแตกต่างกัน ในกรณี  $\beta$ -BHC กับ  $\gamma$ -BHC หากต้องการแยกสารคู่นี้ออกจากกัน จะต้องขยายเวลาในการวิเคราะห์ออกไป แต่ในกรณีของ o,p'-DDT และ p,p'-DDT แม้วิธีการปัจจุบันที่ใช้คอลัมน์ยาว 30 เมตร x 0.25 มม. หากจะแยกสารคู่นี้ออกจากกันต้องใช้เวลาในการแยกมากกว่า 40 นาที ในวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 10 นาที ดังนั้นหากตัวอย่างมีสารคู่นี้ หรือตัวใดตัวหนึ่ง ผลการวิเคราะห์จะแสดงในรูปของค่ารวมของสารทั้งสองแทน

#### 2.4.2.2 สมรรถนะของวิธีการ

การปรับสภาวะการวิเคราะห์ให้เหมาะสมนั้นจะทำให้ได้เวลาการตรวจวัดสั้นตามเป้าหมายที่วางไว้ คือต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างน้อย 32 ตัวอย่างต่อวัน หากสามารถทำได้จริงแต่วิธีการไม่มีความคงทน คือทำได้แค่ช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น วิธีการนั้นจะไม่มี ความหมาย ดังนั้น การศึกษาสมรรถนะของวิธีการจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะได้มาซึ่งคำตอบที่ว่า วิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในงานประจำได้หรือไม่ ตัวแปรที่สำคัญในการบอกถึงสมรรถนะของวิธีการได้แก่ ความแม่นยำ (การศึกษาร้อยละการคืนกลับ) ค่าความเที่ยง ในแต่ละชุดการทดลอง และค่าความเที่ยง ในต่างชุด การทดลองหรือต่างวันที่ทำการทดลอง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐาน หรือช่วงกว้างของความเข้มข้นในการตรวจวัดตัวอย่าง อิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ ความแกร่งของวิธีการ (จำนวนของตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ต่อเนื่องกันและให้ผลค่าเดียวกัน) นอกจากนี้ยังคำนึงถึงสมรรถนะของวิธีการในแง่ของ ความง่ายของการตรวจวัด ความเร็ว ราคา และปัจจัยอื่นๆ โดยการเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิค QuEChERS โดยใช้ นักวิเคราะห์สองคนทำเปรียบเทียบกัน ในการทดลองนี้จะศึกษาสารที่ต้องการตรวจวัด 150 ชนิด ในเนื้อเมทริกซ์ตัวอย่าง 5 ชนิด คือ มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ มันฝรั่ง ส้ม ผักกาด และใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ที่แตกต่างกัน 2 วิธี ในตารางที่ 2.3.1 แสดงข้อมูลของค่า ความเป็นเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐานในเนื้อเมทริกซ์ โดยการใส่ค่า  $R^2$  ผลของอิทธิพลเนื้อเมทริกซ์โดยแสดงด้วย

ค่า %ME± std. dev และค่าความเที่ยง แสดงด้วยค่า %RSD ของสารแต่ละชนิดที่ทำการตรวจวัดซ้ำ 10 ชุดการทดลอง

#### 2.4.2.2.1 ความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด

ค่าเฉลี่ยความเป็นเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐานที่แสดงในตารางที่ 2.3.1 ได้มาจากการวาดกราฟเทียบมาตรฐาน 20 ชุดการทดลอง โดยใช้กราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมในเนื้อเมทริกซ์ 2 ชุด แต่ละกราฟมี 5 ระดับความเข้มข้นคือ ที่ 10, 25, 100, 400 และ 1000 นาโนกรัมต่อกรัม ชุดแรกทำความสะอาดตัวอย่างด้วยวิธีการ d-SPE และอีกชุดหนึ่งใช้วิธี DPX นอกจากนี้ยังได้ทำการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลายเพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างไว้ด้วย ในการฉีกกราฟเทียบมาตรฐานนั้นได้ทำต่อเนื่องตลอดในการทดลองทุกชุด และทำในวันที่แตกต่างกัน พบว่าสารจำนวนมาก (82 ใน 150 ชนิด) มีค่าเฉลี่ยของ R2 values  $\geq 0.995$  และคิดรวม 110 ชนิด ให้ค่า R2  $\geq 0.990$  ซึ่งในภาพรวมนับเป็นผลการทดลองที่ดีมาก แม้ว่าวิธีการตรวจวัดทำในเวลาสั้น ฉีดตัวอย่างจำนวนมาก และเนื้อเมทริกซ์ซึ่งสกรปรก

#### 2.4.2.2.2 ระดับต่ำสุดของการทำปริมาณวิเคราะห์

การประเมินค่าอัตราส่วนของสัญญาณเทียบกับสัญญาณรบกวน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปมาประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณนั้น บางครั้งอาจได้ค่าที่ไม่น่าเชื่อถือหรือเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย ในการทดลองนี้จึงเลือกที่จะใช้ค่าความเข้มข้นที่จุดต่ำสุดของกราฟเทียบมาตรฐานในการกำหนดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการตรวจวัดเชิงปริมาณ ซึ่งเป็นค่าที่ได้ทำการตรวจวัดจริงและมีความน่าเชื่อถือเพียงพอ อีกทั้งการทดลองนี้ใช้การเตรียมสารมาตรฐานในเนื้อเมทริกซ์ ดังนั้นค่าที่ได้จะมีความถูกต้องและความมั่นใจสูง ตารางที่ 2.4.2 แสดงสรุปค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของสารทุกชนิดที่ทำการศึกษา ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารส่วนใหญ่ (98 ชนิด) สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ที่ระดับต่ำถึง 10 นาโนกรัมต่อกรัม และประมาณ 43 ชนิด ตรวจวัดได้ในช่วง 10-25 นาโนกรัมต่อกรัม ขึ้นกับเนื้อเมทริกซ์และวิธีการ และสารที่เป็นปัญหาในการตรวจวัดจะมีค่าสูงที่ระดับ 100-1,000 ng/g และมีสารจำนวนน้อยที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

#### 2.4.2.2.3 ร้อยละการคืนกลับ (ความแม่นยำ)

การหาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีการ LP-GC/TOFMS และใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS ที่แตกต่างกันสองวิธีการ ทำโดย

การเติมสารมาตรฐานลงไปในเรื่องเมทริกซ์ทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 25, 100, 400 นาโนกรัม ต่อกรัม และใช้สารไอโซโทป 2 ชนิด คือ Atrazine- $d_5$  และ fenthion- $d_6$  เป็นสารเทียบมาตรฐานภายใน เนื่องจากไม่มีโอกาสที่จะมีสารทั้ง 2 นี้ปนเปื้อนในตัวอย่าง และราคาของสารไม่แพงจนเกินไป การหา ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิดใช้การคำนวณเทียบกับสารเทียบมาตรฐานภายในทั้งสารเทียบ มาตรฐานและสารตัวอย่าง

ตารางที่ 2.4.1 แสดงค่าร้อยละการคืนกลับของยาฆ่าแมลงทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการศึกษาข้อมูลทั้งหมดที่ทำการเติมสารมาตรฐานลงไปในเรื่องเมทริกซ์ที่ แตกต่างกัน 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ และใช้วิธีการ QuEChERS ที่แตกต่างกัน 4 วิธี ใช้ระยะเวลาทดสอบทั้งสิ้น 9 วัน ค่าเฉลี่ยของร้อยละการคืนกลับที่ร้อยละร้อยละ 70 จะแสดงด้วย อักษรตัวหนา และสารเหล่านั้นทั้งหมดมีโครงสร้างเป็นแนวระนาบ ดังนั้นเมื่อใช้ 0.75 กรัมของ GCB ในขั้นตอนของการทำความสะอาดตัวอย่างจึงทำให้สูญเสียสารบางส่วนไป ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

รูปที่ 2.4.1 แสดงการกระจายของค่าร้อยละการคืนกลับของเนื้อเมทริกซ์แต่ละชนิดที่ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน พบว่าสารที่ทำการศึกษามากกว่าร้อยละ 80 (หรือจำนวน 120 ชนิด) มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110% ซึ่งค่าร้อยละการคืนกลับที่เป็นที่ยอมรับตาม กฎเกณฑ์มาตรฐานทั่วไปจะอยู่ที่ 70-120% ในการศึกษาในเรื่องเมทริกซ์ที่แตกต่างกันครั้งนี้พบว่าสาร 126-136 ชนิดจาก 150 ชนิด (หรือประมาณ 84-91%) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และมีค่าความ เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 20 ผลที่ได้จากการสกัด QuEChERS โดยใช้บัพเฟอร์สาร 113 ชนิด (หรือประมาณ 75%) มีค่าร้อยละการคืนกลับในช่วง 70-120% จากรูปที่ 2.4.1 จะเห็นได้ว่า กรณีที่สกัดด้วยวิธีการใช้บัพเฟอร์ มันฝรั่งจะมีค่าร้อยละการคืนกลับสูงกว่า 110% ซึ่งแตกต่างจาก กรณี อื่นๆ ผลวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารหนึ่งเมื่อไม่ใช้สารเทียบมาตรฐานภายในจะมีค่าร้อยละการ คืนกลับที่  $89 \pm 16$  และหากใช้สารเทียบมาตรฐานภายในจะมีค่า  $106 \pm 19$  และหากมองอย่างผิวเผิน อาจสรุปว่าข้อมูลที่เบี่ยงเบนไปนี้มีผลมาจากการใช้สารเทียบมาตรฐานภายใน แต่พบว่าเนื้อเมทริกซ์ มันฝรั่งจะมีปริมาณกรดไขมันรบกวนในโครมาโทแกรมในปริมาณสูงสังเกตได้จากรูปที่ 2.4.2 (A)

เมื่อสกัดตัวอย่างมะเขือเทศแบบใช้บัพเฟอร์จะเกิดสารสกัดร่วมมากกว่าในกรณีที่ไม่ใช้ บัพเฟอร์ แม้ว่าเนื้อเมทริกซ์ที่ศึกษาจะมีปริมาณกรดไขมันไม่แตกต่างกันคือประมาณ 0.063-0.213% แต่ความแตกต่างของปริมาณน้ำ (80% ในมันฝรั่ง เทียบกับ 87-95% ในเนื้อเมทริกซ์อื่นๆ) และมี ปริมาณแป้งสูง (15%) [39] อาจเป็นผลให้มีปริมาณกรดไขมันสูงขึ้น มันฝรั่งมีค่า pH 5.5-6.2 [40] เมื่อ สกัดด้วยบัพเฟอร์อะซิเตทที่มีค่า pH  $\approx 4.8$  [6] จะเปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในสภาวะเป็นกลางและสกัด เข้ามาในอะซิโทไนไตรล์ได้ดีในช่วง pH ที่ต่ำกว่า

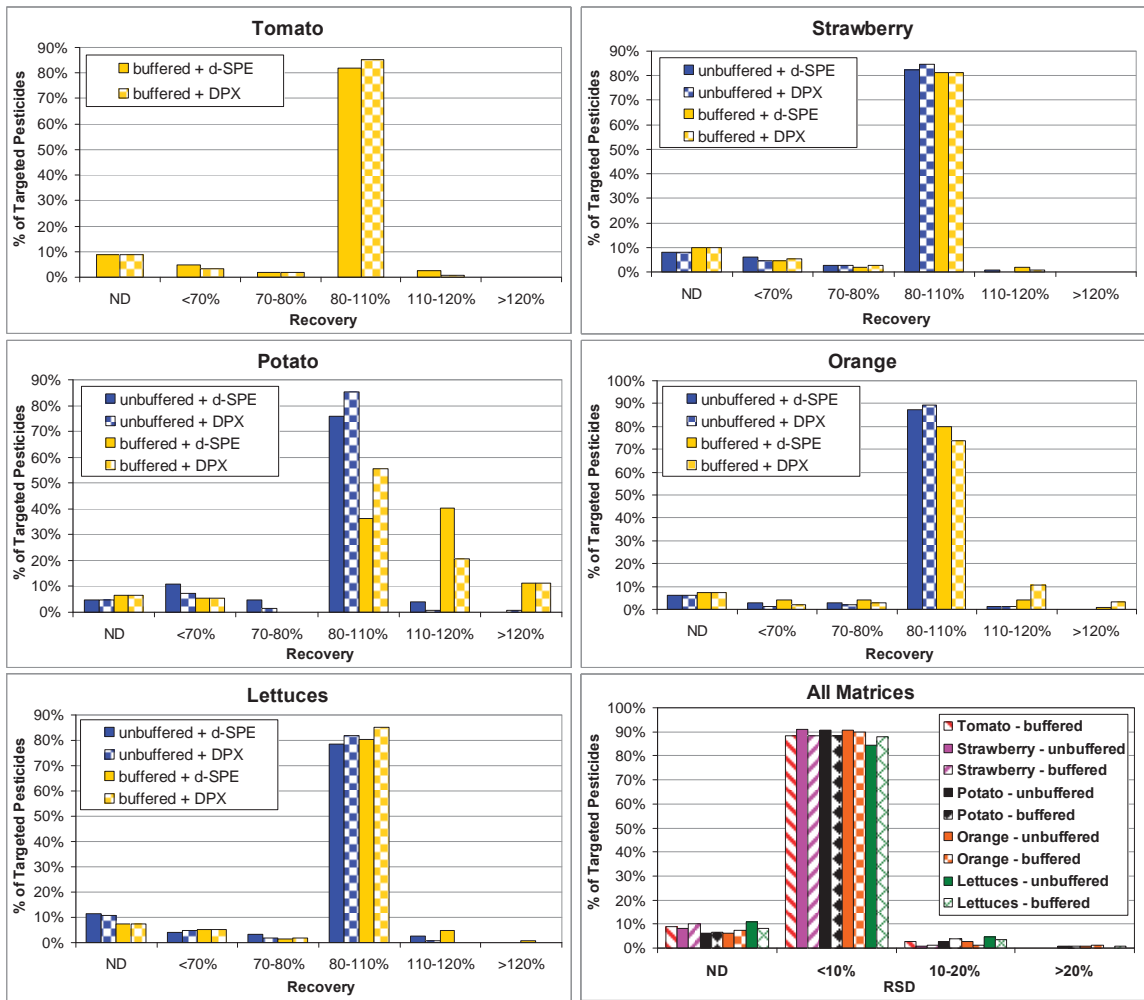
การใช้ 50 mg PSA ต่อกรัมของเนื้อมันฝรั่งจะไม่เพียงพอต่อการกำจัดกรดไขมันที่มาจาก การสกัดในสารละลายบัพเฟอร์ QuEChERS หากเพิ่มปริมาณ PSA จะช่วยในการกำจัดกรดไขมัน ได้ มากขึ้น (เช่นงานของ Mastovska et al. ใช้ PSA 150 mg ต่อ มิลลิลิตรของการสกัดด้วยพีชและเมล็ด

พีช [10]) แต่จะทำให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีสภาพขั้วสูงลดลง เช่นกรณี สาร acephate การที่มีปริมาณกรดไขมันสูงจะทำให้ผลการวิเคราะห์ต่ำและอาจทำให้เครื่องมือวิเคราะห์ สกปรกได้ การไม่ใช้บัพเฟอร์ในการสกัดมันฝรั่งจะให้ผลที่ดีกว่ามาก

ตารางที่ 2.4.2 ระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Lowest calibrated levels, LCLs) ของสารกำจัดศัตรูพืชที่ศึกษา โดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ที่แตกต่างกันในเนื้อเมทริกซ์ที่ต่างกัน (ND = not detected)

LCL	Pesticides
10 ng/g in all matrices and versions	alachlor, aldrin, $\alpha$ -BHC, $\beta$ -BHC+lindane, $\delta$ -BHC, bifenthrin, bromophos, bromophos-ethyl, bromopropylate, bupirimate, buprofezin, cadusafos, carbophenothion, carfentrazone-ethyl, <i>cis</i> -chlordane, <i>trans</i> -chlordane, chlorfenvinphos, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, $\lambda$ -cyhalothrin, <i>o,p'</i> -DDD, <i>p,p'</i> -DDD+ <i>o,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDE, diazinon, dichlorfenthion, dichlorobenzophenone, dieldrin, diphenylamine, endosulfan sulphate, endrin, endrin ketone, EPN, esfenvalerate, ethafluralin, ethion, ethoprophos, famphur, fenarimol, fenchlorphos, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, fenvalerate, fipronil, flucythrinate, fluvalinate, fonofos, heptachlor, heptachlor-epoxide, hexachlorobenzene, isofenphos, leptophos, malathion, methacrifos, methoxychlor, metolachlor, mirex, myclobutanil, <i>cis</i> -nonachlor, <i>trans</i> -nonachlor, oxyfluorfen, parathion, penconazole, pendimethalin, pentachloroanisole, pentachlorothioanisole, <i>cis</i> -permethrin, <i>trans</i> -permethrin, <i>o</i> -phenylphenol, phorate, piperonyl butoxide, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, procymidone, propachlor, propargite, propazine, propetamphos, propiconazole, propoxur, propyzamide, pyrimethanil, quintozone, resmethrin, sulprofos, tecnazene, terbufos, tetrachlorvinphos, tetraconazole, tetradifon, tolclofos-methyl, triadimifon, trifluralin, vinclozolin
10-25 ng/g in all matrices and versions	atrazine, azinphos-ethyl, carbofuran, cyanophos, cypermethrin, cyprodinil, <i>p,p'</i> -DDT, disulfoton, $\alpha$ -endosulfan, $\beta$ -endosulfan, ethoxyquin, fenamiphos, fensulfothion, heptenophos, iprodione, kresoxim-methyl, metalaxyl, methidathion, phosalone, profenofos, tebuconazole, terbuthylazine, triazophos
10-25 ng/g in some matrices and versions	carbaryl, chinomethionat, chlorothalonil, chinomethionat, coumaphos, cyfluthrin, deltamethrin, demeton-S-methyl, demeton-S-methylsulfone, dicrotophos, dioxathion, disulfoton sulfone, fenthion sulfone, kepone, methiocarb, methyl parathion, mevinphos, phosmet, propham, simazine
100-1,000 ng/g in some matrices and versions	carbaryl, chinomethionat, chlorothalonil, coumaphos, cyfluthrin, deltamethrin, demeton-S-methyl, dicloran, dicrotophos, dimethoate, dioxathion, disulfoton sulfone, fenoxycarb, kepone, phosphamidon, cyfluthrin, fenoxycarb, methiocarb, methyl parathion, mevinphos, phosmet, propham, phthalimide, simazine

ND in some matrices and versions	demeton-S-methyl, demeton-S-methylsulfone, dimethoate, fenthion sulfone, kepone, phosphamidon, phthalimide
ND in all matrices and versions	azinphos-methyl, captafol, captan, folpet, metribuzin, oxadixyl

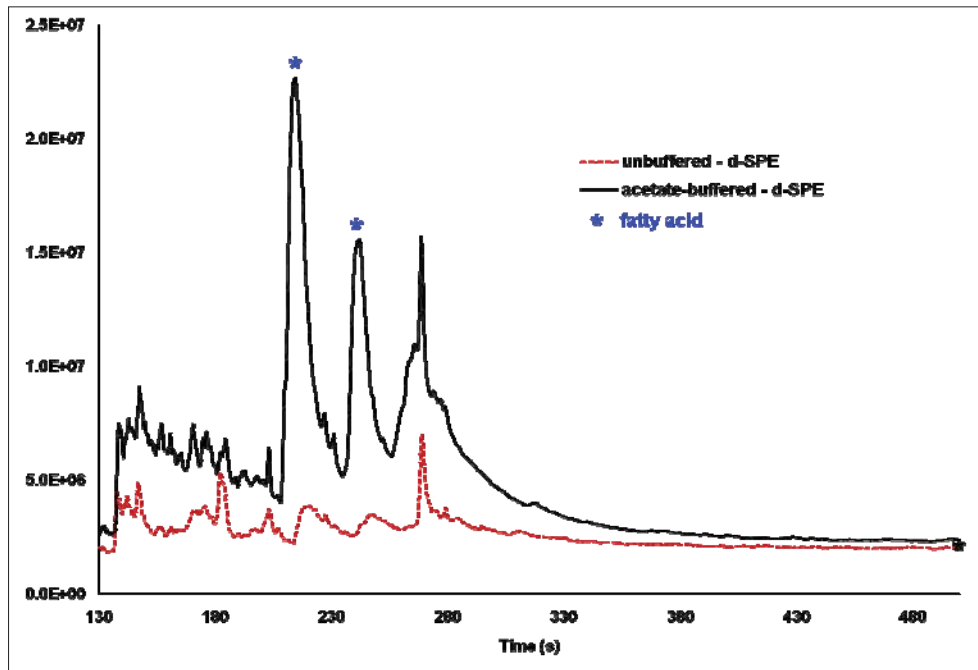


**รูปที่ 2.4.1** การกระจายค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารกำจัดศัตรูพืช 150 ชนิดในเนื้อเมทริกซ์มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ มันฝรั่ง และผักใบเขียว เมื่อใช้เทคนิคการสกัดและการทำความสะอาดสารสกัดที่แตกต่างกันและตรวจวัดด้วย LP-GC/TOFMS

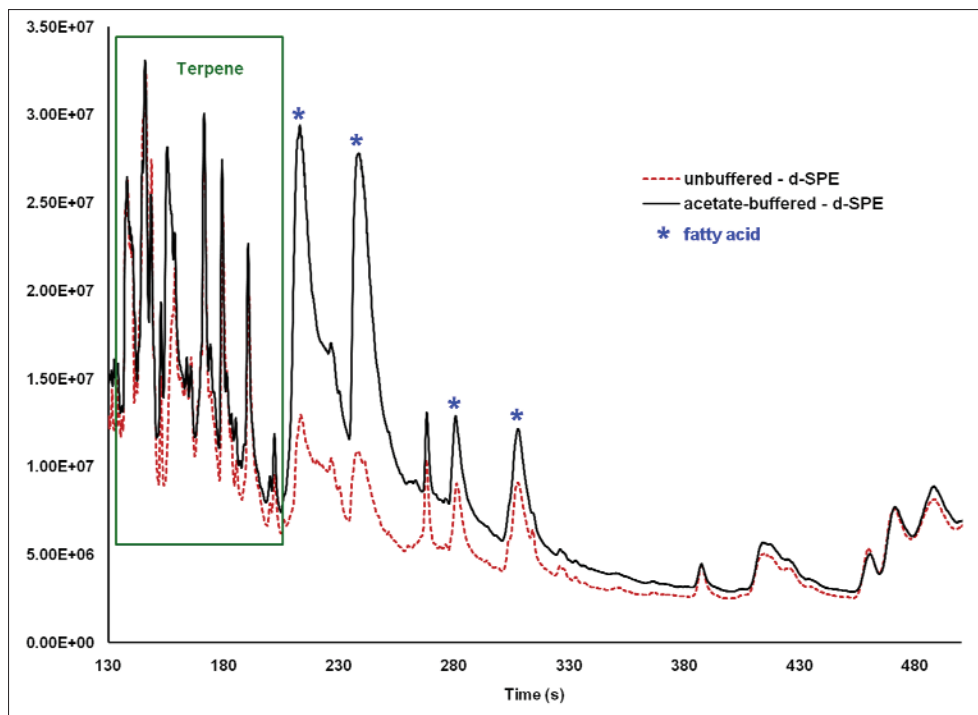
ในรูป 2.4.2 (B) ในสารสกัดตัวอย่างสัมพบกรดไขมันที่ไม่แตกต่างจากกรณีของมันฝรั่ง แต่ค่าร้อยละการคืนกลับในรูปที่ 2.4.1 ไม่ได้แตกต่างกันมากนัก การใช้บัฟเฟอร์ไม่ส่งผลต่อสารสกัดรวม terpenes (sesquiterpenes) ที่มาจากน้ำมันของผลส้ม (citrus oil) ที่ปรากฏในช่วงต้นของ โครมาโท

แกรม และที่สำคัญคือบัพเฟอร์อะซิเตทจะช่วยทำให้ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ pymetrozine และ สารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ที่ขึ้นกับค่า pH มีค่าดีขึ้น [6, 9] และสารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่ขึ้น ทะเบียนเพื่อการใช้ในพืชตระกูลส้ม

(A)



(B)



**รูปที่ 2.4.2** Total ion chromatogram ของการสกัดตัวอย่าง (A) มันฝรั่ง และ (B) ส้ม โดยใช้วิธีการสกัด QuEChERS แบบใช้บัฟเฟอร์และไม่ใช้บัฟเฟอร์และใช้การทำความสะอาดสารละลายสกัดด้วย d-SPE

สารจำนวน 11 ชนิดจาก 150 ชนิด หรือประมาณ 8% (azinphos-methyl, captafol, captan, demeton-S-methyl, demeton-S-methylsulfone, dimethoate, fenthion sulfone, folpet, kepone, metribuzin, and oxadixyl) ไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากสลายตัวหรือให้สัญญาณการตรวจวัดต่ำ หรือไม่เหมาะสมกับการตรวจด้วยเทคนิค GC หรือมีค่ามวลของไอออนต่ำ จึงทำให้สัญญาณเกิดการรบกวนจากเนื้อเมทริกซ์สูง ในกรณีเนื้อเมทริกซ์ที่ซับซ้อนสารเหล่านี้ยากที่จะทำการวิเคราะห์ร่วมกับสารอื่นๆ ควรจะเลือกทำการตรวจวัดด้วยวิธีการ LC-MS/MS ยกเว้นสาร captan, captafol, folpet, kepone (chlordecone) ซึ่งสลายตัวง่ายและจัดเป็นสารที่มีปัญหาในการตรวจวัด และสารกลุ่มที่เหมาะสมกับการตรวจด้วย LC เช่น atrazine, methiocarb, phosmet จะให้ผลการตรวจวัดด้วย GC ที่ไม่คงที่ เนื่องจากการรบกวนของเนื้อเมทริกซ์

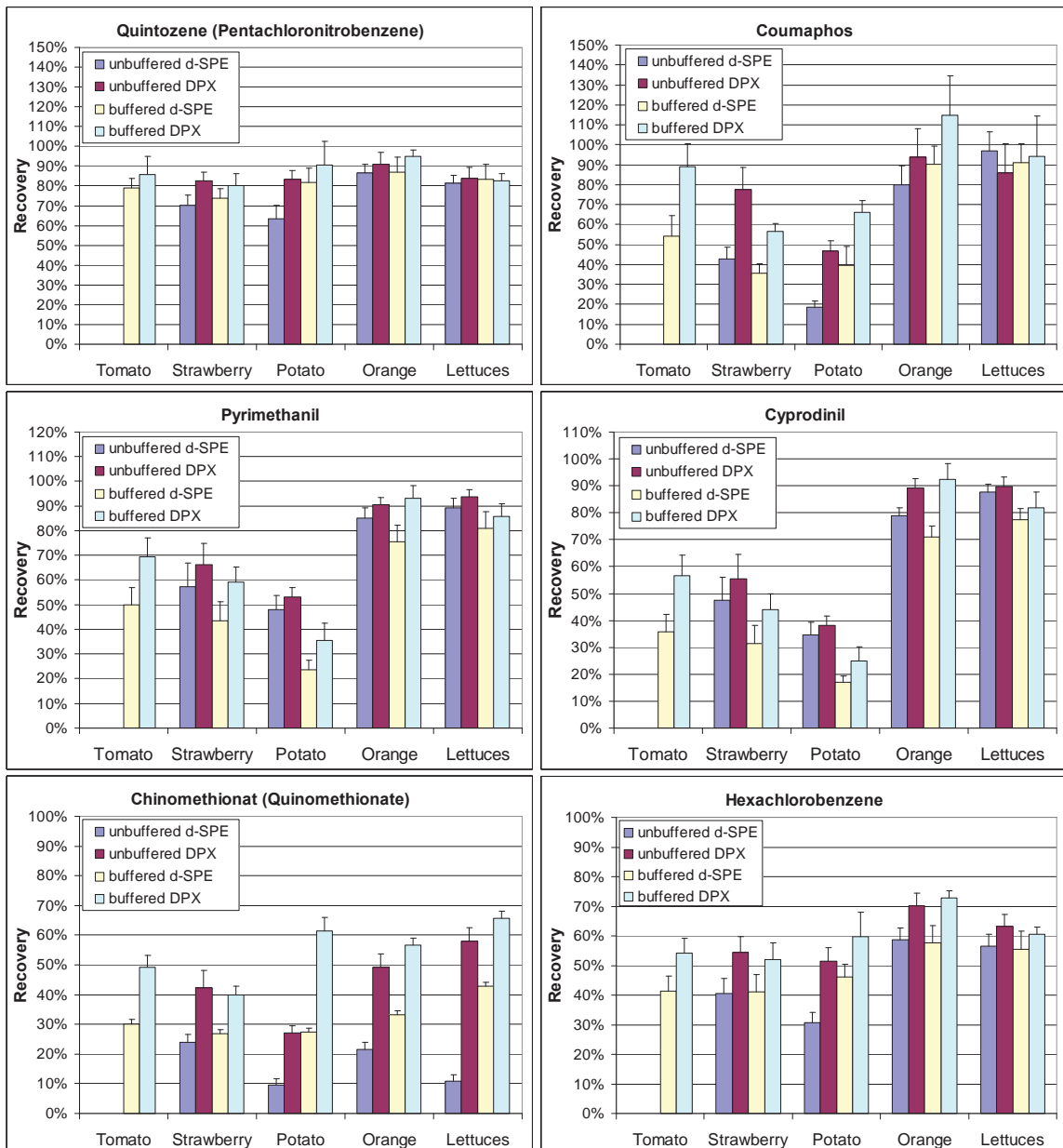
สารกลุ่มไพรีทรอยด์จัดเป็นสารกลุ่มที่ยากที่จะทำการวิเคราะห์ร่วมกับสารอื่นๆ เนื่องจากมีสภาพขี้ดามากและให้สัญญาณการตรวจวัดน้อย บางคนอาจคิดว่าสารกลุ่มนี้เหมาะกับการตรวจวัดด้วย GC แต่มีงานวิจัยที่ทำการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วย reversed-phase LC-MS/MS และให้ผลที่ดี [10] ในเทคนิค LP-GC/TOFMS สาร cyfluthrin และ deltamethrin ไม่สามารถตรวจวัดเมื่อเติมสารลงในระดับ 25 ng/g ได้ แต่สารไพรีทรอยด์ตัวอื่นๆ เช่น cypermethrin, esfenvalerate, fenvalerate, flucythrinate, fluvalinate, permethrin, และ resmethrin ให้สัญญาณการตรวจวัดสูง และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 74-120% ในทุกเนื้อเมทริกซ์ วิธี LP-GC/TOFMS ในผลดีในการตรวจวัดไพรีทรอยด์เพราะใช้เวลาการตรวจวัดสั้น พิกคคมชัด ลดการแพร่ หากตรวจวัดด้วยเทคนิค GC แบบเดิมจะต้องใช้เวลาในการตรวจวัดมากกว่า 30 นาที

**2.4.2.2.4** ชนิดและผลของตัวดูดซับต่อการทำความสะอาดสารละลายสกัด

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ชุดของตัวดูดซับชนิดเดียวกันทั้งในวิธีการ d-SPE และ DPX ในทุกเมทริกซ์ตัวอย่างและในสารละลายสกัดทั้งใช้และไม่ใช้บัฟเฟอร์ พบว่าการทำความสะอาดตัวอย่างหลังการสกัดจะช่วยลดการรบกวนของเมทริกซ์ที่ถูกสกัดร่วมเข้ามาอยู่ในสารละลายสกัดได้ดียิ่งขึ้น [4, 9] แม้ว่า C<sub>18</sub> และ GCB จะไม่ได้ช่วยทำความสะอาดตัวอย่างในเนื้อเมทริกซ์ได้ดีเท่ากับ PSA [4] แต่การใช้ร่วมด้วยในปริมาณน้อยจะช่วยให้ค่าร้อยละการคืนกลับดีขึ้น C<sub>18</sub> ช่วยกำจัดปริมาณของไขมัน และสารที่ไม่มีสภาพขี้ดได้ดีและไม่ทำให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารที่ศึกษาลดลง GCB ช่วยในการกำจัดคลอโรฟิลล์ของตัวอย่างพืชใบเขียวและช่วยในการกำจัด sterols [7] ในวิธีการมาตรฐานของสหภาพยุโรป CEN Standard Method 15662 จะใช้ GCB 0, 2.5, หรือ 7.5 mg ต่อ mL ขึ้นกับเมทริกซ์ตัวอย่าง [7,8] กรณีตัวอย่างผักกาดใบเขียว จะกำจัดคลอโรฟิลล์ได้ 85-90% ต้องใช้ GCB 7.5 mg/mL ในงานนี้เพื่อให้ง่ายและเป็นมาตรฐานเดียวกันจะใช้ GCB 7.5 mg/mL ในทุกตัวอย่างผัก

และผลไม้ และคาดว่าค่าร้อยละการคืนกลับของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีโครงสร้างเป็นแนวระนาบจะมีค่าลดลง

ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเที่ยงของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีโครงสร้างแบบแนวระนาบแสดงในรูปที่ 2.4.3 ค่าการทำซ้ำในวันเดียวกันให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ใกล้เคียงกันแต่การทำซ้ำต่างวันกันให้ผลที่แตกต่างกันมากกว่าที่คาดไว้ เราคาดว่าสารทุกชนิดจะให้ผลเช่นเดียวกับ quintozene คือได้ค่าร้อยละการคืนกลับ 65-90% แต่ coumaphos, pyrimethanil, cyprodinil, quinomethionate, และ hexachlorobenzene ให้ผลที่แตกต่างกันและไม่มีความแน่นอนในการสกัด



รูปที่ 2.4.3. ค่าร้อยละการคืนกลับของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นแนวระนาบในเนื้อเมทริกซ์ที่แตกต่างกันและใช้การสกัด QuEChERS และการ clean-up ที่แตกต่างกัน (n=15 โดยการรวมผลของการเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ระดับเข้าด้วยกัน) และใช้ GCB 7.5 mg

ทั้ง 4 แบบ ค่าร้อยละการคืนกลับในสารที่มีโครงสร้างแนวระนาบหลายชนิดยังคงอยู่ในระดับที่ยอมรับได้คือ >70% และ <20% RSD ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเมทริกซ์และชนิดของการสกัด แต่ผลโดยรวมยังอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการคัดกรองตัวอย่างได้

Chlorothalonil จัดเป็นสารในกลุ่มที่มีโครงสร้างแบบระนาบที่มีความยากในการตรวจวัด เพราะสลายตัวง่ายและถูกจับบน GCB ได้บางส่วน มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ [6, 9] ที่พบว่าการใช้บัฟเฟอร์ช่วยปรับปรุงผลการตรวจวัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวัดในผักกาดเขียวในช่วง pH ต่ำจะช่วยเพิ่มความเสถียรของสารที่ไวต่อความเป็นเบสได้ดี ในเมทริกซ์มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ และผักกาดเขียว ค่าร้อยละการคืนกลับของสารบางชนิดมีค่าสูงกว่า 120% ขึ้นกับเสถียรภาพของสารที่วิเคราะห์ สารรบกวน และผลของเมทริกซ์ที่มีต่อการตรวจวัด เป็นต้น

#### 2.4.2.2.5 ความเที่ยง

ค่าความเที่ยงแสดงไว้ในตารางที่ 2.4.1 และรูปกราฟล่างขวาของรูปที่ 2.4.1 ซึ่งแสดงค่าการกระจายของค่าความเที่ยงสัมพัทธ์ ค่าความเที่ยงของสาร 84-91% มีค่าคงที่ <10% RSD (ไม่สัมพันธ์กับค่าร้อยละการคืนกลับ) ในทุกเมทริกซ์ และ สาร 1-5% มีค่า RSD มีค่าในช่วง 10-20% ยกเว้นกรณีมันฝรั่งจะมีค่า RSD สูง (ประมาณ 6% ของสารที่ตรวจวัด) จากค่าความเที่ยงที่ได้ในการศึกษานี้พบว่า ผลการตรวจวัดมีคุณภาพและความแกร่งของวิธีการสูงมีความเหมาะสมในการตรวจวัดและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้

#### 2.4.2.3 การเปรียบเทียบการกระจายวิวัฒนาการของแข็งในการละลายสกัด (d-SPE) เทียบกับ วิธีการ DPX ในการทำความสะอาดสารละลายสกัด

ในการทำความสะอาดสารละลายสกัดด้วยเทคนิค d-SPE และ DPX ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเที่ยงไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้นการสกัดโดยใช้บัฟเฟอร์และไม่ใช้บัฟเฟอร์ในกรณีของมันฝรั่งและส้มตั้งที่ได้กล่าวมาแล้ว ความแตกต่างของผลจะขึ้นกับตัวผู้วิเคราะห์ และ matrix-matched calibration standards มากกว่า แต่การทำมาสะอาดตัวอย่างด้วย DPX จะมีกรดไขมันแสดงบนโครมาโทแกรมมากกว่าการใช้ d-SPE อาจจะขึ้นกับความแตกต่างของตัววัสดุดูดซับที่แม้ว่าจะเลือกใช้ชนิดเดียวกัน แต่คุณภาพของวัสดุจากแต่ละบริษัทอาจไม่เหมือนกัน การรบกวนของสารเคมีจากพลาสติกและแผ่นสแตนเลสสตีลที่ใช้ใน DPX สามารถเห็นได้ชัดบนโครมาโทแกรม

ข้อดีของการใช้ DPX คือการที่ DPX มีแผ่นโลหะที่มีรูพรุน  $2\ \mu\text{m}$  กั้นอยู่ ทำให้มั่นใจได้ว่าไม่มีอนุภาคปนอยู่ในสารสกัดสุดท้าย ส่วนในกรณีของ d-SPE ต้องระวังและสังเกตดูไม่ให้มีอนุภาคอยู่ในสารสกัดและเป็นการยากที่จะถ่ายสารละลายสกัดทั้งหมดออกมาภายหลังการเซนตริฟิวส์ ด้วยเหตุผลนี้ DPX จะให้สารละลายสกัดสุดท้ายปริมาณมากกว่า d-SPE แต่ปริมาณนี้จะไม่คงที่ ทำให้เราเลือกที่จะดึงปริมาตรสุดท้ายมาเท่ากันคือ 0.5 มิลลิลิตร หากนำไปใช้ในงานประจำควรใช้สารเทียบมาตรฐานภายในในการหักล้างความเบี่ยงเบนของปริมาตรที่เกิดขึ้นในระบบ DPX นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการขยายเวลาที่ใช้ในขั้นตอน DPX และ d-SPE ( $>5\ \text{min}$  กรณี DPX และ  $<3\ \text{min}$  กรณี d-SPE) ทั้งสองกรณีใช้เวลาในการทำงานและให้ประสิทธิภาพรวดเร็วไม่แตกต่างกัน ในกรณีที่ต้องการเพิ่มปริมาณงานให้มากขึ้นจะสามารถควบคุมให้สารละลายสุดท้ายจาก DPX ไหลเข้าสู่ขวดฉีดตัวอย่างโดยอัตโนมัติ ระบบอัตโนมัติของ DPX นี้ จะช่วยให้สกัด 20 ตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน เช่นเดียวกับเครื่องเซนตริฟิวส์ เพียงแต่ต้องเพิ่มอุปกรณ์อัตโนมัติส่วนนี้เข้ามาด้วย หากเปรียบเทียบในด้านราคา d-SPE จะถูกกว่า DPX มากกว่า 3 เท่า (ราคาขายในสหรัฐอเมริกา d-SPE ประมาณ \$1.20 และ DPX ประมาณ \$4) ข้อเสียของทั้ง d-SPE และ DPX เมื่อเทียบกับ SPE คือปริมาตรของสารสกัดกว่า 50% จะติดค้างอยู่ในตัวดูดซับ แต่ข้อดีคือเร็ว ง่ายและราคาถูกกว่ามาก

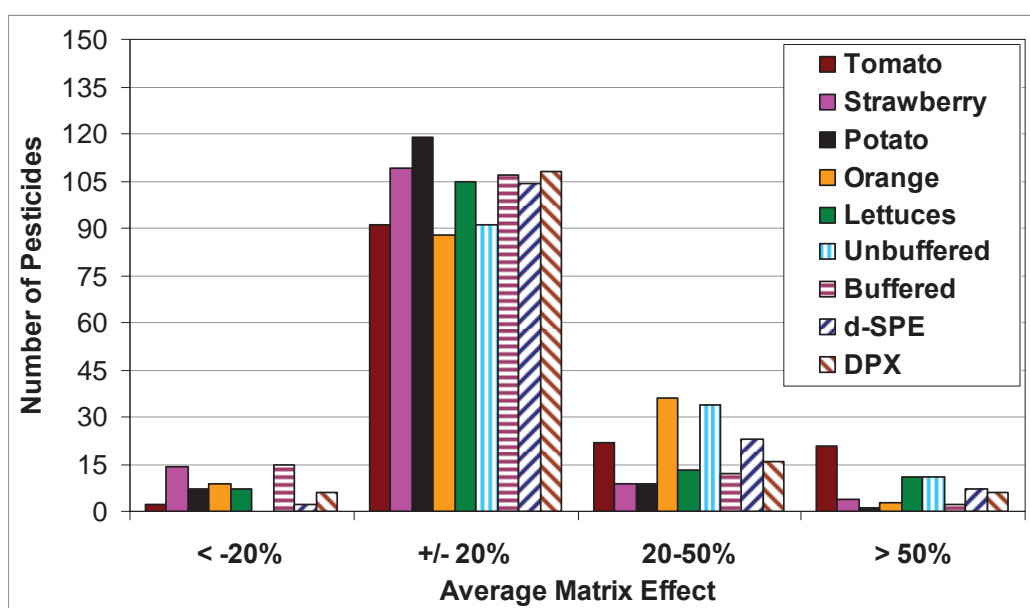
#### 2.4.2.4 ความทนทานของวิธีการ

ความทนทานของวิธีการ QuEChERS คือสารละลายที่สกัดได้จากวิธีการนี้ไม่ทำให้เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่ทำในงานประจำสปรกหรือสูญเสียมรรถนะในการตรวจวัด ในการศึกษาความทนทานของวิธีการจะทำการทดลองสกัดสารและฉีดต่อเนื่องติดต่อกันหลายวัน โดยใช้ทั้งสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างทุกเมทริกซ์ที่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป ประเมินค่าความทนทานจากค่าสัญญาณการตอบสนองของสารเทียบมาตรฐานภายในและสารที่ใช้ควบคุมคุณภาพที่เติมสารมาตรฐานลงไป ปริมาณ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ในส่วนของเครื่องมือ GC/TOFMS จะทำการดูแลปกติคือเปลี่ยน liner และตัดบริเวณช่วงต้นของ restriction capillary ประมาณ 5 ซม. ทุกๆ รอบการฉีด 96 ครั้ง (หรือ 2 วัน) และปรับตั้งค่ามาตรฐานมวลแบบอัตโนมัติ (automated MS tuning) ทุกรอบการฉีด พบว่าสารเทียบมาตรฐานภายในให้ค่าสัญญาณคงที่ และมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 25% ภายหลังการฉีด  $>430$  ครั้ง ในระยะเวลา 9 วัน และพบว่าผลการตรวจวัดจะมีค่าเบี่ยงเบนมากขึ้นเมื่อทำการตรวจวัดมะเขือเทศ และส้ม และมีสัญญาณรบกวนปรากฏมากขึ้น ตามเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่ผลการตรวจวัดยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และดีกว่าที่มีผู้เคยรายงานมาก่อน และการใช้ LP-GC/TOFMS นี้มีความทนทานกว่าการใช้วิธี GC-MS ทั่วไปที่ใช้คอลัมน์  $30\ \text{m} \times 25\ \text{mm i.d} \times 25\ \mu\text{m film}$  เพราะใน LP-GC/TOFMS ใช้คอลัมน์ขนาดใหญ่ที่มีชั้นฟิล์มของสเตชันนารีเฟสหนากว่านั่นเอง

#### 2.4.2.5 อิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์

ปริมาณของสารในเนื้อเมทริกซ์ที่ปนเข้ามาในสารสกัดนั้น จากการศึกษาที่ผ่านมาจะอยู่ที่ประมาณ <math><0.2\%</math> [4, 6, 9] หรือประมาณเท่ากับ <math><20</math> ไมโครกรัมต่อการฉีด 10 ไมโครลิตรของสารสกัดที่เริ่มต้นที่สัดส่วน 1 กรัมต่อมิลลิลิตร สารรบกวนเหล่านี้บางส่วนผ่านเข้าสู่คอลัมน์และบางส่วนจะค้างอยู่ใน liner ซึ่งสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายหลังการฉีดในแต่ละ sequence

พื้นผิวภายในของ liner จะมีส่วนที่ไวต่อปฏิกิริยาอยู่มาก และจะเกิดอันตรกิริยากับสารที่มีสภาพขั้วสูงได้ดี เนื้อเมทริกซ์ที่ไม่ระเหยบางส่วนจะไปเกาะเคลือบอยู่ด้านในปิดทับชั้นที่ว่องไวปฏิกิริยาเหล่านี้ ทำให้เนื้อเมทริกซ์นี้มีผลต่อสัญญาณการตรวจวัดอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ขึ้นกับอันตรกิริยาและชนิดของสารที่เข้ามาเกี่ยวข้อง [41, 42] ดังนั้นในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จึงมักนิยมเตรียมสารมาตรฐานในสารละลายเนื้อเมทริกซ์หรือที่เรียกว่า Matrix-matched standards เพื่อลดผลของเมทริกซ์ที่มีต่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ และจากประสบการณ์ของผู้วิจัยเทคนิค GC-MS เนื้อเมทริกซ์จะมีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์สูง ตารางที่ 2.4.1 และ รูปที่ 2.4.4 แสดงร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์ที่มีต่อสัญญาณการตรวจวัด (%ME) จากการศึกษาการตรวจวัดกราฟเทียบมาตรฐาน matrix-matched calibrations 20 ชุด ที่ทำในช่วง 10 วันติดต่อกัน และใช้เมทริกซ์ต่างชนิดกันและวิธีการเตรียม QuEChERS ที่แตกต่างกัน พบว่าผลของเมทริกซ์ในกรณีของ LP-GC/TOFMS จะเกิดขึ้นน้อยกว่ากรณีที่ใช้ GC-MS ทั่วไป อาจเป็นผลมาจากการใช้คอลัมน์สั้นและมีขนาดใหญ่และใช้การฉีดปริมาณมาก(Large Volume Injection, LVI) รวมถึงการใช้ liner แบบ wall-coated sintered glass liners สารที่มีปัญหาการวิเคราะห์เนื่องมาจากอิทธิพลของเมทริกซ์นี้ส่วนใหญ่จะวิเคราะห์ได้ดีใน LC-MS/MS แต่ยังคงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีทางเลือกในการตรวจวัดไว้ เพื่อเป็นวิธีที่สองที่สามารถนำมาใช้ในการยืนยันการตรวจพบให้มั่นใจมากยิ่งขึ้น แม้ว่าสาร 90-120 ชนิดจะมีค่า % ME อยู่ที่  $\pm 20\%$  ผู้วิจัยยังคงแนะนำให้ใช้ matrix match standard ในการตรวจวัดเชิงปริมาณ



## รูปที่ 2.4.4 การกระจายของค่าร้อยละของอิทธิพลของเนื้อเมทริกซ์ที่มีต่อสารกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจวัด ทั้ง 150 ชนิด เมื่อสกัดด้วยวิธี QuEChERS ที่แตกต่างกันและวิเคราะห์ด้วย

### 2.4.3 สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS ร่วมกับการตรวจวัดด้วย LP-GC/TOFMS ในงานตรวจวัดที่ทำเป็นประจำ สามารถตรวจวัดตัวอย่างปริมาณมากต่อวันได้ดี และเทคนิคนี้ยังมีความทนทานมากกว่าวิธีการ GC-MS ที่ใช้ในปัจจุบัน จากการทดลองตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชตกค้าง 150 ชนิดในผักและผลไม้ พบว่าทำได้ง่ายและรวดเร็วโดยใช้สารสกัดสุดท้ายขวดเดียวกับที่ใช้ในการตรวจวัดด้วย UHPLC-MS/MS ทำให้สามารถทำงานได้รวดเร็วขึ้นอีกเป็นเท่าตัว วิธีการนี้สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ 36 ตัวอย่าง ต่อวัน (คิดการทำงานวันละ 9 ชั่วโมง) โดยสมรรถนะการทำงานและประสิทธิภาพของเครื่องมือคองที่นอกจากนี้สามารถใช้บัพเฟอร์อะซิเตทในขั้นตอนการสกัดร่วมกับการใช้ d-SPE หรือ DPX ในขั้นตอนการทำความสะอาดสารละลายสกัดโดยใช้ผง MgSO<sub>4</sub>, PSA, C<sub>18</sub>, และ GCB ในการเตรียมตัวอย่างเมทริกซ์ผักผลไม้ได้ทุกชนิด การใช้บัพเฟอร์อะซิเตทในการสกัดร่วมกับขั้นตอน d-SPE จะมีข้อดีและง่ายต่อการปฏิบัติมากกว่า อีกทั้งครอบคลุมกลุ่มสารที่ไวต่อค่าการเปลี่ยนแปลง pH ที่ต้องตรวจวัดด้วยเทคนิค LC อีกด้วย [9]

ข้อจำกัดหลักอีกข้อหนึ่งของวิธีการนี้คือเวลาที่ต้องใช้ในการประมวลผลข้อมูล ซึ่งแม้ว่าสัญญาณของไอออนเป้าหมายของการตรวจวัดได้กำหนดไว้แล้ว และให้โปรแกรมของเครื่องประมวลผลทำงานโดยอัตโนมัติและอินทิเกรตหาค่าสัญญาณของแมสเทียบกับสเปกตร้าอ้างอิง แต่การตรวจทานด้วยตัวบุคคลจะได้น่าเชื่อถือมากกว่า สามารถสอบถามข้อผิดพลาดได้ดีละเอียดมากยิ่งขึ้น แต่จะเสียเวลาเป็นอย่างมาก ดังนั้นหากทำการเพิ่มสารมาตรฐานครบทั้ง 150 ชนิด และทำกับจำนวนตัวอย่างมากจะเป็นข้อเสียอย่างยิ่งของวิธีการ ซึ่งผู้วิจัยทดลองให้ผู้วิเคราะห์ตรวจวัดตัวอย่างที่ผู้วิเคราะห์ไม่ทราบค่า เพื่อทดสอบเทียบการอ่านผลจากโปรแกรมกับการอ่านผลจากผู้ทดลองซึ่งงานวิจัยนี้จะได้นำเสนอเป็นผลงานถัดไป

### 2.4.4 เอกสารอ้างอิง

1. USDA, Foreign Agricultural Service, Maximum Residue Limit Database ([www.fas.usda.gov/http/MRL.asp](http://www.fas.usda.gov/http/MRL.asp))
2. Regulation (EC) No. 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant

and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Communities L70/1, 16.3.2005 ([http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)).

3. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document No. SANCO/10684/2009.
4. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int.86 (2003) 412.
5. S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 90 (2007) 485.
6. S.J. Lehotay, K. Maštovská, A.R. Lightfield, J. AOAC Int. 88 (2005) 615 & 60A.
7. P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1697.
8. CEN Standard Method EN 15662: Food of plant origin – determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS method ([www.cen.eu](http://www.cen.eu)).
9. S.J. Lehotay, A.K. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2548.
10. K. Mastovska, K.J. Dorweiler, S.J. Lehotay, J.S. Wegscheid, K.A. Szpylka, J. Agric. Food Chem., in press (DOI:10.1021/jf9029892).
11. U. Koesukwiwat, S.J. Lehotay, K. Mastovska, K.J. Dorweiler, N. Leepipatpiboon, J. Agric. Food Chem., in press(DOI:10.1021/jf902988b).
12. U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 10.
13. B. Kmellár, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M.A. Martínez-Uroz, A. Valverde, A.R. Fernandez-Alba, J. Chromatogr. A 1215 (2008) 37.
14. A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 947.
15. J. Wang, D. Leung, J. AOAC Int. 92 (2009) 279.
16. T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovska, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 281.
17. H. Guan, W.E. Brewer, S.T. Garris, S.L. Morgan, J. Chromatogr. A in press (2010)
18. H. Guan, W.E. Brewer, S.L. Morgan, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 10531.
19. L. Nováková, H. Vlcková, Anal. Chim. Acta 656 (2009) 8.
20. J. Wang, W. Chow, D. Leung, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 1513.
21. O. Lacina, J. Urbanova, J. Poustka, J. Hajslova, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 648.
22. K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 153.
23. A. Amirav, A. Gordin, M. Poliak, A.B. Fialkov, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 141.

24. A.B. Fialkov, A. Gordin, A. Amirav, J. Chromatogr. A 991 (2003) 217.
25. J. de Zeeuw, J. Peene, H.G. Janssen, X. Lou, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 677.
26. K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová, J. Chromatogr. A 926 (2001) 291.
27. K. Mastovská, J. Hajslová, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1054 (2004) 335.
28. K. Ravindra, A.C. Dirtu, A. Covaci, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 291.
29. S.C. Cunha, J.O. Fernandes, A. Alves, M.B. Oliveira, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 119.
30. S.D.H. Poynter, R.A. Shellie, J. Chromatogr. A 1200 (2008) 28.
31. J.W. Cochran, J. Chromatogr. Sci. 40 (2002) 254.
32. J.L. Martínez Vidal, J.L. Fernández Moreno, F.J. Arrebola Liébanas, A. Garrido Frenich, J. AOAC Int. 90 (2007) 1146.
33. F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, M.J. González-Rodríguez, A. Garrido-Frenich, N. Sánchez Morito, J. Chromatogr. A 1005 (2003) 131.
34. J. de Zeeuw, J.A. Peene, R.C.M de Nijs, U.S. Patent No. 6,301,952, Oct. 16, 2001.
35. S.J. Lehotay, U. Koesukwiwat, H.G.H. Mol, H. van der Kamp, N. Leepipatpiboon, J. Agric. Food Chem, (to be submitted)
36. K. Mastovská, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 259.
37. R.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography, 4th Edition*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA, (2004) p. 237.
38. R.J.J. Vreuls, J. Dallüge, U.A.Th. Brinkman, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 613. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, 2009, Nutrient Data Laboratory Home Page: [www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl](http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl).
40. J. Bamberg, A. Kiszonas, Am. J. Potato Res., in press (DOI 10.1007/s12230-009-9120-0)
41. J. Hajslová, J. Zrostlíková, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 181.
42. D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis, C.F. Poole, J. Chromatogr. 638 (1993) 57.
43. M. Anastassiades, K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1015 (2003) 163.
44. K. Maštovská, S.J. Lehotay, Anal. Chem. 77 (2005) 8129.

### บทที่ 3

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยด้วยเมมเบรนสำหรับการวิเคราะห์ ไกลโฟเสตและ กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิกในน้ำ โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column ร่วมกับ การตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์

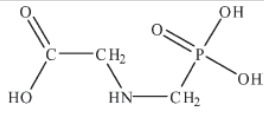
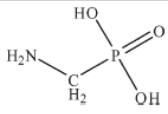
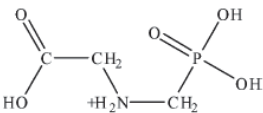
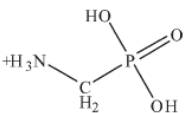
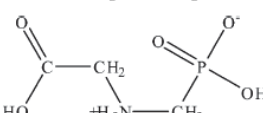
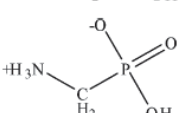
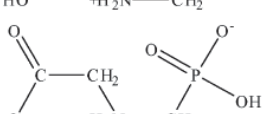
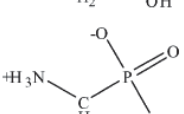
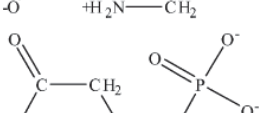
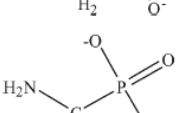
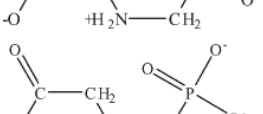
#### 3.1 บทนำ

ไกลโฟเสต (N-(phosphonomethyl) glycine) เป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดไม่จำเพาะเจาะจง มีลักษณะการใช้งานที่กว้าง มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหญ้า ไม้พุ่ม และวัชพืชชนิดต่างๆ [1] ประเทศไทยมีการนำเข้าไกลโฟเสตสูงถึง 27,000 ตันในปี 2007 และมีปริมาณการใช้สารดังกล่าวอย่างเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ ไกลโฟเสตเป็นสารกำจัดวัชพืชที่เป็นที่นิยมลำดับต้นๆ ของประเทศ [2] ไกลโฟเสตมีกลไกการทำงานคือยับยั้งเอนไซม์ enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดอะโรมาติกซึ่งเป็นสารตั้งต้นของโปรตีนหลายชนิด [3] จากสมบัติในการยับยั้งการสร้างโปรตีนในพืชและมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้ไกลโฟเสตมีการนำไปใช้งานอย่างกว้างขวางทั้งในด้านเกษตรกรรม ป่าไม้ และ ทางทะเล [4]

กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก (Aminomethylphosphonic acid, AMPA) เป็นสารเมตาโบไลต์หลักที่ได้จากการสลายตัวของไกลโฟเสต [1] ไกลโฟเสต และ AMPA เป็นสารมีขั้วและมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 3.1) สารทั้งสองชนิดสามารถตกค้างในดินและโคลนได้ในปริมาณสูงรวมทั้งมีสมบัติละลายน้ำได้ดี ทำให้สารถูกชะและสามารถตรวจพบได้ใกล้เคียงกับบริเวณที่ใช้งาน จากการที่สารแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่องทำให้เกิดการสะสมมากขึ้นในธรรมชาติ งานวิจัยเกี่ยวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมระบุว่า การได้รับสารไกลโฟเสตผ่านการรับประทานในปริมาณเพียง 1 % จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ในตับของหนูที่กำลังตั้งท้องและลูกในท้องเกิดการเปลี่ยนแปลง [5] ในการประชุมความร่วมมือระหว่าง FAO และ WHO เกี่ยวกับเรื่องสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงได้ข้อสรุปว่าทั้งกรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิกและไกลโฟเสตนั้นมีลักษณะทางพิษวิทยาที่เหมือนกัน ปริมาณสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ในร่างกายมนุษย์ต่อวันคือ 0.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว [6] แต่เนื่องจากสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อมนุษย์น้อยมาก สหภาพยุโรปกำหนดตาม 91/414/EEC ถึงปริมาณสูงสุดของสารที่ยอมให้มีตกค้างในดิน น้ำ และ อาหาร เท่ากับ 0.10 ไมโครกรัมต่อลิตร [7]

การตรวจวัดไกลโฟเสตและกรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิกเป็นงานที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ส่วนใหญ่ใช้หลักการโครมาโทกราฟี [8-14] แต่เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีสภาพขั้วสูง

ตารางที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมี ค่า pKa และสภาพที่ติดประจุของไกลโฟเสต และกรดอะมิโนเมทิล ฟอสโฟนิก (AMPA)

	Glyphosate	AMPA
General structure		
Undissociated species	H <sub>4</sub> A  pK <sub>a</sub> 0.8	H <sub>3</sub> A  pK <sub>a</sub> 0.9
1st dissociated species	H <sub>3</sub> A <sup>-</sup>  pK <sub>a</sub> 2.3	H <sub>2</sub> A <sup>-</sup>  pK <sub>a</sub> 5.6
2nd dissociated species	H <sub>2</sub> A <sup>2-</sup>  pK <sub>a</sub> 6.0	HA <sup>2-</sup>  pK <sub>a</sub> 10.2
3rd dissociated species	HA <sup>3-</sup>  pK <sub>a</sub> 11.0	A <sup>3-</sup> 
4th dissociated species	A <sup>4-</sup> 	

มาก ละลายน้ำได้ดี ทำให้การสกัดสารจากตัวอย่างเป็นไปได้ยากและมักจะได้ค่าร้อยละของการคืนกลับที่ต่ำ (low recovery) งานวิจัยในระยะหลังจึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดให้มีสภาพไวมากขึ้นและมีความเที่ยงที่ดีขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของสารมีความสำคัญต่อการตรวจวัดเนื่องจากปริมาณไกลโฟเสตและ AMPA ในตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมนั้นอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ในหน่วยของส่วนในพันล้านส่วน (part-per-billion หรือ ppb ) จนถึงส่วนในล้านส่วน (part-per-million หรือ ppm ) การกำจัดสิ่งรบกวนจากตัวอย่างที่วิเคราะห์เป็นสิ่งจำเป็นในการเพิ่มสภาพไวการตรวจวัด วิธีการสกัดทั่วไปเช่นเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย ( Liquid-Liquid Extraction) ไม่เหมาะต่อการแยกสารที่มีขั้วมาก เช่น ไกลโฟเสตและ AMPA เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารก่อนทำการวิเคราะห์ หรือเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งชนิด anion-exchange resin เช่น Amberlite IRA-900 [12], LiChrolut EN [10], หรือ PRP-X100 [14] ในการตรวจวัดทำได้โดยการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column ก่อนเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ ใช้เทคนิคคเคพิลลารีอิลเล็กโทรโฟริซิส (CE) มีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบ On-line โดยใช้ Oasis HLB Cartridges ร่วมกับการทำอนุพันธ์แบบ post-column โดยใช้ 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl) [13,15] เทคนิค Enzyme-linked sorbent immunoassay [16] และ Matrix solid-phase dispersion [17] ได้มีการนำมาใช้เตรียมตัวอย่างวิเคราะห์เช่นกัน แต่เทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษและความชำนาญของผู้

วิเคราะห์ ตารางที่ 3.2 สรุปเทคนิคที่สามารถใช้ในการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ไกลโฟเสตและ AMPA

ตารางที่ 3.2 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ไกลโฟเสต และกรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิกใน ตัวอย่างชนิดต่างๆ

Sample preparation	Enrichment method	Matrix	Analysis/detection	LOD	EF	Ref.
No	No	Waters	IEC/PCD-FLD	(G) 6.00 µg/L	N/A	[30] (EPA 547)
No	No	Water	CE/indirect FLD	(G) 1.301 µg/L, (A) 1.765 µg/L	N/A	[36]
No	No	Juices	LC/coulometric	(G) 100 µg/L	N/A	[40]
No	No	Reagent water	CE/laser induced FLD	(G) 32.2 µg/L, (A) 3.6 µg/L	N/A	[39]
SPE	Combined	Ground water	IEC/PCD-FLD	(G) 2 µg/L, (A) 4 µg/L	N/A	[10]
SPE	Combined	Natural waters	CE/UV-vis	(G) 85 µg/L, (A) 60 µg/L	N/A	[12]
SPE	Combined	Waters	CE/laser induced FLD	(G) 0.007 µg/L for reagent water, 0.270 µg/L for river water	N/A	[38]
SPE	Evaporation	Rice, soybean	GC/FPD	(G) 20 µg/L, (A) 30 µg/L	N/A	[37]
NaOH extraction, SPE	Evaporation	Ground water, soil	GC/MS	(G, A) 0.05 µg/L for water, 0.003 µg/g for soil	N/A	[8]
Online-SPE	Combined	Waters	PrCD/LC/MS	(G, A) 0.03 µg/L	N/A	[35]
Online SPE	Combined	River water	IEC/PCD-FLD	(G) 0.02 µg/L, (A) 0.1 µg/L	N/A	[14]
Online SPE	Combined	Waters, soil	PrCD/LC/MS-MS	(G, A) 0.005 µg/L for water, 5 µg/kg for soil	N/A	[13]
Online SPE	Combined	Waters	PrCD/LC/MS	(G) 0.084 µg/L	N/A	[15]
Enzyme linked sorbent immuno assay	No	Waters	PrCD/LC/MS	(G) 0.1 µg/L	N/A	[16]
Matrix solid-phase dispersion	Evaporation	Tomato	PrCD/LC/FLD	(G) 0.05 µg/g, (A) 0.03 µg/g	N/A	[17]
SLM (flat sheet)	Combined	Reagent water	CE/UV-vis	(G) 84,500 µg/L	(G) 15	[18]
SLM (flat sheet, HFM)	Combined	Reagent water	PrCD/LC/UV-vis	(G, A) 500 µg/L	(G) 8.1 (A) 2.2	[19]
SLM (flat sheet)	Combined	Juices	PrCD/LC/PCD-UV-vis	(G, A) 25 µg/L	(G, A) 7.11, 6.41 (orange); 7.21, 6.46 (grapefruit); 9.36, 8.17 (apple); 10.27, 8.92 (blackcurrant)	[20]
HF-SLMME	Combined	Waters	IEC/PCD-FLD	(G) 0.22 µg/L, (A) 3.40 µg/L	(G) 853 (A) 136	This work

PrCD = pre-column derivatization; PCD = post-column derivatization.

เทคนิคการสกัดด้วยเมมเบรนเป็นวิธีการกำจัดสิ่งรบกวนและการเพิ่มความเข้มข้นที่นำเสนอในวิธีหนึ่ง มีรายงานการใช้เมมเบรนบรรจุของเหลว (Supported liquid membrane หรือ SLM) ในการตรวจวัดไกลโฟเสตและ AMPA ในน้ำและน้ำผลไม้ [18-20] เทคนิคนี้ใช้เมมเบรนชนิดพอลิเมอร์ที่ไม่ชอบน้ำ และมีรูพรุนขนาดเล็ก ทำการบรรจุตัวทำละลายสกัดในรูพรุน เมมเบรนดังกล่าวจะใช้กั้นระหว่างเฟสสารตัวอย่างที่เป็นของเหลว (sample aqueous phase) กับ เฟสของเหลวของสารละลายสกัดตัวรับ (aqueous acceptor phase) โดยสารละลายอินทรีย์ที่อิมัลชันอยู่ในเมมเบรนนั้นจะมีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์สามารถแยกจากสารตัวอย่างผ่านเมมเบรนเข้าสู่สารละลายตัวรับ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูง สามารถกำจัดสิ่งรบกวนและเพิ่มความเข้มข้นได้ในขั้นตอนเดียว

การเติมสารประเภท ion-paring หรือ chelating ให้รวมตัวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ จะเป็นการเพิ่มความจำเพาะในการวิเคราะห์สารและเพิ่มการถ่ายเทมวลในเมมเบรนที่บรรจุของเหลว เพราะสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสภาพเป็นกลางจะสกัดเข้ามาในตัวทำละลายได้ง่ายกว่า สารประเภทนี้ ได้แก่ diethylhexyl phosphoric acid, 8-hydroxyquinoline, และ Aliquat-336 สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะส่งผ่านเข้าสู่สารละลายตัวรับได้เมื่อสภาวะของสารละลายตัวรับเหมาะสมต่อการจับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เทคนิคการสกัดแบบนี้เรียกว่า เทคนิคการสกัดโดยใช้เมมเบรนแบบอาศัยสารตัวพา (carrier-mediated membrane extraction) เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารมีขั้วสามารถสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารได้ในเวลาเดียวกัน [21]

Dzygiel และ Wieczorek ศึกษาการสกัดไกลโฟเสตด้วยเมมเบรนบรรจุของเหลว [18] และรายงานกลไกการสกัดของไกลโฟเสตผ่านเมมเบรน รวมถึงอธิบายตัวแปรที่มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร โดยใช้เมมเบรนบรรจุของเหลวชนิดแผ่น (planar liquid membrane module) แต่งานวิจัยดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องของการรบกวนการตรวจวัดที่ใช้เทคนิคอะตอมสเปกโตรโฟลโรมิส ทำให้ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดไม่ต่ำเพียงพอ ต่อมา Rios และคณะ [19] ได้ใช้ เทคนิคเดียวกันในการเพิ่มความเข้มข้นไกลโฟเสตและ AMPA ในน้ำตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบการใช้เมมเบรนที่มีลักษณะต่างกันสามชนิดและศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดเพื่อประโยชน์ในทางวิศวกรรม ค่าการเพิ่มความเข้มข้นที่ดีที่สุดสำหรับไกลโฟเสตคือ 19 เท่า และ 25 เท่าสำหรับ AMPA วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดคือใช้อุปกรณ์ขนาดใหญ่รวมทั้งต้องอาศัยปั๊มและการสั่นเพียงพอที่จะทำให้เกิดการไหล

สำหรับงานวิจัยนี้จะพัฒนาการตรวจวัดไกลโฟเสตและ AMPA โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวภายในและใช้สารตัวพาช่วยในการสกัด เทคนิคดังกล่าวรวมขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวน และการเพิ่มความเข้มข้น ไว้ในขั้นตอนเดียว เมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงสะดวกต่อการวิเคราะห์มากกว่าเมมเบรนชนิดแผ่น มีราคาถูกและเพิ่มความเข้มข้นได้สูง สามารถตรวจวัดในระดับความเข้มข้นต่ำได้ เทคนิคนี้เคยมีผู้นำไปใช้ในการตรวจวัด haloacetic acids [22] triphenylphosphine oxide [23] ยาตกค้าง เช่น salbutamol กับ terbutaline [24] และ trihalomethanes [25] ในตัวอย่างต่างๆ อาทิเช่น น้ำ สารออกฤทธิ์ในยา และปัสสาวะ เทคนิคดังกล่าวนอกจากจะเป็นการลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแล้ว ยังให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความคลาดเคลื่อนต่ำ เพิ่มความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์ งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการรวมถึงนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นไปใช้กับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

## 3.2 การทดลอง

### 3.2.1 สารเคมีและอุปกรณ์

ไกลโฟเสต (CAS No. 1071-83-6, ความบริสุทธิ์ 99.2%) จาก Riedel-de Hën (Seelze, Germany) กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิค (AMPA, CAS No. 1066-51-9, purity 99.0%) จาก Fluka (Buchs, Switzerland) สารละลายตั้งต้นแต่ละชนิดจะเตรียมที่ความเข้มข้น 1.00 กรัมต่อลิตร ในน้ำบริสุทธิ์จากระบบ Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น สารละลายสำหรับใช้งานเตรียมใหม่ทุกวันโดยการเจือจางสารละลายตั้งต้นด้วยน้ำบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ สารละลายมาตรฐานทุกชนิดบรรจุในขวดพลาสติก สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

- โปแทสเซียมเตตระโบเรตเตตระไฮเดรต ไตรคาบิลเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (Aliquat-336) และ di-*n*-hexylether เกรดสำหรับการวิเคราะห์ ของบริษัท Fluka

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมคลอไรด์ และ กรดฟอสฟอริก ของบริษัท Merck (Darmstadt, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริก เกรดสำหรับการวิเคราะห์ ของบริษัท Fisher Scientific(Loughborough, LE, UK)
- Thiofluor® and o-phthalaldehyde (เกรดสำหรับโครมาโทกราฟี) ของบริษัท Pickering Laboratories(Mountain View, CA, USA)
- เมทานอล และ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ของบริษัท J.T. Baker (Deventer, The Netherlands)

### 3.2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column

ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวรุ่น HP 1100 series (Agilent Technologies) ประกอบด้วย ระบบไล่ฟองอากาศอัตโนมัติ (automatic degasser) ป้อนสำหรับสูบของเหลวแบบ binary pump ระบบฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (autosampler) และ เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ ใช้ความยาวคลื่นในการกระตุ้น คือ 330 nm และ ความยาวคลื่นในการคายแสง คือ 465 nm ระบบโครมาโทกราฟีนี้เชื่อมต่อกับอุปกรณ์เตรียมอนุพันธ์ชนิด post-column (PCX5200, Pickering Laboratories) การแยกสารจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์ประเภท cation-exchange (PN 1954150) ที่เชื่อมต่อกับ guard column (PN 1953020) จาก Pickering Laboratories ใช้ระบบควบคุมอุณหภูมิ การแยกที่ 55 องศาเซลเซียส และระบบการแยกสารแบบ isocratic คือ มีอัตราการไหลของสารคงที่ เท่ากับ 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที เริ่มจากการใช้สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2 ไหลเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจะเปลี่ยนมาใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำให้คอลัมน์เข้าสู่ภาวะสมดุลโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2 ไหลเข้าสู่ระบบจนสัญญาณที่ได้หนึ่ง ระบบนี้ใช้ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบเท่ากับ 5.0 ไมโครลิตร และในการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column จะเริ่มจากนำตัวอย่างออกซิไดส์ (โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.950 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 9.50 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.950 กรัม น้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100.0 ไมโครลิตร) มาทำการไฮโดรไลส์ไกลโฟเสต ตามด้วยการเตรียมสารให้อยู่ในรูปอนุพันธ์โดยใช้ o-phthalaldehyde (OPA) และ Thiofluor® (โพแทสเซียมเตตระโบเรตเตตระไฮเดรต 67.10 กรัม Thiofluor® 2.00 กรัม น้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร สารละลาย OPA ในเมทานอล 0.1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) สำหรับ AMPA นั้นไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลส์ อุปกรณ์การเตรียมอนุพันธ์จะเชื่อมต่อกับระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยมีอัตราการไหลอยู่ที่ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส [28] สารที่ใช้เป็นตัวออกซิไดส์และ OPA จะเตรียมใหม่ทุกวัน

### 3.2.3 การสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนที่บรรจุของเหลว

การสกัดระดับจุลภาคนี้ใช้เมมเบรน Accurel® PP Q3/2 (Membrana GmbH, Wuppertal, Germany) ซึ่งเป็นเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่มีรูพรุนระดับจุลภาค (micro-porous hollow fiber membrane) มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.6 มิลลิเมตร ความหนาของผนังเมมเบรน 0.2 มิลลิเมตร มีขนาดรูพรุนเฉลี่ย 0.2 ไมโครเมตร และค่าความพรุนเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ เมมเบรนเส้นใยกลวงนี้จะทำการตัดเป็นท่อนและนำไปแช่ในสารตัวทำละลาย (ผสมระหว่าง Aliquat-336 และ สารละลายอินทรีย์ที่เลือกใช้) ขำคั้น จากนั้นใช้หลอดฉีดยาเป่าอากาศเข้าไปภายในท่อกลวงของเมมเบรนเพื่อกำจัดสารละลายส่วนเกินออก และนำเอาปลายแต่ละข้างของเมมเบรนเส้นใยกลวงแขวนกับฝาของขวดโดยสอดเมมเบรนเข้ากับปลายเข็มฉีดยาที่ฝาในลักษณะรูปตัว U นำไปจุ่มลงในขวดแก้ว ขนาด 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายตัวให้ (สารตัวอย่าง) ทำการบรรจุสารละลายตัวรับเข้าสู่ท่อ กลวงตรงกลางของเมมเบรนด้วยหลอดฉีดยาขนาด 100 ไมโครลิตร (Gastight, Renu, NV, USA) รูปแบบของเมมเบรนที่ใช้ทดลองจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับรูปแบบที่ใช้ในงานวิจัยของ Pedersen-Bjergaard และ Rasmussen [29] อุปกรณ์ทดลองจะใช้เครื่องวอร์เทค (vortex machine: Model G-5605, Scientific Industries, NY, USA) ในการคนสารแทนการใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stir bar) เพื่อป้องกันสิ่งรบกวนและการปนเปื้อน ระบบการสกัดนี้ทำที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อเสร็จสิ้นการสกัด จะนำปลายด้านหนึ่งของเส้นใยกลวงจุ่มลงในขวดสำหรับการวิเคราะห์ที่บรรจุหลอดแก้วเล็กขนาด 200 ไมโครลิตรไว้ภายใน ใช้หลอดฉีดยาเป่าอากาศเข้าไปในปลายท่อกลวงอีกด้านหนึ่งของเมมเบรน เพื่อไล่สารละลายตัวรับลงสู่ขวดเพื่อตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อไป สารที่ได้จากขั้นตอนดังกล่าวสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อได้โดยตรง และเส้นใยกลวงที่ใช้ทดลองจะใช้เพียงครั้งเดียว

### 3.3 ผลการทดลองและการอภิปรายผล

การวิเคราะห์สารไกลโฟเสตและ AMPA ในตัวอย่างจากธรรมชาติมีความยุ่งยาก ซับซ้อน เนื่องจากสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสาร มีการใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ หลากหลายดังสรุปในตารางที่ 3.2 โดยวิธีวิเคราะห์ที่นิยมมากที่สุดคือ การเปลี่ยนสารให้อยู่ในรูป อนุพันธ์ก่อนเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) ร่วมกับการใช้เทคนิคอื่นๆ ในการตรวจวัด เทคนิคการเปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ จะต้องมีการกำจัดการที่ใช้สร้างอนุพันธ์ที่เป็นส่วนเกินออก โดยการใช้เทคนิคอื่นเพิ่มเติม เช่น การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) ทำให้กระบวนการดังกล่าวมี หลายขั้นตอนและใช้เวลานาน ในขณะที่อีกเทคนิคหนึ่งเป็นการเปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปอนุพันธ์หลังผ่าน ออกจากคอลัมน์ (post-column derivatization) ร่วมกับคอลัมน์ประเภท cation-exchange เพื่อการ เพิ่มประสิทธิภาพและความจำเพาะในการตรวจวัดตามวิธีการของ USEPA (USEPA method 547) ทำให้ได้สภาพไวในการตรวจวัดที่ดีขึ้น และทำได้ง่ายกว่า แต่ยังมีข้อเสียคือ สภาพไวในการตรวจวัดที่ ไม่มาก และการรบกวนการตรวจวัดจากตัวอย่างวิเคราะห์ อีกทั้งต้องมีเครื่องมือพิเศษเข้ามาเสริมด้วย

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลว ( $\mu$ -SLME) ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เทคนิคการสกัด SLME เป็นแบบ non-exhaustive ประสิทธิภาพของการสกัดจะไม่ขึ้นกับค่าร้อยละของการคืนกลับ แต่จะขึ้นกับค่าประสิทธิภาพของการสกัด (Extraction efficiency, EE) หรือค่าการเพิ่มความเข้มข้นของสาร (Efficiency factor, EF)

$$EE = \frac{C_a}{C_d} = \frac{n_a V_d}{n_d V_a} \quad (1)$$

$$EF = \frac{m_a}{m_d} = \frac{C_a V_a}{C_d V_d} = EF \frac{V_a}{V_d} \quad (2)$$

ค่า  $C_a$  และ  $C_d$  คือ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวรับ (a) และสารละลายตัวให้ (d)

$n_a$  และ  $n_d$  คือ จำนวนโมลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวรับ (a) และสารละลายตัวให้ (d)

$m_a$  และ  $m_d$  คือ จำนวนมวลทั้งหมดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวรับ (a) และสารละลายตัวให้ (d)

$V_a$  และ  $V_d$  คือ ปริมาตรของสารละลายตัวรับ (a) และสารละลายตัวให้ (d)

หากต้องการให้วิธีการมีประสิทธิภาพของการสกัด (EE) สูง ต้องพยายามทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวไปสู่สารละลายตัวรับในได้มากที่สุด สมการที่ (2) จะใช้สำหรับการทำนายค่า EF ค่านี้จะมากหรือน้อยขึ้นกับการปรับเปลี่ยนสัดส่วนปริมาตรระหว่างสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ โดยสัดส่วนปริมาตรดังกล่าวสามารถมีค่าได้ถึง 1000 หรือมากกว่า เนื่องจากเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงมีขนาดเล็กมาก ทำให้เทคนิคนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารได้สูงมาก

### 3.3.1 สารตัวพา (Carrier)

สารไกลโฟเสต และ AMPA เป็นสารที่มีทั้งประจุบวกและลบในโครงสร้าง (zwitterions) สารทั้งสองจะอยู่ในรูปประจุลบที่ค่า pH ปกติของน้ำธรรมชาติ (ตารางที่ 3.1) Aliquat-336 เป็นเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่นำมาใช้เป็นสารตัวพาเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการสกัดสารโดย Aliquat-336 จะบรรจุอยู่ในเมมเบรน ซึ่งกลไกการสกัดไกลโฟเสตและ AMPA เมื่อ Aliquat-336 บรรจุอยู่ คือ จะเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างหมู่ฟังก์ชันที่มีทั้งประจุบวกและลบของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับคลอไรด์ไอออนของสารตัวพา สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะผ่านเมมเบรนและจะเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนอีกครั้งที่บริเวณรอยต่อระหว่างเมมเบรนและสารละลายตัวรับ เพื่อส่งผ่านคลอไรด์ไอออนกลับสู่บริเวณเดิม Aliquat-336 จับคู่ไอออนกับกรดอะมิโนหรือสารประกอบอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนได้ดี ทำให้มีความจำเพาะสูงในการสกัดไกลโฟเสตและ

AMPA ลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งสำหรับ Aliquat-336 คือจะอยู่ในรูปประจุบวกเสมอในทุกค่า pH ทำให้มีความเหมาะสมกับวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้น

### 3.3.2 การเลือกชนิดของเหลวที่บรรจุที่ผนังเมมเบรน (Selection of the membrane liquid)

ชนิดของเหลวที่บรรจุในผนังเมมเบรนมีความสำคัญมากในการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในการทดลองนี้เลือกตัวใช้ทำละลาย 4 ชนิด คือ dodecane, dodecane ร่วมกับ dodecanol, kerosene และ di-n-hexyl ether บรรจุที่ผนังเมมเบรน และใช้สารละลายตัวรับ คือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ และใช้ Aliquat-366 เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวพา แซ่เมมเบรนเส้นใยกลวงลงในสารละลายต่างๆ ที่กำหนดข้างต้น เพื่อให้ของเหลวนั้นซึมเข้าไปในผนังเมมเบรนก่อนนำไปใช้สกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์จากละลายมาตรฐานที่มีค่า pH 11 โดยของเหลวที่บรรจุในเมมเบรนจะต้องมีสมบัติดังนี้คือ มีความสามารถในการละลายได้ต่ำทั้งในสารละลายตัวรับและสารละลายตัวให้ ต้องมีความหนืดเพียงพอที่จะบรรจุอยู่ในรูพรุนของเมมเบรนได้ และยอมให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ส่งผ่านได้ สมบัติอื่นๆ ได้แก่ มีความสามารถในการระเหยเป็นไอต่ำ มีความเข้ากันได้กับเมมเบรน สามารถละลายสารตัวพาได้ดี รวมถึงเหมาะสมกับเทคนิคที่ใช้ตรวจวัด ผลการทดลองพบว่าค่าความเที่ยงจะดีที่สุดเมื่อใช้ di-n-hexyl ether เป็นตัวทำละลายบรรจุในผนังเมมเบรน

### 3.3.3 การเลือกสารละลายตัวให้ (Selection of the donor)

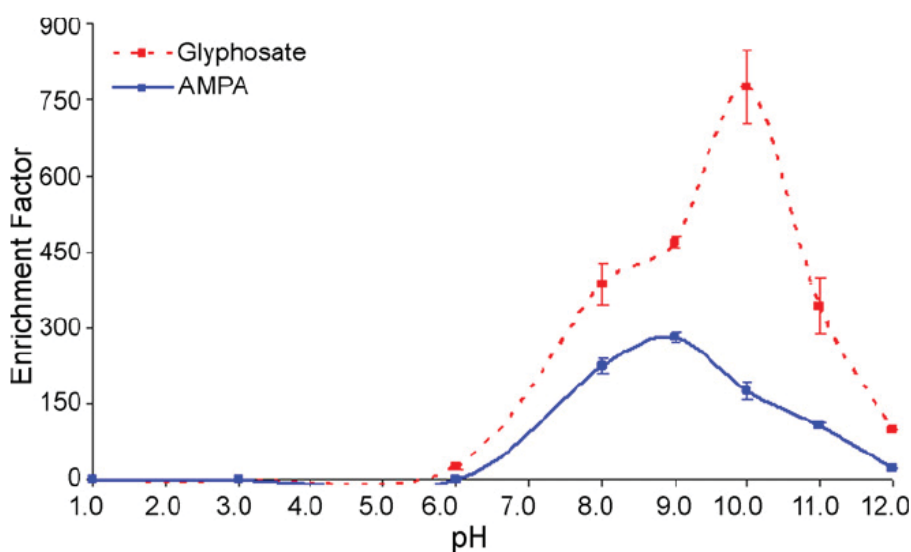
ในกรณีที่ต้องการส่งผ่านสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีประจุลบเข้าสู่เมมเบรน จะต้องเลือกใช้ลิแกนด์ที่มีประจุบวกเพื่อมารวมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนข้ามผ่านเมมเบรนไปสู่สารละลายตัวรับได้ ค่า pH ของสารละลายตัวให้ต้องปรับให้ทั้งสารที่ต้องการวิเคราะห์ และลิแกนด์อยู่ในรูปที่มีประจุ เพื่อมาเชื่อมรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนให้ได้มากที่สุด รูปที่ 3.1 แสดงการเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสตและ AMPA เมื่อปรับค่า pH ของสารละลายตัวให้ ตั้งแต่ 1 ถึง 12 และพบว่าความเข้มข้นจะมีค่าสูงเมื่อ pH มีค่ามากกว่า 8.0 ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการแตกตัวของไกลโฟเสตและ AMPA สามารถแสดงเป็นรูปกราฟได้โดยใช้สมการ fractional composition ของ กรดโพลีโปรติก ( $H_nA$ )

$$\alpha_{H_{n-j}A} = \frac{K_1 K_2 \dots K_j [H^+]^{n-j}}{D} \quad (3)$$

เมื่อ  $K_n$  = ค่าคงที่การแตกตัวของกรด;

$$D = [H^+]^n + K_1 [H^+]^{n-1} + K_1 K_2 [H^+]^{n-2} + K_1 K_2 K_3 \dots K_{n-1} ;$$

$\alpha$  = สัดส่วนการแตกตัวของกรดโพลีโปรติก



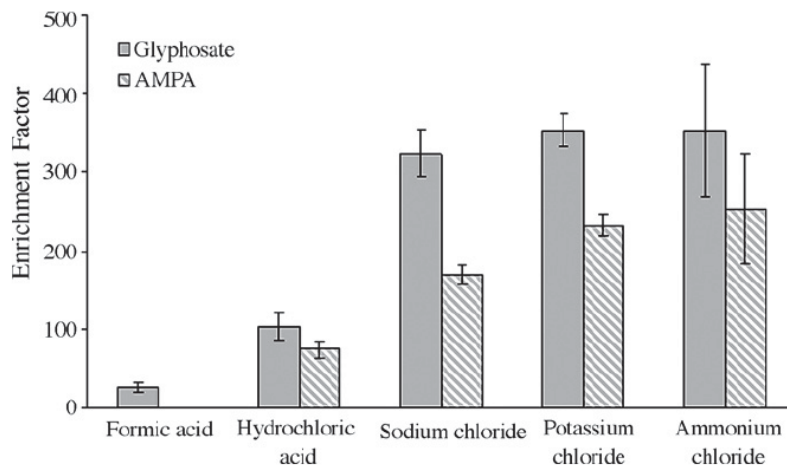
รูปที่ 3.1 ผลของค่า pH ของสารละลายตัวให้ต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร  $V_d$  20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร  $V_a$  30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.20 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที

สารจะอยู่ในรูปประจุและเกิดพันธะกับสารตัวพา Aliquat-336 ได้ดีที่สุดที่ค่า pH 10 สามารถเพิ่มความเข้มข้นและได้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของสารจะลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้น และสารละลายตัวให้บริเวณรอบๆ เมมเบรนจะขุ่นขึ้น Aliquat-336 เป็นเกลือแอมโมเนียมที่ไม่ละลายน้ำและมีประจุเป็นบวกในทุกค่า pH เมื่อสารละลายตัวให้อยู่ในสภาวะที่มีความเป็นเบสสูง มีไฮดรอกไซด์ไอออนปริมาณมาก เมมเบรนของเหลวที่บรรจุด้วย Aliquat-336 ที่ละลายใน di-n-hexyl ether จะเสียสภาพเนื่องจากทั้ง Aliquat-336 และ di-n-hexyl ether มีค่าการละลายในน้ำต่ำ ทำให้สังเกตเห็นสารละลายขุ่นขึ้น ดังนั้นค่า pH ของสารละลายตัวให้ที่เหมาะสมที่สุดคือ 9.0 เนื่องจากให้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสูงสุดและ มีค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำซ้ำต่ำที่สุด และมีการสูญเสียของเหลวภายในเมมเบรนกับตัวพาน้อยที่สุด

### 3.3.4 การเลือกสารละลายตัวรับ (Selection of the acceptor)

เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ส่งผ่านไปจนถึงบริเวณรอยต่อระหว่างเมมเบรนกับสารละลายตัวรับ สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวต้องเกิดการเปลี่ยนรูป เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายลงในสารละลายตัวรับและโมเลกุลของตัวพาจะเคลื่อนที่กลับสู่บริเวณเดิมเพื่อกลับไปรับสารที่ต้องการวิเคราะห์มาส่งถ่ายให้กับสารตัวรับอีกครั้ง สำหรับ Aliquat-336 สารประกอบเชิงซ้อนของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุผ่านกลไกการแลกเปลี่ยนไอออนกับคลอไรด์ไอออนที่บริเวณรอยต่อระหว่างเมมเบรนกับสารละลายตัวรับ [18] เป็นผลให้สารที่

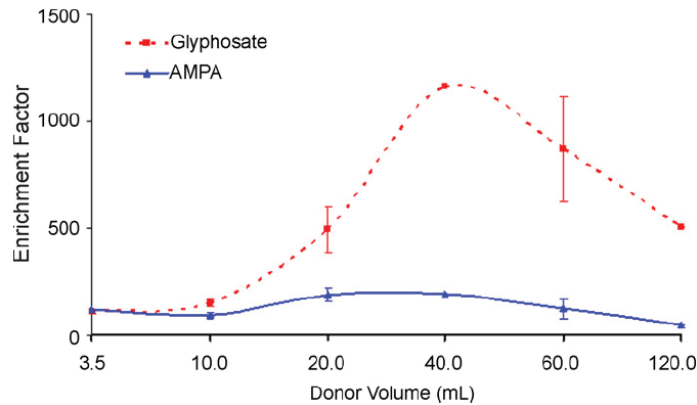
ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่สารละลายตัวรับ และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างคลอไรด์และสารตัวพาจะแพร่กลับไปยังรอยต่อระหว่างเมมเบรนและสารละลายตัวให้ ซึ่งคลอไรด์ไอออนจะเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนกับโมเลกุลของสารที่จะวิเคราะห์ตัวใหม่ ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์กับ Aliquat-336 อีกครั้ง กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นซ้ำๆ ในการศึกษาชนิดของสารละลายตัวรับพบว่า เมื่อใช้กรดฟอสฟอริกเป็นสารละลายตัวรับจะไม่เกิดการเพิ่มความเข้มข้นของสารมากเท่ากับระบบอื่นที่มีคลอไรด์ไอออนเป็น counter-ion ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออนเป็นปัจจัยหลักที่ผลักดันให้เกิดการเพิ่มความเข้มข้นจนระบบเข้าสู่สมดุล การใช้เกลือคลอไรด์จะทำให้กระบวนการดังกล่าวเกิดได้ดี เมื่อใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นสารละลายตัวรับ ค่า pH จะเข้าใกล้ศูนย์ทำให้ไกลโฟเสต และ AMPA อยู่ในรูปประจุน้อยลง ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำลดลง (ที่บริเวณรอยต่อระหว่างเมมเบรนกับสารละลายตัวรับ) การเพิ่มความเข้มข้นจึงลดลงด้วย ค่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารจะดีที่สุดเมื่อใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์เป็นสารละลายตัวรับ



**รูปที่ 3.2** ผลของชนิดตัวรับต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร  $V_d$  20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร  $V_a$  30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที

### 3.3.5 สัดส่วนปริมาตรของสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ (Phase ratio)

สมการที่ 2 อธิบายถึงประสิทธิภาพการสกัดซึ่งแปรผันตรงกับอัตราส่วนของปริมาตรสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ ( $V_d/V_a$ ) รูปที่ 3.3 และ 3.4 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการปรับเปลี่ยนค่า  $V_d$  และ  $V_a$  เมื่อใช้เวลาในการสกัดเท่ากัน ค่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารจะสูงขึ้นเมื่อ  $V_d$  มาก และ  $V_a$  น้อยในขณะที่ระบบอยู่ในสภาวะสมดุล ซึ่งสามารถอธิบายได้จากกรดข้อที่หนึ่งของ Fick

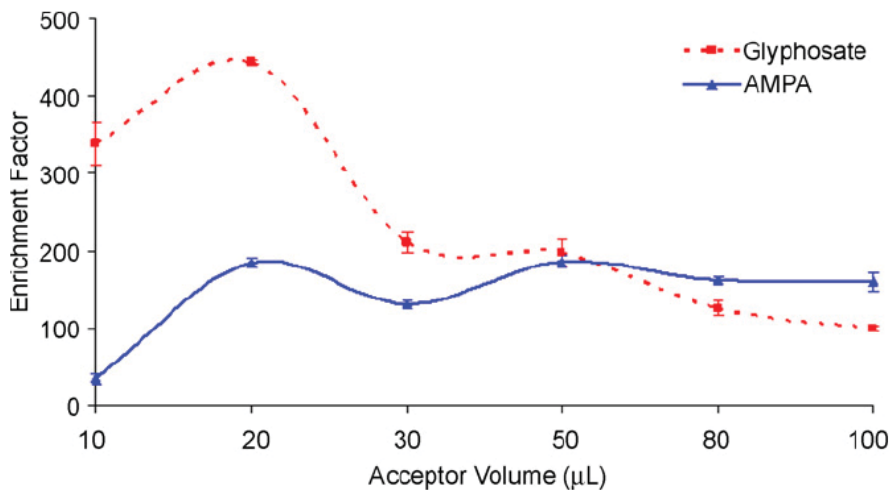


**รูปที่ 3.3** ผลของปริมาตรตัวให้ต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: โกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0; สารละลายตัวรับ: โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร  $V_a$  20 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที

$$J = D \frac{dc}{dx} = \frac{DA(c_{is} - c_{ii})}{L} \quad (4)$$

เมื่อ  $J$  = อัตราการการส่งผ่าน ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );  $D$  = สัมประสิทธิ์การแพร่ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ );  $\frac{dc}{dx}$  = ความแตกต่างของความเข้มข้น;  $c_{is}$  = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์บริเวณผิวนอกของเมมเบรน;  $c_{ii}$  = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในท่อกวของเมมเบรน;  $A$  = พื้นที่ผิวของการแพร่;  $L$  = ความหนาของเมมเบรน

เมื่อ  $V_d$  มากขึ้นและค่า  $V_a$  น้อยลงจะทำให้ความแตกต่างของความเข้มข้นเพิ่มขึ้น มีผลให้เกิดอัตราการส่งผ่านมากขึ้น เมื่อ  $V_d$  เพิ่มขึ้นในขณะที่  $V_a$  คงที่ (20 ไมโครลิตร) ความแตกต่างกันของความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้น ส่งผลต่ออัตราการส่งผ่านและการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น แต่ถ้าปริมาตร  $V_d$  เพิ่มขึ้นมากกว่า 40 มิลลิลิตร เวลาที่ใช้ในการสกัดนั้นจะไม่เพียงพอที่จะทำให้ระบบเข้าสู่สภาวะสมดุล ทำให้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นลดลงและเกิดความคลาดเคลื่อนในการทำซ้ำสูงขึ้น และเมื่อทำการศึกษาค่า  $V_a$  โดยใช้เส้นใยกลวงที่มีขนาดที่ต่างกัน และบรรจุปริมาตรของสารละลายตัวรับที่ต่างกัน พบว่าแนวโน้มที่ได้เป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม เมื่อค่า  $V_a$  เพิ่มขึ้นในขณะที่  $V_d$  คงที่ 20 มิลลิลิตร ทำให้ความแตกต่างของความเข้มข้นลดลง และเป็นผลทำให้อัตราการส่งผ่านน้อยลง และความเพิ่มความเข้มข้นต่ำลง ค่าการเพิ่มความเข้มข้นจะมีค่าเหมาะสมเมื่อใช้  $V_a$  เท่ากับ 20 ไมโครลิตร เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการส่งผ่านมวลและพื้นที่ผิวของการแพร่ พบว่าการใช้เส้นใยกลวงที่มีขนาดสั้นในการบรรจุสารละลายตัวรับปริมาตร 10 ไมโครลิตร จะมีพื้นที่ผิวของการแพร่ไม่เพียงพอต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์และนำไปสู่การเพิ่มความเข้มข้นที่ลดลง



**รูปที่ 3.4** ผลของปริมาตรตัวรับต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร  $V_d$  20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โปแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์; เวลาสกัด 45 นาที

### 3.3.6 การถ่ายเทมวล (Mass transfer)

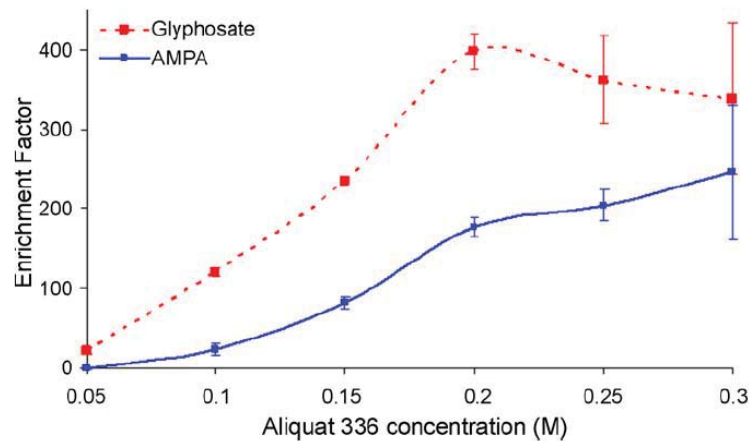
การเขย่าด้วยความเร็วที่แตกต่างกันจะเป็นการเพิ่มความแตกต่างของมวลจากค่าความเข้มข้นที่แตกต่างกันของตลอดผิวของเมมเบรน การเขย่าจะใช้อุปกรณ์ชนิด vortex สั่นที่ระดับ 1 ถึง 8 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการสั่นที่ระดับ 3 จะได้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด และมีค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำซ้ำต่ำ ที่ระดับการสั่นสูงๆ นั้น ค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำซ้ำจะสูงและสารละลายจะขุ่น การสั่นสารละลายตัวให้ด้วยอัตรามากเกินไปจะทำให้ลายระบบของเมมเบรนที่บรรจุของเหลวไว้ภายใน ทำให้ของเหลวภายในเมมเบรนและสารตัวพาเกิดการรั่วซึม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การสั่นที่ระดับ 3

### 3.3.7 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวพา (Optimizing carrier concentration)

ความเข้มข้นของสารตัวพามีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้น โดยที่ค่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารจะมากที่สุดเมื่อใช้สารตัวพาเข้มข้น 0.20 โมลาร์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่านี้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นจะค่อยๆ ลดลง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยที่เคยนำเสนอก่อนหน้านี้ [18,31] อัตราการส่งผ่านของสารที่ทำการวิเคราะห์ขึ้นกับความหนาของเมมเบรนและความแตกต่างของความเข้มข้น ดังสมการที่ 4 สัมประสิทธิ์การแพร่ (D) ขึ้นอยู่กับความหนืด ตามสมการของ Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

ซึ่ง  $k$  = ค่าคงที่ของ Boltzmann,  $T$  = อุณหภูมิสัมพัทธ์,  $a$  = รัศมีของตัวถูกละลาย (solute radius),  $\eta$  = ความหนืดของสารละลาย จากสมการเมื่อความเข้มข้นของสารตัวพาเพิ่ม ความหนืดของของเหลวในเมมเบรนจะเพิ่มขึ้นด้วย เป็นผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่และอัตราการถ่ายเทมวลลดลง ดังนั้นจึงต้องแช่เมมเบรนในสารละลายตัวพาข้ามคืนก่อนนำมาใช้สกัด เนื่องจากเมมเบรนยังไม่อิ่มตัวด้วยสารละลายที่บรรจุในรูปทรงอย่างเต็มที่จะทำให้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นที่ได้ไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 3.5)



**รูปที่ 3.5** ผลของความเข้มข้นของตัวพาต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร  $V_d$  20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โพลีเอทิลีนออกไซด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร  $V_a$  30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether; เวลาสกัด 45 นาที

### 3.3.8 เวลาที่ใช้ในการสกัด (Extraction time)

เมื่อนำเอาเส้นใยกลวงที่มีสารละลายตัวรับบรรจุอยู่ในท่อกลวงไปจุ่มลงในขวดสกัดที่มีสารตัวอย่าง (สารละลายตัวให้) บรรจุอยู่ ทำการสกัดในระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากผลในตารางที่ 3.6 พบว่าเวลาการสกัดที่ทำให้ได้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 60 นาที เมื่อสกัดมากกว่า 60 นาที ค่าความคลาดเคลื่อนในการทำซ้ำจะดีขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่เหมาะสมกับเวลาที่ต้องใช้มากขึ้นอีกหนึ่งเท่า ทั้งนี้เนื่องจากการสกัดชนิด non-exhaustive ต้องอาศัยเวลาเพื่อให้ระบบเข้าสู่สมดุล และเกิดการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสทั้งสองอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นเวลาที่ใช้เพื่อให้ระบบเข้าสู่สมดุลจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

### 3.3.9 การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ร่วมกับการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column (HPLC analysis with post-column derivatization)

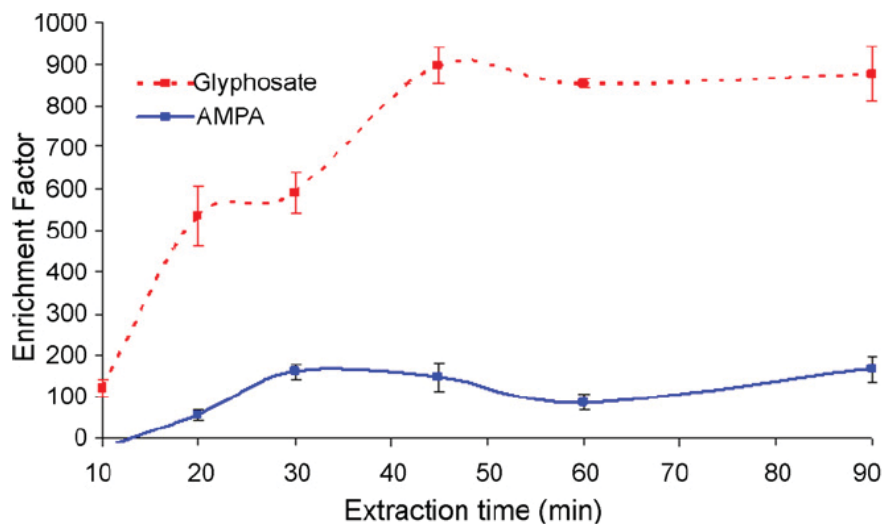
สภาพไฟในการตรวจวัดมีความสำคัญต่อการวิเคราะห์สารตกค้าง สารไกลโฟเสต และ AMPA นั้นเป็นสารขนาดเล็กโมเลกุลเล็กที่มีสภาพไอออนิกสูง มีค่าการระเหยเป็นไอต่ำ และไม่มี

โครงสร้างดูดกลืนแสง (chromophore) การตรวจวัดสารทั้งสองชนิดจึงทำได้ยาก โดยเฉพาะในระดับความเข้มข้นต่ำหรือในสารตัวอย่างที่มีความซับซ้อน การเตรียมอนุพันธ์ชนิด pre- หรือ post-column จึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิด แต่การเตรียมอนุพันธ์ชนิด pre-column จะใช้เวลานานและอาจมีสิ่งรบกวนการวิเคราะห์หลงเหลืออยู่ จึงต้องมีขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวนก่อนจะนำไปวิเคราะห์ งานวิจัยนี้เลือกใช้การเตรียมอนุพันธ์ชนิด post-column ซึ่งเป็นวิธีการที่ USEPA ให้การยอมรับ สำหรับการวิเคราะห์ไกลโฟเสตในน้ำ เทคนิค HPLC ร่วมกับการทำอนุพันธ์แบบ post-column มีการนำเอาโซเดียมไฮโปคลอไรต์มาใช้แทนแคลเซียมไฮโปคลอไรต์เพื่อลดปัญหาการอุดตันที่อาจเกิดขึ้นได้ในบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการสร้างอนุพันธ์ นอกจากนี้ ยังใช้ Thiofluor® (N,N-dimethyl-2-mercaptoethylamine hydrochloride) แทน 2-mercaptoethanol ในการเตรียมสาร OPA เพื่อให้ได้ โมเลกุลที่ดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorophore) ที่เสถียรยิ่งขึ้น [32] หลังจากที่ไกลโฟเสตซึ่งเป็น secondary amine ผ่านออกมาจากคอลัมน์แล้วจะถูกออกซิไดส์ด้วยไฮโปคลอไรต์ ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เกิดเป็นไกลซีน เข้าทำปฏิกิริยากับ Thiofluor® และ OPA เกิดเป็นอนุพันธ์ ฟลูออเรสเซนต์ ไอโซอินโดล (fluorescence isoindole) ส่วน AMPA ซึ่งเป็น primary amine อยู่แล้วสามารถทำปฏิกิริยากับ Thiofluor® และ OPA ได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการไฮโดรไลซ์ ปฏิกิริยาของการเตรียมอนุพันธ์ post-column แสดงในรูปภาพที่ 3.7

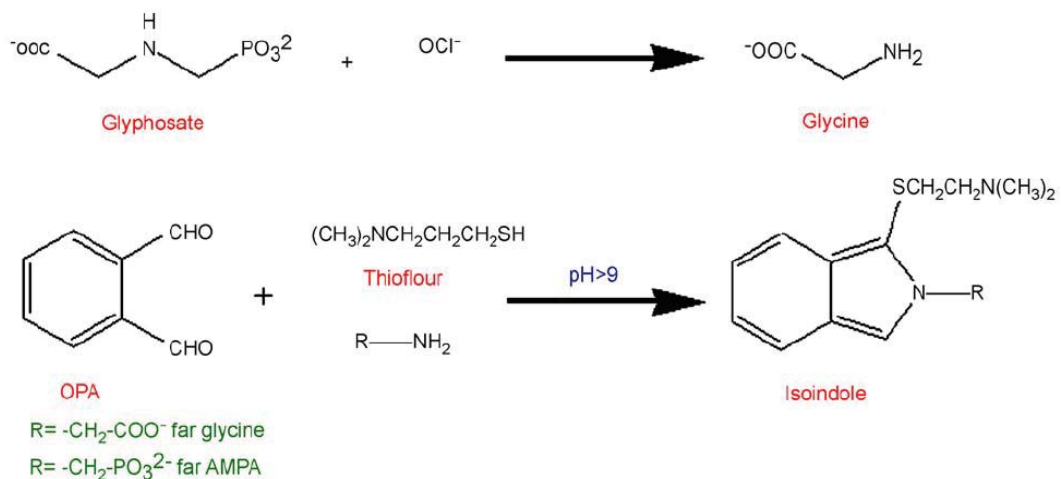
รูปที่ 3.8 แสดงโครมาโทแกรมของสารผสมที่ประกอบด้วยไกลโฟเสตเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ AMPA 8 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยรูปที่ 3.8a แสดงโครมาโทแกรมของการฉีดสารสู่เครื่องโดยตรง (direct injection) และรูปที่ 3.8b แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวรับหลังจากการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวตั้งที่กล่าวมา จากภาพโครมาโทแกรมทั้งสองแสดงให้เห็นถึงความสามารถของวิธีการวิเคราะห์นี้ว่าสามารถช่วยเพิ่มสภาพไวในการตรวจวัดสำหรับวิธีวิเคราะห์ได้เป็นอย่างมาก

### 3.3.10 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ (optimum $\mu$ -SLME procedure and method validation)

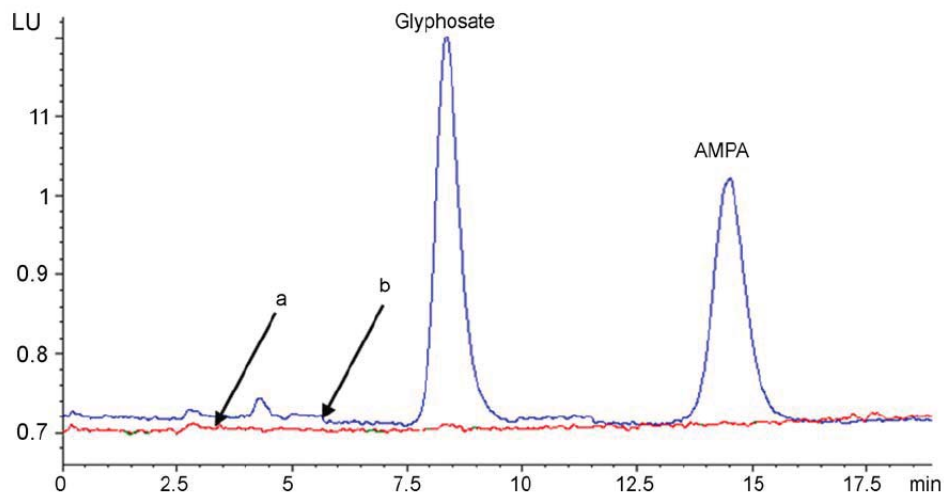
สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลว ทำโดยใช้เมมเบรนเส้นใยกลวง Accurel® PP Q3/2 ความยาว 8 เซนติเมตร แคร้ค่างคีนในสารละลาย Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether เข้มข้น 0.20 โมลาร์ สารละลายตัวรับใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ปริมาตรของสารละลายตัวให้เท่ากับ 20.0 มิลลิลิตร ปรับให้มีค่า pH 9.0 ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที คนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 3 สารละลายที่ได้หลังการสกัดนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่มีระบบการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column ได้โดยตรง



**รูปที่ 3.6** ผลของเวลาที่ใช้สกัดต่อค่าการเพิ่มความเข้มข้น สารละลายตัวให้: ไกลโฟเสต และ AMPA 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่า pH 9.0 ปริมาตร  $V_d$  20 มิลลิลิตร; สารละลายตัวรับ: โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร  $V_a$  30 ไมโครลิตร; สารละลายเมมเบรน: Aliquat-336 ใน di-n-hexyl ether 0.2 โมลาร์



**รูปที่ 3.7** ปฏิกริยา Postcolumn ของไกลโฟเสตและ AMPA



**รูปที่ 3.8** โครมาโทแกรมที่ซ้อนทับกันของสารละลายมาตรฐานไกลโฟเสต 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ AMPA 8 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งวิเคราะห์โดย (a) การฉีดสารสู่เครื่องโดยตรง (direct injection) (b) ผ่านกระบวนการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลว

### 3.3.10.1 ค่าการเพิ่มความเข้มข้น (Enrichment factor)

นำสารที่เหมาะสมตามที่สรุปไว้ข้างต้นมาใช้ศึกษาค่าการเพิ่มความเข้มข้น โดยนำเอาสารละลายมาตรฐานของไกลโฟเสตเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ AMPA เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อลิตร มาวิเคราะห์ซ้ำ 8 ครั้ง ได้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสตคือ 853 เท่า และ 136 เท่าสำหรับ AMPA การทดลองซ้ำ (repeatability) ของวิธีการนี้ให้ผลดีมีค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSDs) น้อยกว่าค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ Horwitz ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ ค่าการเพิ่มความเข้มข้น และค่า RSDs จะแสดงในตารางที่ 3.3

**ตารางที่ 3.3** สมรรถนะ และข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของเทคนิคเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงและการเตรียมอนุพันธ์แบบ post-column ร่วมด้วยการตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์

	Extraction efficiency ( $n=8$ )		Linearity		MDL ( $n=10$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	MQL ( $n=10$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Accuracy EE (% , $n=7$ )		Precision RSD (% , $n=7$ )	
	EF	RSD (%)	Range ( $\mu\text{g/L}$ )	$R^2$			Level 1 <sup>a</sup>	Level 2 <sup>b</sup>	Level 1 <sup>a</sup>	Level 2 <sup>b</sup>
Glyphosate	853	8.0 (35) <sup>c</sup>	1–1004	0.9962	0.22 <sup>d</sup>	0.72	74.6 ± 4.8	86.4 ± 6.5	6.4 (45) <sup>b</sup>	35) <sup>c</sup>
AMPA	136	5.2 (27) <sup>c</sup>	5–613	0.9943	3.40	11.34	11.1 ± 1.9	13.4 ± 0.5	6.1 (33) <sup>b</sup>	27) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Level 1: glyphosate 1  $\mu\text{g/L}$ , AMPA 8  $\mu\text{g/L}$ .

<sup>b</sup> Level 2: glyphosate 5  $\mu\text{g/L}$ , AMPA 25  $\mu\text{g/L}$ .

<sup>c</sup> Value calculated from Horwitz equation ( $\text{CV} (\%) \approx 2^{(1-0.5\log C)}$ ) at each concentration level [34].

<sup>d</sup> EPA method 547 set MDL of reagent water at 6.00  $\mu\text{g/L}$  [30].

### 3.3.10.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ (Method Validation)

ความเป็นเส้นตรงของวิธีการ ทำโดยใช้สารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.3 วิธีการนี้ให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี มีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9900 สำหรับไกลโฟเสต และ AMPA ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าวิธีการ external standard calibration สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้ ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณสามารถคำนวณได้จากค่า S/N ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายที่ประกอบด้วยไกลโฟเสตเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร และ AMPA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ซ้ำ 10 ครั้ง ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดคำนวณได้ที่ระดับ S/N=3 ส่วนขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณคำนวณได้ที่ระดับ S/N=10 วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดสำหรับไกลโฟเสตเท่ากับ 0.22 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าของ EPA method 547 ที่เคยรายงานไว้คือ 6.00 ไมโครกรัมต่อลิตร [30]

นำวิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวนี้ ไปใช้สกัดน้ำที่เติมไกลโฟเสตเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ AMPA เข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อลิตร ใด้ร้อยละของประสิทธิภาพการอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างปริมาณต่ำตามข้อกำหนดของ AOAC [33] ความแม่นยำของวิธีการสามารถศึกษาได้โดยการเปรียบเทียบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากการสกัดน้ำที่เติมสารทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้อยู่ในช่วง Horwitz trumpet [34] การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงเพียงพอต่อการตรวจวัดไกลโฟเสต และ AMPA ในตัวอย่างน้ำ และเหมาะกับการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

### 3.3.10.3 การนำวิธีการไปใช้งาน (Method application)

จากวิธีการตรวจวัดไกลโฟเสต และ AMPA ที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้นำมาทดสอบวิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำบาดาลที่เก็บจากเขตเกษตรกรรมในประเทศไทย เนื่องจากสารตัวอย่างค่อนข้างสะอาด จึงแบ่งสารตัวอย่างมาเติมสารไกลโฟเสตเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร (มีค่าต่ำกว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่กำหนดโดย EPA method 547 ถึง 6 เท่า) และ AMPA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร (เนื่องจากมีสภาพไวในการตรวจวัดที่ต่ำ) ผลการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองสองวันได้ค่าการเพิ่มความเข้มข้นอยู่ที่ 530 เท่าและ 811 เท่าสำหรับไกลโฟเสตและ 117 เท่า และ 77 เท่าสำหรับ AMPA ร้อยละของประสิทธิภาพการสกัดของไกลโฟเสตมีค่าเป็น  $53 \pm 4.5$  กับ  $81.1 \pm 3.9$  และ  $11.7 \pm 1.8$  กับ  $7.7 \pm 2.7$  สำหรับ AMPA จากผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยเมมเบรนชนิดเส้นใยกลวงที่บรรจุของเหลวถือเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไกลโฟเสต และสารอนุพันธ์ของไกลโฟเสตคือ AMPA ในน้ำตัวอย่างจากธรรมชาติ

### 3.4 สรุปผลการทดลอง

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคแบบอาศัยตัวพาด้วยเมมเบรนที่บรรจุของเหลวไว้ภายในโดยใช้เมมเบรนเส้นใยกลวง เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจวัดไกลโฟเสตและสารอนุพันธ์ AMPA ในตัวอย่างน้ำโดยสามารถกำจัดสิ่งรบกวนและเพิ่มความเข้มข้นได้ในขั้นตอนเดียว สารละลายที่ได้หลังการเพิ่มความเข้มข้นสามารถนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับการทำอนุพันธ์แบบหลังคอลัมน์ได้ทันที วิธีการกำจัดสิ่งรบกวนวิธีนี้เป็นวิธีทางเลือกที่สามารถนำไปใช้แทนวิธีการเดิมซึ่งต้องใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ ligand-exchange และ anion-exchange วิธีการที่นำเสนอนี้เป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก งานวิจัยนี้ยังมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นเทคนิคดังกล่าวสามารถสกัดสารตัวอย่าง (สารละลายตัวให้) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใช้เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสามารถนำสารละลายตัวรับที่ได้หลังการสกัดไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องอาศัย peristaltic pump ที่มีราคาแพง รวมถึง flat sheet membrane และ membrane module อีกทั้งยังลดปัญหาสารตกค้างภายในเมมเบรน เนื่องจากเส้นใยกลวงที่ใช้มีราคาถูกจึงใช้วิเคราะห์เพียงครั้งเดียวแล้วทิ้ง กระบวนการสกัดมีความง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในระดับไมโครลิตรต่อการสกัดหนึ่งครั้ง รวมทั้งวิธีการนี้ใช้สารละลายตัวอย่างเพียง 20 ไมโครลิตร ซึ่งน้อยกว่าที่กำหนดไว้โดย EPA method 547 คือ 200 ไมโครลิตร และยังให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ต่ำกว่าถึง 27 เท่า จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการพบว่าวิธีการนี้มีความเที่ยงตรงที่ยอมรับได้ และให้ผลที่น่าเชื่อถือสำหรับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมถึงยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านการวิเคราะห์ไกลโฟเสต และ AMPA ในประเทศไทย วิธีการนี้เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดนี้ในตัวอย่างชนิดอื่นได้ หากใช้เทคนิคตรวจวิเคราะห์ mass spectrometry แทนเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการเตรียมอนุพันธ์แบบpost-column ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ อาจทำให้ได้ความจำเพาะในการตรวจวัดและสภาพไวการตรวจวัดที่สูงขึ้น รวมทั้งให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ต่ำลง ตัวอย่างของงานวิจัยดังกล่าวสรุปไว้ในตารางที่ 3.2

### 3.5 เอกสารอ้างอิง

1. California Department of Pesticide Regulation Home Page, <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf> (accessed April 2007).
2. Data of Imported Agricultural Hazardous Substances, Information Technology Center, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand, February 2008.
3. J.E. Franz, M.K. Mao, J.A. Sikorski, Glyphosate: A Unique Global Herbicide, ACS Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC, 1997.
4. The Nature Conservancy Home Page, <http://tncweeds.ucdavis.edu/handbook.html>, Glyphosate, (chapter 7, accessed April 2007).

5. M. Fernández, M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1998) 377.
6. World Health Organization's Water Sanitation and Health (WSH) Home Page, [http://www.who.int/water sanitation health/dwq/chemicals/glyphosate/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/glyphosate/en/) (accessed November 2007).
7. The Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission Home Page, [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm) (accessed November 2007).
8. E. Borjesson, L. Torstensson, *J. Chromatogr. A* 886 (2000) 207.
9. T.V. Nedelkoska, G.K-C. Low, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 145.
10. E. Mallat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 129.
11. Y. Zhu, F. Zhang, C. Tong, W. Liu, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 297.
12. M. Corbera, M. Hidalgo, V. Salvadó, P.P. Wiczorek, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 3.
13. M. Ibañez, O' .J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 145.
14. J. Patsias, A. Papadopoulou, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 83.
15. U.S. Geological Survey Kansas Water Science Center Home Page, Open-File Report 01-454, <http://ks.water.usgs.gov/Kansas/pubs/abstracts/ofr.01-454.abs.html> (accessed April 2007).
16. E.A. Lee, L.R. Zimmerman, B.S. Bhullar, E.M. Thurman, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4937.
17. M.P. García de Llasera, L. Gómez-Almaraz, L.E. Vera-Avila, A. Peña-Alvarez, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 139.
18. P. Dzygiel, P. Wiczorek, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 93.
19. C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Membr. Sci.* 203 (2002) 201.
20. M.V. Khrolenko, P.P. Wiczorek, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 111.
21. J. Pawliszyn (Ed.), *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*, Vol. XXXVII, Elsevier Science BV, 2002 (Chapters 14 and 15).
22. D. Kou, X. Wang, S. Mitra, *J. Chromatogr. A* 1055 (2004) 63.
23. S.M. Richoll, I. Colón, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 147.
24. Y. Yamini, C.T. Reimann, A. Vatanara, J.A° . Joñsson, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 57.
25. N. Vora-adisak, P. Varanusupakul, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 236.
26. K. Hylton, S. Mitra, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 199.

27. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 132.
28. Pickering Laboratories, Application Manual: Glyphosate, Pickering Laboratories, Mountain View, CA, 2002 (CN. 0101-0003).
29. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650.
30. US Environmental Protection Agency, Determination of Glyphosate in Drinking Water by Direct-Aqueous-Injection HPLC, in: Post-Column Derivatization and Fluorescence Detection, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, 1990 (EPA Method 547).
31. P. Dz ygiel, P. Wieczorek, L. Mathiasson, J.A° . Jo nsson, *Anal. Lett.* 31 (7) (1998) 1261.
32. Pickering Laboratories Inc., Reagent Bulletin for Post-column Liquid Chromatography: o-Phthalaldehyde Reagent, Pickering Laboratories Inc., Mountain View, CA, 2003.
33. AOACPeerVerified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, USA, 1993.
34. W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67A.
35. R.J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, Th.H.M. Noij, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 187.
36. S.Y. Chang, C.-H. Liao, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 309.
37. S.-H. Tseng, Y.-W. Lo, P.-C. Chang, S.-S. Chou, H.-M. Chang, *J. Agri. Food. Chem.* 52 (2004) 4057.
38. J. Jiang, C.A. Lucy, *Talanta* 72 (2007) 113.
39. L. Zhou, Z. Luo, S.Wang, Y. Hui, Z. Hu, X. Chen, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 377.
40. C.F.B. Coutinho, L.F.M. Coutinho, L.H. Mazo, S.L. Nixdorf, C.A.P. Camara, F.M. Lanc,as, *Anal. Chim. Acta* 592 (2007) 30.

## บทที่ 4

### โครงการย่อยที่ 3:

#### การตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายกลุ่มพร้อมกัน

##### 4.1 บทนำ

งานด้านปศุสัตว์จัดเป็นกลุ่มงานทางเกษตรกรรมที่มีความสำคัญเพราะนอกจากช่วยเพิ่มแหล่งอาหารให้กับประชากรแล้วยังช่วยเพิ่มพูนรายได้ให้กับเกษตรกร สัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยได้แก่ ไก่ หมู และวัวนม การดูแลสัตว์ในฟาร์มเลี้ยงนั้น นอกจากอาหารสัตว์ที่เป็นความจำเป็นพื้นฐานแล้ว ยาสัตว์นับว่ามีความสำคัญไม่น้อยไปกว่ากัน กลุ่มยาสัตว์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides,  $\beta$ -lactams, coccidiostats, lincosamides, quinolones, sulfonamides และ tetracyclines [1] ดังนั้นจึงมีโอกาสที่ยาเหล่านี้อาจยังคงตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ส่งผลข้างเคียงสู่ผู้บริโภคได้ ดังนั้นในหลายประเทศจึงมีการกำหนดกฎเกณฑ์ควบคุมการตกค้างและ/หรือกำหนดปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ เพื่อคุ้มครองผู้บริโภค

ในงานวิจัยนี้ในเบื้องต้นแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดและการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าโครงการที่ 2 ได้ใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคเข้ามาช่วยในการตรวจวัดสารปนเปื้อนและได้ผลที่ดีในงานต่อเรื่องนี้ ผู้วิจัยประสงค์ที่จะทดลองใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์เช่นกัน แต่จะทดลองเฉพาะในตัวอย่างน้ำก่อนในเบื้องต้น

ดังนั้นในโครงการนี้จะแบ่งออกเป็น 2 โครงการย่อยดังที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 1 คือ

โครงการย่อยที่ 3.1 การตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างหลายชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรฟิลิกลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี รายละเอียดงานวิจัยแสดงในหัวข้อ 4.2 และ

โครงการย่อยที่ 3.2 การตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างในน้ำหลายกลุ่มพร้อมกัน ด้วยเทคนิคการสกัดตัวอย่างระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง รายละเอียดงานวิจัยแสดงในหัวข้อ 4.3

## 4.2 โครงการย่อย 3.1: การตรวจวัดสารกลุ่มยาต้านจุลชีพหลายชนิดพร้อมกันในเนื้อไก่ ด้วยอณตริกริยาแบบไฮโครฟลิกลิดวิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี

การวิเคราะห์สารปนเปื้อนหรือสารตกค้างที่มีปริมาณน้อยในอาหารนั้นนับเป็นงานยาก โดยเฉพาะสารกลุ่มยาต้านจุลชีพนี้จัดเป็นสารที่มีโอกาสเกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคสูง ในหลายประเทศจึงมีมาตรการควบคุมที่เข้มงวด [2] เครื่องมือที่ตรวจวิเคราะห์จะต้องให้ความเฉพาะเจาะจงและมีสภาพไวการตรวจวิเคราะห์สูง ในงานวิจัยที่ผ่านมาเทคนิค microbial assays [3-5] นับเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วต่อการวิเคราะห์ แต่ขาดความเฉพาะเจาะจงและสภาพไวการตรวจวิเคราะห์ต่ำ ปัจจุบันเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีเชื่อมต่อกับระบบแทนเต็มแมสสเปกโทรเมทรี (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุดในการตรวจวัดสารอินทรีย์ตกค้างในอาหาร มีความเลือกเฉพาะ สภาพไว ความเที่ยงและความแม่นยำสูง ตอบสนองข้อกำหนดของสหภาพยุโรปที่มีเกณฑ์การตรวจวัดอย่างเข้มงวดได้เป็นอย่างดี (EU 657/2002) งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการพัฒนาวิธีการตรวจวัดจะเลือกตรวจวัดสารเฉพาะกลุ่ม เช่น กลุ่ม sulfonamides [6] quinolones [7]  $\beta$ -lactams และ cephalosporins [8] aminoglycosides [9, 10] วิธีการทดลองจะแตกต่างกันไปตามสมบัติของยาต้านจุลชีพแต่ละกลุ่มและเนื้อเมทริกซ์ที่ต้องการตรวจวัด งานวิจัยที่ศึกษาการตรวจวัดสารหลายกลุ่มพร้อมกันยังมีอยู่น้อยมาก เทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่มีรายงานไว้ได้แก่ เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย [11-13] การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) [14,15] การสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) [16] การสกัดด้วยเทคนิคควบคุมความดันของเหลว (pressurized liquid extraction, PLE) [17] งานวิจัยที่จัดว่าน่าสนใจที่สุดในด้านนี้คืองานของ Yamada และคณะ [18] เขาพัฒนาวิธีการที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มยาต้านจุลชีพได้พร้อมกันถึง 130 ชนิด แต่ไม่รวมกลุ่ม aminoglycoside และ tetracyclines และล่าสุดในปี ค.ศ.2008 Kaufmann และคณะ [19] รายงานวิธีการตรวจวัดยาต้านจุลชีพ 100 ชนิด ในเนื้อสัตว์หลากหลายประเภท โดยใช้เทคนิค Ultra performance liquid chromatography (UPLC) ต่อเชื่อมกับแมสสเปกโทรเมทรีระบบ Time of flight (TOF) แต่ไม่ครอบคลุมยาต้านจุลชีพกลุ่ม aminoglycoside เช่นกัน

โดยทั่วไปแล้ว วิธีที่จะทำการตรวจวัดสารหลายชนิดพร้อมกันได้นั้น นอกจากจะต้องอาศัยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ดีแล้วยังต้องอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถครอบคลุมสารที่ต้องการตรวจวัดได้ทั้งหมด งานวิจัยนี้จึงมีเป้าประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวัดให้ครอบคลุมสารหลายกลุ่มและหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่ม aminoglycoside ซึ่งยังไม่มีปรากฏในรายงานวิจัยใดในปัจจุบัน

### 4.2.1 วิธีการดำเนินงานวิจัย

จากการรวบรวมข้อมูลกลุ่มยาต้านจุลชีพที่นิยมใช้ในงานทางปศุสัตว์ กฏระเบียบด้านความปลอดภัยของอาหารและการนำเข้าสินค้าปศุสัตว์ของประเทศคู่ค้า ผู้วิจัยเลือกสารตัวแทนการศึกษา

พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารปนเปื้อนเหล่านี้ในสินค้าปศุสัตว์ทั้งสิ้น 24 ชนิด จาก 8 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides 3 ชนิด, กลุ่ม  $\beta$ -lactam 3 ชนิด, กลุ่ม lincosamides 2 ชนิด, กลุ่ม macrolides 4 ชนิด, กลุ่ม quinolones 4 ชนิด, กลุ่ม sulfonamides 4 ชนิด, กลุ่ม tetracyclines 3 ชนิด และกลุ่ม amprolium สารทั้ง 24 ชนิด จาก 8 กลุ่มนี้ มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของโครงสร้างทางเคมี สมบัติทางเคมีและกายภาพ โครงสร้างของสารทั้งหมดแสดงไว้ในรูปที่ 4.2.1

ตารางที่ 4.2.1 แสดงบทสรุปรายงานที่มีผู้ศึกษามาก่อน ทั้งสารที่ตรวจวัด เนื้อเมทริกซ์ เทคนิคการตรวจวัด สภาวะการทดลอง ขีดจำกัดการตรวจวัด และสภาพไวการวิเคราะห์

จากตารางที่ 4.2.1 จะเห็นได้ว่าผู้วิจัยหลายกลุ่มมีแนวความคิดที่จะรวมสารหลายกลุ่มเข้าด้วยกันและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ให้ทำได้ในขั้นตอนเดียว หรือที่เรียกว่า Multiresidue method แต่พบว่างานที่ผ่านมา ยังไม่สามารถรวมกลุ่มยาทุกกลุ่มเข้าด้วยกันและตรวจวัดพร้อมกันได้ กลุ่มยาตัวที่ไม่สามารถรวมเข้ากับกลุ่มยาอื่นๆ ในการวิเคราะห์ คือกลุ่ม aminoglycosides เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีสภาพขั้วสูง ยากต่อการสกัดและวิเคราะห์ด้วยระบบ high performance liquid chromatography (HPLC) ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือระบบ reversed phase สารกลุ่มนี้มีค่าการละลายในน้ำสูง จึงไม่สามารถคงค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ หากต้องการหน่วงเหนี่ยวสารให้อยู่ภายในคอลัมน์ วิธีการที่นิยมใช้กันมากคือการใช้เทคนิคการจับคู่ไอออนหรือ Ion-pairing chromatography แต่ต้องมีการเติมสารรีเอเจนต์ที่มีคู่ประจุลงไปในซึ่งส่วนใหญ่มีสมบัติเป็นเกลือจึงไม่เหมาะสมต่อระบบแมสสเปโตรเมทรี

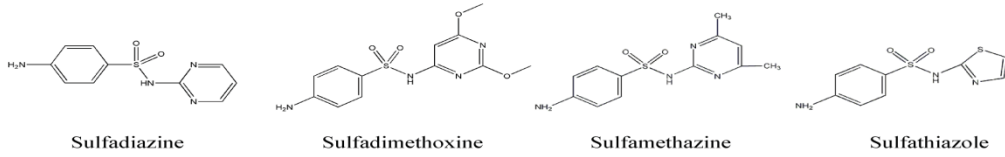
ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงวางเป้าหมายการตรวจวัดสารทั้ง 8 กลุ่ม โดยจะทดลองสภาวะการแยกแบบ Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) และคาดหวังที่จะได้วิธีการตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดสารทุกกลุ่มได้พร้อมกัน และจะพัฒนาวิธีการสกัดสารกลุ่มนี้ในเมทริกซ์เนื้อสัตว์ ให้ได้วิธีการที่มีสภาพไวการวิเคราะห์สูง และขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ สอดคล้องกับตามมาตรฐานการส่งออกของประเทศคู่ค้า

#### 4.2.2 การทดลอง

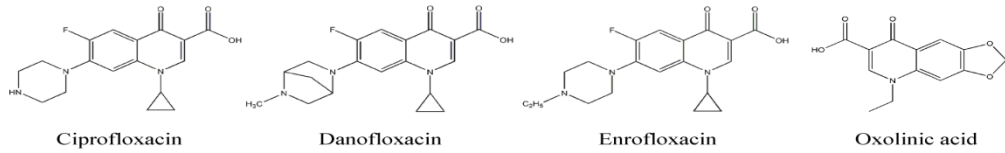
##### 4.2.2.1 สารเคมีที่ใช้

สารมาตรฐานทุกชนิดที่ใช้มีความบริสุทธิ์สูงกว่า 95% โดยแยกเป็น Ampicillin (AMP), amprolium (AMPR), chlortetracycline (CTC), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), erythromycin (ERY), lincomycin (LIN), oxolinic acid (OXO), oxytetracycline (OTC), penicillin G (PEN G), spectinomycin (SPEC), spiramycin (SPI), sulfadimethoxine (SDMX), tetracycline (TC), tilmicosin (TIL), and tylosin (TYL) จากบริษัท Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน

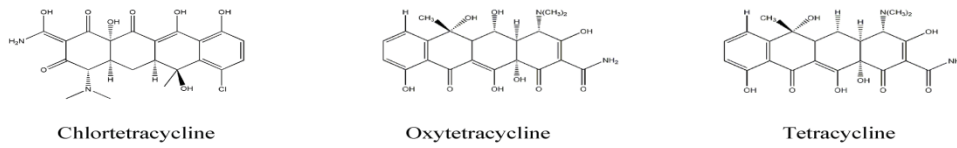
### Sulfonamides



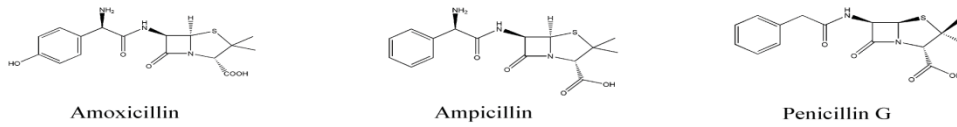
### Quinolones



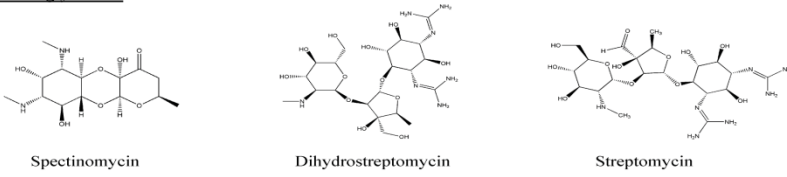
### Tetracyclines



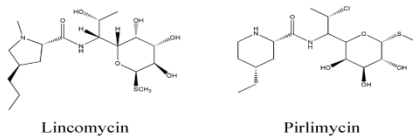
### Penicillins



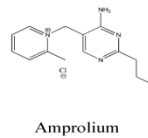
### Aminoglycosides



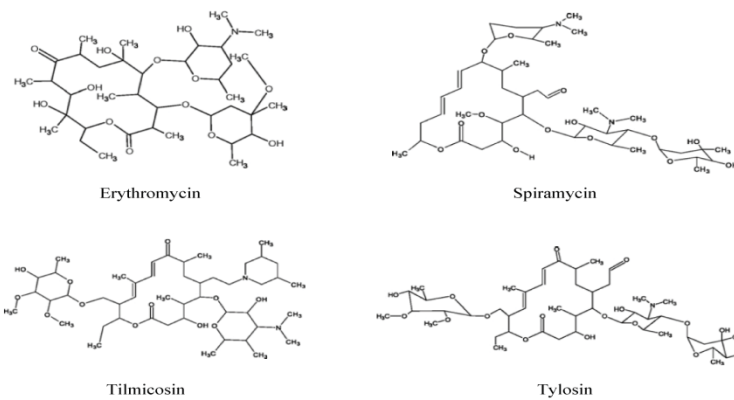
### Lincosamides



### Coccidiostats



### Macrolides



รูปที่ 4.2.1 ชื่อและโครงสร้างทางเคมีของยาสัตว์ 24 ชนิดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 4.2.1 สรุปวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มยาต้านจุลชีพจากกรายงานที่ผ่านมา

Analyte	Matrix	LC mode	Column	Mobile phase	Detection	Sensitivity ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Reference
Quinolones (6), sulfonamides (5), tetracyclines (1), other veterinary drugs (6)	Shrimp	RP	Water YMC Phenyl 4 mm $\times$ 50 mm, 3 $\mu\text{m}$	A: 95:5 (v/v) 0.1% formic acid in water– MeCN B: 15:85 (v/v) 0.05% formic acid in water–MeCN	APCI–MS	LOD = 10-200	[10]
Sulfonamides (4) $\beta$ -lactams (3), macrolides (4), quinolones (4), tetracyclines (4)	Muscle Kidney	RP	Genesis C18 2.1 mm $\times$ 50 mm, 4 $\mu\text{m}$	A: MeCN B: 0.2% formic acid in water containing 0.1 mM oxalic acid	ESI–MS/MS	LOD = 2-15	[11]
$\beta$ -lactams (7), macrolides (4), quinolones (9), sulfonamides (14), tetracyclines (4), other veterinary drugs (1)	Chicken	RP	C18 Acquity UPLC BEH, 2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 $\mu\text{m}$	A: 0.2% formic acid in water containing 1 mM oxalic acid B: 0.1% formic acid in MeCN	ESI–MS/MS	CC $\beta$ = 6.9-337.2	[12]
Quinolones (12), sulfonamides (16), other veterinary drugs (13)	Chicken	RP	Synergi Fusion 2 mm $\times$ 100 mm, 2.5 $\mu\text{m}$	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in MeCN C: 0.1% formic acid in MeOH	ESI–MS/MS	CC $\beta$ = 0.45-487	[15]
Aminoglycosides (3), $\beta$ -lactams (8), macrolides (7), sulfonamides (17), tetracyclines (5), amphenicols (2)	Honey	Ion-pair	Zorbax SB-C18 2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 $\mu\text{m}$	A: 1 mM NFPA in 0.5% formic acid in water B: 0.5% formic in (50:50, v/v) of MeCN-methanol	ESI–MS/MS	LOD = 27-80	[16]
$\beta$ -lactams (2), lincosamides (1), macrolides (4), quinolones (7), sulfonamides (10), tetracyclines (3), other veterinary drugs (4)	Meat	RP	Xterra MS C18 2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5 $\mu\text{m}$	A: 10 mM formic acid in MeOH B: 10 mM formic acid in water	ESI–MS/MS	LOD = 3-15	[17]
Lincosamides (3), macrolides (10), quinolones (14), sulfonamides (12), tetracyclines (7), other veterinary drug (1)	Milk	RP	C18 Aqua 2.1 mm $\times$ 150 mm, 3 $\mu\text{m}$	A: 0.2% formic acid in water B: 0.2% formic acid in MeCN	ESI–MS/MS	CC $\beta$ = 7.9-325	[18]
Aminoglycosides (3), amprolium, $\beta$ -lactams (3), lincosamides (2), macrolides (4), quinolones (4), sulfonamides (4), tetracyclines (3)	Chicken muscle	HILIC	ZIC-HILIC 2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5 $\mu\text{m}$	A: 50 mM ammonium formate in water at pH 2.5 B: MeCN	ESI(+)-MS/MS	LOD = 0.1-10, except STR and DSTR = 20	This work

Dihydrostreptomycin (DSTR) และ streptomycin (STR) จากบริษัท Fluka (Buchs, สวิตเซอร์แลนด์). Amoxicillin (AMOX), sulfadiazine (SDZ) and sulfathiazole (STZ) จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, สหรัฐอเมริกา). Danofloxacin (DAN) จากบริษัท Riedel-de Haën (Seelze, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน). Sulfamethazine (SMZ) จากบริษัท Wako Chemicals (VA, สหรัฐอเมริกา). Pirlimycin (PIR) จากบริษัท Pfizer (NY, สหรัฐอเมริกา).

ตัวทำละลาย Methanol (MeOH) และ acetonitrile (MeCN) ใช้เกรด HPLC ในการสกัดตัวอย่าง และใช้เกรด LC/MS ในการวิเคราะห์โดยเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท J.T. Baker (Deventer, ประเทศเนเธอร์แลนด์). สารเคมีทั้งหมดใช้เกรดความบริสุทธิ์สูง หรือเพื่องานวิเคราะห์เกลือ Ammonium formate, ammonium acetate, formic acid, and acetic acid (HOAc) ของบริษัท Fluka. Trichloroacetic acid (TCA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) ของบริษัท Fisher Scientific (Leicestershire, สหราชอาณาจักร). Hexane ของบริษัท Kanto Chemical (Tokyo, ประเทศญี่ปุ่น) น้ำที่ใช้เป็นน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผ่านระบบเตรียมน้ำบริสุทธิ์ของ Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA, สหรัฐอเมริกา) มีค่าความต้านทาน  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$

แก๊สที่ใช้กับเครื่องมือวิเคราะห์ทั้งแก๊สไนโตรเจนและอาร์กอน เป็นแก๊สที่มีความบริสุทธิ์สูง 99%

#### 4.2.2.2 การเตรียมนสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานตั้งต้นของสารทุกชนิดในการทดลองมีความเข้มข้น 0.1 กรัม ต่อ ลิตร และเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด ได้แก่ aminoglycosides และ  $\beta$ -lactams เตรียมในน้ำ SAs, MCs, ENR และ OXO ละลายในตัวทำละลายอะซิโตนไตรล TCs, LAs, AMPR, CIP และ DAN เตรียมในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายทุกชนิดเก็บในขวดโพลีโพรพิลีน อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ยกเว้น  $\beta$ -lactams, cephalosporins และ aminoglycosides เก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$

สารละลายของสารมาตรฐานที่ใช้ในการปรับค่าสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัด เตรียมที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวทำละลายผสมเมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

สารละลายที่ใช้ในการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน เตรียมความเข้มข้นสูงสุดที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในตัวทำละลายผสมเมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร และนำไปเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันคือตัวทำละลายผสมเมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

#### 4.2.2.3 เครื่องมือและภาวะที่ใช้ในการตรวจวัด

**เครื่องมือ** LC-MS/MS ใช้เครื่อง Water Acquity Ultra performance liquid chromatography system ต่อคู่กับ Micromass Quattro Premier™ XE triple quadrupole mass spectrometer ของบริษัท Water, MA สหรัฐอเมริกา

**คอลัมน์** zwitterionic ZIC-HILIC 2.1 mm x 100 mm; 3.5 µm particle size ของบริษัท Sequant (Umea ประเทศสวีเดน)

**อุณหภูมิคอลัมน์** 40°C

**อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่** 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที

**ปริมาตรการฉีด** 10 ไมโครลิตร

**เฟสเคลื่อนที่**  
A. 50 mM ammonium formate pH 2.5  
B. Acetonitrile

**สัดส่วนการผสมเฟสเคลื่อนที่** 90% B (1.5 นาที) และลดลงเป็น 40%B ในเวลา 4 นาที และ 10% B ในเวลา 6 นาที และทิ้งระยะในคอลัมน์เข้าสู่สมดุลในสภาวะเริ่มต้นเป็นเวลา 5 นาที ก่อนการเริ่มต้นฉีดครั้งถัดไป

ระบบแมสสเปกโทเมทรีใช้ระบบ positive mode electrospray ionization (ESI+) สภาวะการทดลองที่ใช้ได้แก่

Capillary voltage 1.0 kV

Source temperature 120 °C

Desolvation temperature 350°C

Extractor voltage 3 V

Cone gas (N<sub>2</sub>) flow 50 ลิตร ต่อชั่วโมง

Desolvation gas (N<sub>2</sub>) flow 1000 ลิตรต่อชั่วโมง

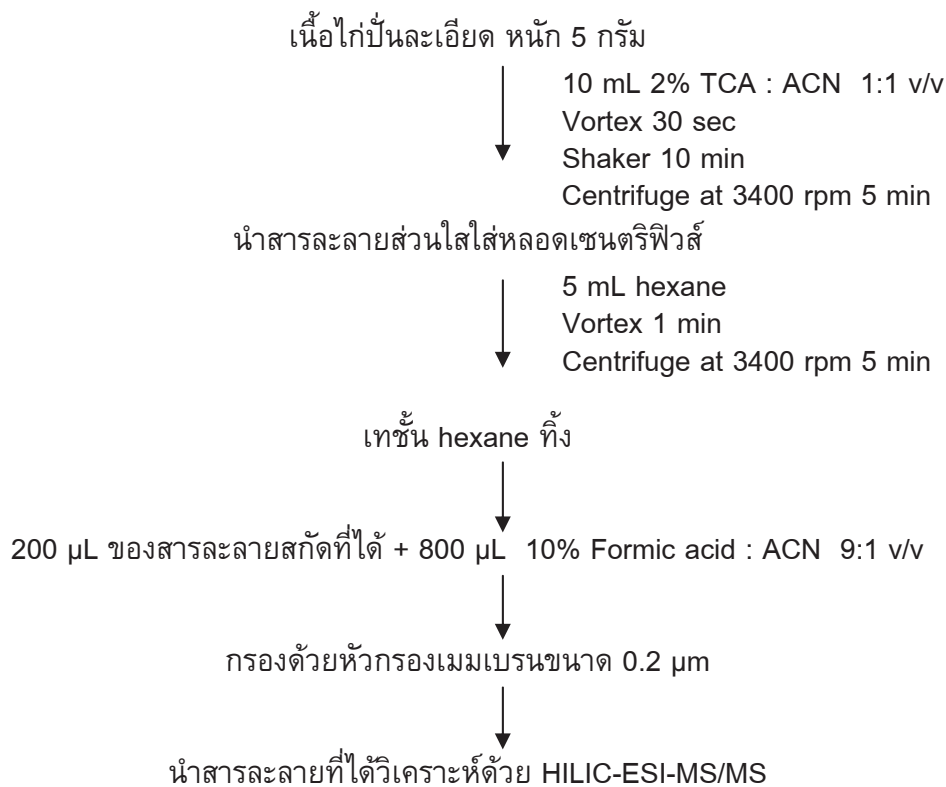
Collision gas (Ar) 3.5 x10<sup>-3</sup> mbar

#### 4.2.2.4 การเตรียมตัวอย่าง

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เลือกใช้เนื้อไก่ในท้องตลาด ทำการลอกหนัง และกระดูกออก สับและปั่นให้ละเอียด ทำการวิเคราะห์เบื้องต้นให้แน่ใจว่าไม่มียาสัตว์ตกค้าง เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ -20°C

การสกัดสารตัวอย่างทำโดยการนำเนื้อไก่ปั่นละเอียด 5 กรัม ซึ่งให้ทราบน้ำหนักละเอียด ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ที่ทำด้วยโพลีพรอพิลีน เติมสารละลายสกัด ที่เตรียมจากสารละลายผสม 2%TCA กับตัวทำละลายอะซิโตนไทรอิล 1:1 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง

vortex เป็นเวลา 30 วินาที และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่ออีก 10 นาที เซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 3400 rpm (~945 rcf) เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ เติมตัวทำละลายเฮกเซน 5 มิลลิลิตรเพื่อสกัดส่วนของไขมันที่ปนมาออก ทำการ vortex 1 นาที และเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบเดิมอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที เทชั้นของสารละลายเฮกเซนทิ้ง และใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ได้จากการสกัดนี้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายผสม 10% กรดฟอร์มิกในน้ำ ต่ออะซิโทไนไตรล์ 1:9 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน และกรองสารละลายนี้ด้วย หัวกรองเมมเบรนชนิดไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Whatman , NJ สหรัฐอเมริกา) และนำไปวิเคราะห์ด้วย HILIC-ESI-MS/MS ขั้นตอนการสกัดเขียนให้เข้าใจง่ายขึ้นดังแผนภาพรูปที่ 4.2.2



รูปที่ 4.2.2 : แผนผังการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ก่อนการวิเคราะห์

#### 4.2.2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการในงานวิจัยนี้ดำเนินการตามวิธีการของสหภาพยุโรป 2002/657/EC ครอบคลุมการบ่งชี้ ความเฉพาะเจาะจง ช่วงเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ รั้อยละการคืนกลับ ความเที่ยง และขีดจำกัดการวิเคราะห์

การบ่งชี้ชนิดของสารใช้คาร์เท็นชันใหม่ และคะแนนการบ่งชี้ (identification points) ของสารแต่ละชนิดตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป และใช้ค่าอัตราส่วนสัมพัทธ์ของไอออนที่เลือกใน Multireaction monitoring (MRM) transitions ค่าความจำเพาะของวิธีการทำโดยการวิเคราะห์ ตัวอย่างแบบลงก์ของเนื้อไก่ที่ปราศจากสารตกค้างจากแหล่งต่างๆ กัน จำนวน 20 ตัวอย่าง ตรวจสอบค่าการรบกวนในช่วงเวลา และไอออนที่เข้ามารบกวนการวิเคราะห์ การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานลงไปในการสกัดตัวอย่างแบบลงก์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 ระดับ ในช่วง 0.5-100 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยให้ครอบคลุมช่วง MRL (Maximum residue limit) หรือช่วงความเข้มข้นสูงสุดที่ยอมรับได้) ของสารแต่ละชนิด ค่าร้อยละการคืนกลับ และค่าความเที่ยงทำโดยการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างเป็นแบบลงก์ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.5, 1.0 และ 1.5 เท่าของค่า MRL) 10 ตัวอย่างต่อการศึกษาแต่ละระดับความเข้มข้น และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกันนี้ซ้ำเป็นเวลา 3 วัน ค่าความเที่ยงรายงานโดยใช้ค่าร้อยละของค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของการทำซ้ำ 10 ครั้งภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน วันเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน และในวันที่แตกต่างกัน 3 วัน (รวมข้อมูลการศึกษาที่แต่ละระดับความเข้มข้น 30 ข้อมูล, n=30)

ในการวิเคราะห์ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการทำปริมาณวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ) ของสารแต่ละชนิด ทำโดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดลงไปในตัวอย่างเป็นแบบลงก์และวัดค่าความสูงของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal to noise ratio, S/N) โดยคิดค่า LOD ที่ S/N = 3 และ LOQ ที่ S/N = 10 และทำการประมาณค่าขีดจำกัดการตัดสินใจ (decision limit, CC $\alpha$ ) และขีดจำกัดความสามารถการตรวจวัด (detection capability, CC $\beta$ ) โดยการเติมสารมาตรฐานทั้ง 24 ชนิดใน ระดับความเข้มข้นที่ MRL ของสารแต่ละชนิดลงในตัวอย่างเนื้อไก่แบบลงก์จำนวน 20 ตัวอย่าง ทำการสกัดและวิเคราะห์และคำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ค่า CC $\alpha$  คือค่าความเข้มข้นที่กำหนดบวกด้วยค่า 1.64 เท่าของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า CC $\beta$  คือค่าความเข้มข้นที่ระดับ CC $\alpha$  บวกด้วยค่า 1.64 เท่าของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

และเนื่องจากตามข้อกำหนดของสารบางชนิดค่า MRL จะคิดเป็นค่ารวมของสารทั้งกลุ่ม ดังนั้นในการเติมสารมาตรฐานของกลุ่มยา Sulfonamides จะทำการเติมสารแต่ละชนิดของกลุ่มนี้ที่ระดับ 0.1, 0.2 และ 0.4 เท่าของ MRL และ ENR และ CIP ที่ระดับ 0.2, 0.5 และ 1.0 เท่าของ MRL ในการศึกษาเชิงปริมาณของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการนี้

#### 4.2.3 ผลและวิจารณ์การทดลอง

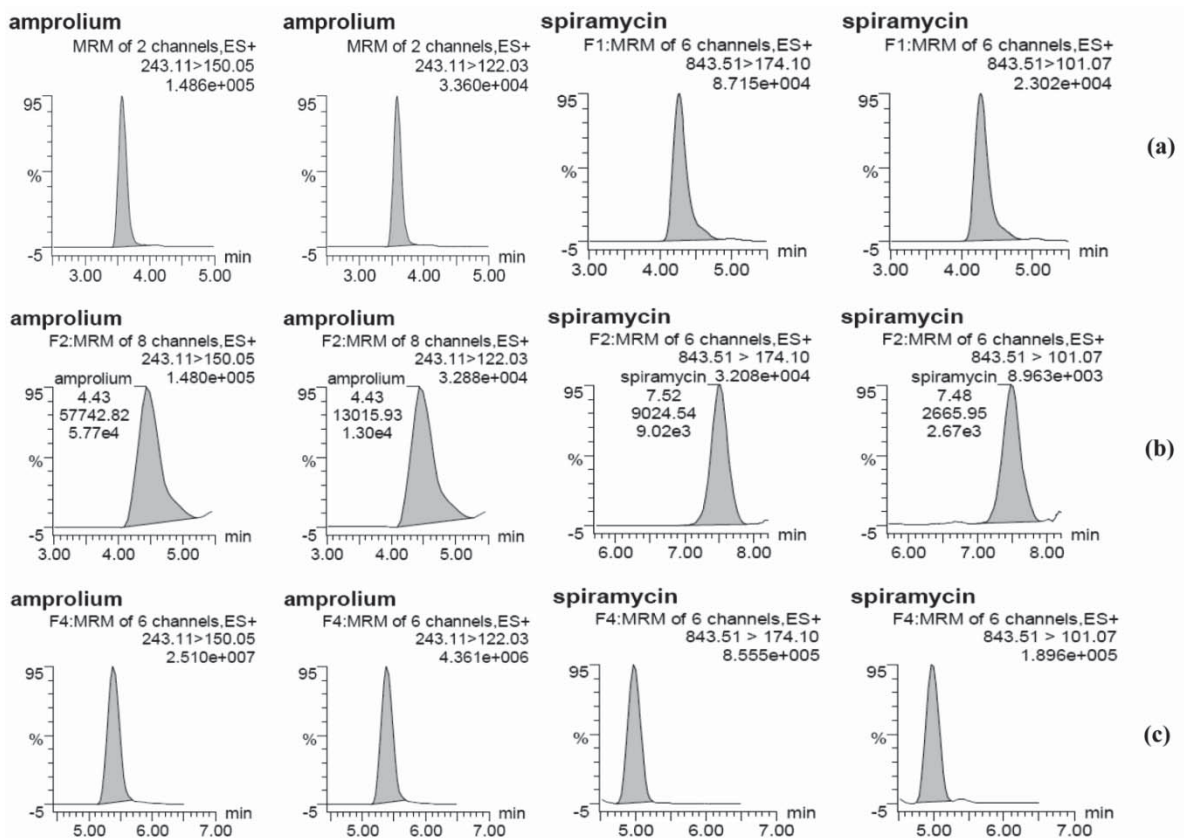
##### 4.2.3.1 ภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วย HILIC-ESI-MS/MS

ตามที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้นว่าสารที่มีสภาพขั้วสูงจะไม่เกิดการหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ ชนิด reversed phase สารจะหลุดออกมาอย่างรวดเร็วพร้อมกับตัวทำละลายและไม่สามารถทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ หากทำการแยกโดยใช้ ion-pair chromatography อาจแก้ปัญหานี้ได้แต่สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จะมีค่าต่ำ รูปร่างของพีคไม่ดีเท่าที่ควร อีกทั้งการเกิดไอออนจะมีค่าลดลงเนื่องจากการรบกวนของสาร ion-pair ที่ใช้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ ผู้วิจัยจึงคาดว่า HILIC จะเป็นวิธีการแยกที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ สารที่มีสภาพขั้วสูงจะเกิดการหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ HILIC ได้ดีและจะออกมาได้ช้ากว่าสารที่มีสภาพขั้วต่ำ การที่จะชะสารออกมาให้เร็วขึ้นทำได้โดยการเพิ่มปริมาณของน้ำให้มากขึ้นซึ่งจะตรงกันข้ามกับวิธีการแยกโดย reversed phase ที่นิยมใช้กันทั่วไป คอลัมน์ HILIC ที่มีจำหน่ายทางการค้า มีความแตกต่างกันทั้งหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้าง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกคอลัมน์ HILIC ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ ZIC-HILIC และ Acquity UPLC BEH HILIC พบว่าคอลัมน์ชนิด ZIC-HILIC ให้รูปร่างพีค โครมาโทแกรมการแยกที่ดีกว่า ใช้เวลาสั้นกว่า และสัญญาณการตอบสนองของสารทุกชนิดดีกว่าอีกคอลัมน์หนึ่งมาก ZIC-HILIC มีโครงสร้างของเฟสคงที่แบบ zwitterionic คือมีทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในโครงสร้าง หมู่ sulfoalkylbetaine ในคอลัมน์ยึดเหนี่ยวพันธะกับโครงสร้างซิลิกาที่ทำหน้าที่เป็นนิวสตุค้ำจน เฟสคงที่นี้จะสามารถหน่วงเหนี่ยวได้ทั้งสารที่มีสภาพขั้ว มีประจุ และสารที่เป็นกลางได้ ทำให้มีความเลือกเฉพาะของการหน่วงเหนี่ยวสารได้กว้างขวางครอบคลุมสารหลากหลายชนิด

องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่นับว่ามีส่วนสำคัญในระบบการตรวจวิเคราะห์ LC-ESI-MS(/MS) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย เฟสเคลื่อนที่ที่ดีจะช่วยเพิ่มการแตกตัวเป็นไอออน เกิดการแยกได้ดี และมีการรบกวนการวิเคราะห์ต่ำ ในงานนี้เลือกใช้เกลือแอมโมเนียมฟอร์เมต เป็นเฟสเคลื่อนที่ชนิด A เพราะมีค่าประสิทธิภาพการแตกตัวเป็นไอออนสูง มีค่าการละลายที่ดีในสารละลายอะซิโตนไตริลที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ B เทียบกับการใช้เกลือแอมโมเนียมอะซิเตท ในการทดลองนี้ทำการปรับค่า pH ที่ 2.5, 3 และ 4 และใช้ความเข้มข้นของเกลือที่ 10, 50 และ 100 mM เปรียบเทียบค่าสัญญาณการตอบสนองและคาร์เท็นชันไทม์ พบว่าสัญญาณการตอบสนองมีค่าสูงสุดและรีเทนชันไทม์มีค่าน้อยสุดเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมฟอร์เมตที่ความเข้มข้น 50 mM ที่ pH 2.5 โดยเฉพาะสารที่ออกมาช้าที่สุดคือ aminoglycosides จะมีสภาพขั้วสูงและพีคมีลักษณะสมมาตรในภาวะการทดลองที่เลือก

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนการผสมของเฟสเคลื่อนที่ให้ได้การแยกที่ดีที่สุด ในเวลาที่สั้นที่สุด พบว่าภาวะที่ดีที่สุด ใช้เวลาในการตรวจวัด 15 นาที สารตัวสุดท้ายออกที่เวลา 7.65 นาที ที่อัตราส่วนการผสม 90% A แต่ต้องทิ้งเวลาอีก 10 นาที เพื่อให้สารรบกวนทั้งหมดออกจากคอลัมน์ให้หมดและทิ้งเวลาให้ระบบกลับเข้าสู่สมดุลเพื่อพร้อมต่อการฉีดตัวอย่างถัดไป อัตราส่วนการผสมแสดงไว้แล้วในหัวข้อเครื่องมือและภาวะการทดลอง

เพื่อเป็นการยืนยันให้เห็นชัดเจนถึงประสิทธิภาพของ ZIC-HILIC ผู้วิจัยได้ทำการทดลองวิเคราะห์สารยาตัวทั้ง 24 ชนิดโดยเทียบกับ reversed-phase และ ion-pair mode จะเห็นได้ชัดเจนดังรูปที่ 4.2.3 ว่าการแยกใน HILIC จะได้สภาพไวและรูปร่างพีกที่ดีกว่ามาก HILIC ช่วยลดการเกิดหางพีก และสภาพไวของการวิเคราะห์สาร AMPR เพิ่มขึ้นมากกว่า 1690-1700 เท่า และ SPI 100-270 เท่า เมื่อเทียบกับ reversed-phase และ ion-pair mode ซึ่งมีผลให้ S/N มีค่าสูง และค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ต่ำลงด้วย



รูปที่ 4.2.3 : การเปรียบเทียบสภาพไวและรูปร่างพีกของสาร amprolium และ spiramycin ภาพ (a) reversed-phase ใช้คอลัมน์ water acuity UPLC BEH shield RP18 (2.1 mm x100 mm; 1.7  $\mu$ m) ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฟสเคลื่อนที่ A: 0.3% HOAc ใน 10 mM ammonium acetate และเฟสเคลื่อนที่ B: 0.3% HOAc ใน MeOH-MeCN (1:1, v/v) (b) ion-pair ใช้คอลัมน์ water acuity UPLC BEH shield RP18 (2.1 mm x100 mm; 1.7  $\mu$ m) ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฟสเคลื่อนที่ A: 0.01 M HFBA ใน MeCN-น้ำ (5:95, v/v) และเฟสเคลื่อนที่ B: 0.01 M HFBA ใน MeCN-น้ำ (95:5, v/v) และ (c) HILIC ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ภาวะการทดลองแสดงไว้ในหัวข้อเครื่องมือและภาวะการทดลอง

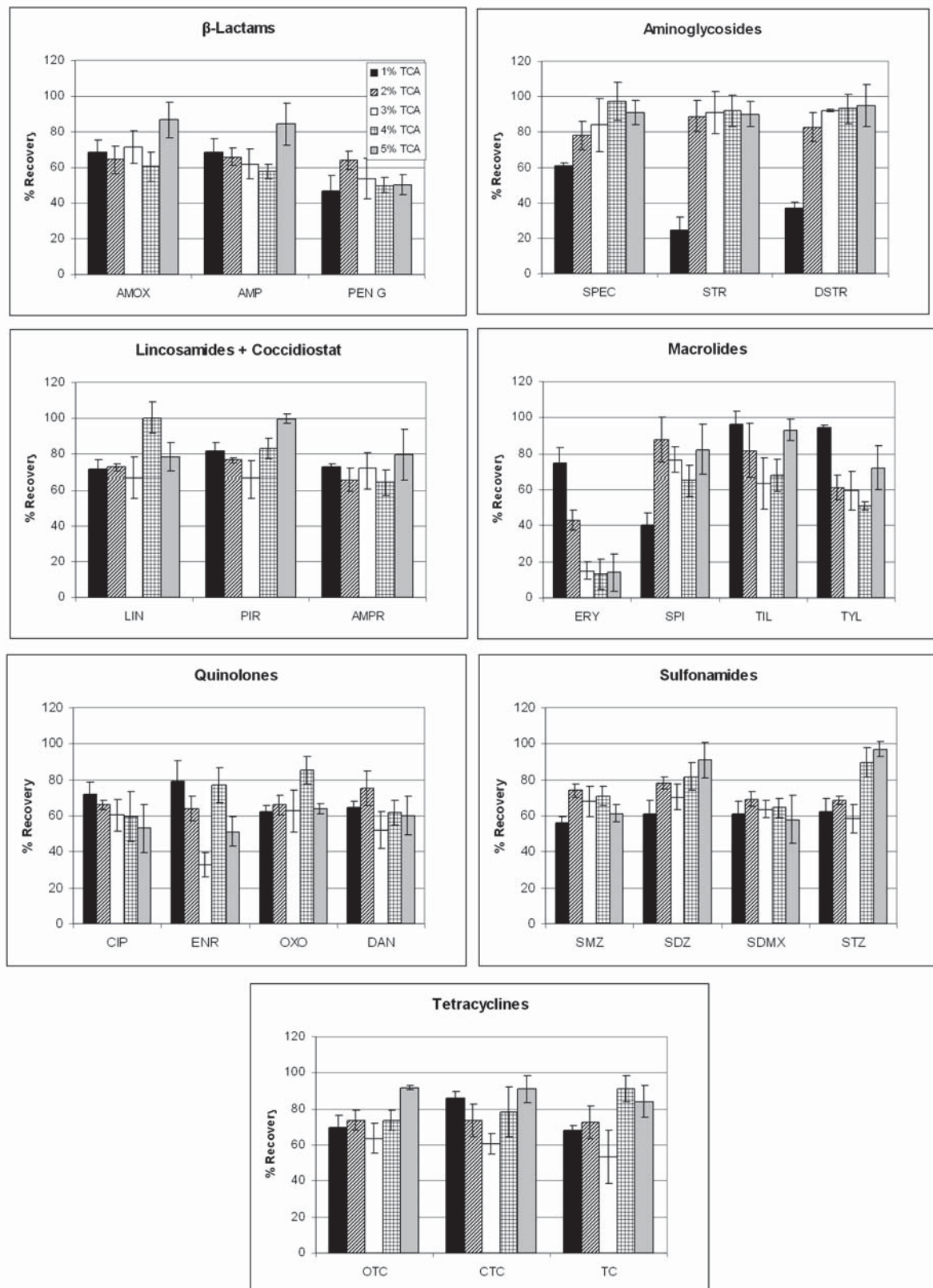
#### 4.2.3.2 ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

การทำการตรวจวัดสารตกค้างกลุ่มยาสัตว์นั้นไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์สารกลุ่มเดียวหรือการวิเคราะห์หลายกลุ่มพร้อมกัน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือสมบัติทางเคมีของสารนั้นๆ เนื้อเยื่อของสัตว์มีองค์ประกอบของโปรตีนสูงที่สามารถห่อหุ้มยาสัตว์ไว้ภายใน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีสภาพขั้วสูง ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างดี

ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น อะซิโทไนไตรท์ (MeCN) เมทานอล (MeOH) หรือเอทานอล (EtOH) สามารถใช้ในการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างชีวภาพได้ โดยทั่วไปนิยมใช้ MeCN เนื่องจากมีประสิทธิภาพการสกัดสูงและลดปริมาณไขมันในสารละลายสกัด Trichloro acetic acid (TCA) เป็นสารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนจากเนื้อเยื่อสัตว์เช่นเดียวกับตัวทำละลายอินทรีย์ TCA เป็นกรดที่มีความแรงทำให้ค่า pH ของสารละลายลดลงมากเป็นผลให้โปรตีนเปลี่ยนสภาพและเกิดการตกตะกอน ช่วยปลดปล่อยสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้หลุดออกมาจากโมเลกุลของโปรตีนเข้ามาอยู่ในสารละลายสกัดได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์หลายชนิดอยู่ในภาวะเป็นกลางเช่นสารกลุ่ม aminoglycosides มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุไว้ว่าค่าร้อยละการคืนกลับของสารกลุ่มยาสัตว์นี้จะมีค่าสูงขึ้นถ้าสกัดด้วย 5% TCA การตกตะกอนโปรตีนขึ้นกับค่า pH, ionic strength, อุณหภูมิของสารละลาย ความเข้มข้นและสมบัติทางเคมีและกายภาพของโปรตีนนั้นๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำข้อดีของ MeCN และ TCA มาใช้ พบว่าสารละลายผสมของ TCA ในน้ำ-MeCN, 1:1%, v/v จะได้การสกัดโปรตีนที่เหมาะสมมีค่าร้อยละการคืนกลับของสารทุกชนิดที่ศึกษาดีที่สุด รูปที่ 4.2.4 แสดงความเข้มข้นของ TCA ที่มีต่อค่าร้อยละการคืนกลับของสารที่ตรวจวัด

จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น 1% TCA สาร PEN G, DSTR และ STR มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ เนื่องจากสารที่กล่าวนี้มีหมู่อะมิโนอยู่เป็นจำนวนมาก จะเกิดการรวมตัวกับโปรตีนได้ดี ทำให้สกัดออกมาได้ยาก ภาวะการทดลองนี้จะไม่สามารถสกัดสารที่มีประจุออกมาได้มากนัก หากเพิ่มปริมาณกรด TCA ให้มากขึ้นประสิทธิภาพในการสกัดสาร ในกลุ่ม aminoglycoside จะดีขึ้น แต่สารบางชนิดจะมีค่าร้อยละการคืนกลับและสัญญาณการตอบสนองต่ำลง โดยเฉพาะสาร ERY จะมีค่าร้อยละการคืนกลับน้อยกว่า 20 สารชนิดนี้อาจเสื่อมสภาพในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดสูง ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2% TCA ในสารละลาย น้ำ:MeCN, 1:1 v/v จะเป็นค่าที่เหมาะสมให้ได้ทั้งค่าร้อยละการคืนกลับและสัญญาณการตอบสนองที่ดีและไม่ทำให้สารเสื่อมสภาพด้วย

สารสกัดที่เลือกใช้นี้ไม่เพียงแต่จะทำให้การสกัดดีขึ้นเท่านั้น แต่ยังทำให้การแยกและฟีกที่ปรากฏดีขึ้นมีความเหมาะสมในการตรวจวัดสารหลายชนิดพร้อมกันได้ สารกลุ่ม Sulfonamides, PEN G และ OXO มีค่ารีเทนชันไทม์อยู่ระหว่าง 1.42-1.76 นาที เป็นช่วงที่เฟสเคลื่อนที่มีปริมาณ MeCN สูง ทำให้ปราศจากสารรบกวน รูปร่างฟีกสมมาตรและมีสัญญาณการตอบสนองสูง กรณีสาร SPEC, DSTR และ STR ซึ่งเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูงมาก จะหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้นาน ทำให้



รูปที่ 4.2.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของ TCA ที่มีต่อค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น MRL ของยาสัตว์ทั้ง 24 ชนิด (ทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง) ภาวะการวิเคราะห์ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อเครื่องมือและภาวะการทดลอง

ใช้เวลานานที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นโดยมีค่ารีเทนชันใหม่ในช่วง 6.33 ถึง 7.65 นาที เมื่อสารออกมาช้า ทำให้สัญญาณการตอบสนองต่ำกว่าสารอื่นๆ ที่ออกมาก่อน ส่วนสาร TYL ถึง AMPR เป็นสารที่ออกมาในช่วงกลางของการแยก จัดเป็นช่วงที่มีการรบกวนการแยกสูง สารรบกวนหลายชนิดจะออกมาในช่วงนี้เช่นกัน และพบพีกคู่ในภาพของการวิเคราะห์สาร PIR และ LIN ผู้วิจัยคาดว่าผลจากตัวทำละลายทำให้เกิดการแยกพีกของสารสองชนิดนี้ ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือใช้ตัวทำละลายผสม 10% formic acid ในน้ำ : MeCN อัตราส่วน 1:9 v/v จากการทดลองใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าที่อัตราส่วนการผสมตัวทำละลายที่มีสัดส่วนของน้ำสูงจะทำให้พีกของสาร PIR และ LIN เกิดการแยกออกเป็น 2 พีกชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.2.5 ที่อัตราส่วนการผสมระหว่างสารละลายสกัดตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 3:7 (v/v) จะได้ค่าสัญญาณการตอบสนองการตรวจวัดสูงสุดและพีกชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนผสม 2:8 (v/v) แต่พบว่าที่อัตราส่วนนั้น สารที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดอื่นจะมีค่าสัญญาณการตอบสนองต่ำ และกราฟเทียบมาตรฐานไม่เป็นเส้นตรง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ค่าอัตราส่วนการเจือจางสารที่ระดับ 2:8 (v/v) ในการศึกษาต่อไปเพื่อให้สามารถตรวจวัดสารทุกชนิดได้ แต่หากในกรณีที่มีผู้ต้องการงานตรวจวัดเฉพาะสารประเภทที่กล่าวควรเลือกการใช้ค่าตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดกับสารที่ต้องการ

#### 4.2.3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ

ในงานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้างทั้ง 24 ชนิด ในเนื้อไก่ที่พัฒนาขึ้น โดยดำเนินการตรวจสอบตามสหภาพยุโรป 2002/657/EC เพื่อให้วิธีการเป็นที่ยอมรับตามเกณฑ์การตรวจสอบตกค้างเพื่อการส่งออก ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ การบ่งชี้ ความเฉพาะเจาะจง ผลของเมทริกซ์ที่มีต่อการตรวจวัด ความเป็นเส้นตรง ร้อยละการคืนกลับ ความเที่ยง และขีดจำกัดการตรวจวัด ดังแสดงผลดังนี้

##### 4.2.3.3.1 การบ่งชี้สาร (Identification)

ตามข้อกำหนดการระบุชนิดของยาตกค้าง ประเภทที่จำแนกอยู่ในกลุ่ม B คือ สารที่มีเกณฑ์ความเข้มข้นสูงสุดของการตกค้างที่ยอมให้มีได้ระบุอยู่ จะต้องใช้เกณฑ์คะแนนการบ่งชี้ไม่น้อยกว่า 3 คะแนน (Identification point, IP) ในกรณีผู้วิจัยเลือกการตรวจวัดสารทั้ง 24 ชนิด โดยเลือกวิธีการ MRM (Multireaction monitoring) โดยเลือก 1 precursor ion และ เลือก 2 product ions จาก precursor ion ที่กำหนดนี้ ดังนั้นแต่ละสารจึงมีคะแนน 4 คะแนน ( precursor = 1 คะแนน, product ion = 1.5 คะแนน) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนับได้ว่าเป็นที่น่าเชื่อถือและระบุบ่งชี้สารได้สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ยังใช้ค่ารีเทนชันใหม่ของสารแต่ละชนิดโดยวางค่าการยอมรับเวลาที่สารผ่านออกมานี้ให้อยู่ในช่วง  $\pm 3$  sd รวมถึงการพิจารณารูปร่างพีกและค่าสมมาตรประกอบด้วย นอกจากนั้นยังใช้อัตราส่วนของไอออนทั้ง 2 transitions (จาก 2 MRM ที่เลือก) เข้ามาพิจารณา

ร่วมด้วย โดยค่าเกณฑ์การยอมรับอัตราส่วนไอออนนี้จะอยู่ในช่วง  $\pm 3$  sd เช่นเดียวกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.2.2

#### 4.2.3.3.2 ค่าการเลือกจำเพาะ (Selectivity or Specificity)

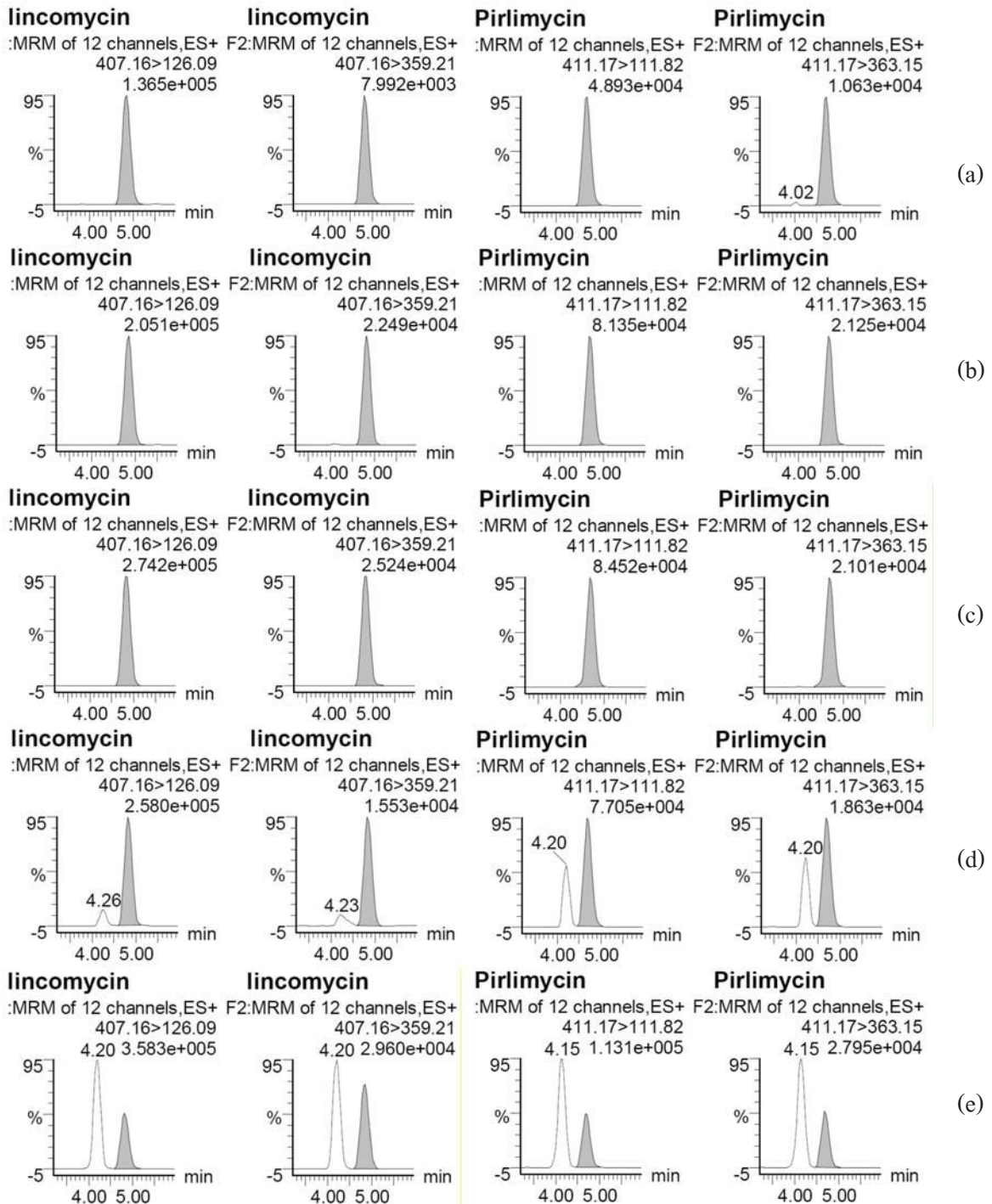
ค่าการเลือกจำเพาะนี้เน้นว่ามีความสำคัญในการจำแนกสารที่สนใจออกจากสารชนิดอื่นๆ ในการทดลองนี้ทำโดยการเลือกตัวอย่างเนื้อไก่ที่ใช้เป็นแบล็กจากแหล่งผลิตหลายแหล่งที่แตกต่างกันเพื่อให้มีความหลากหลายขององค์ประกอบการรบกวนการตรวจวัด จำนวน 20 ตัวอย่าง และทำการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวตัวอย่างเนื้อไก่แบล็กเหล่านั้น ทำการวิเคราะห์ค่ารีเทนชันไทม์ อัตราส่วนไอออน เพื่อการกำหนดค่าอัตราส่วนไอออนและเกณฑ์การยอมรับในการแยกความแตกต่างระหว่างสารที่ต้องการตรวจวัดกับสารรบกวนได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

#### 4.2.3.3.3 ผลของเมทริกซ์

ตัวอย่างเนื้อไก่จัดเป็นเมทริกซ์ที่มีโปรตีนและไขมันสูง ทำให้มีผลต่อการตรวจวัดและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวิธีการตรวจวัดด้วยระบบ ESI-MS เพราะจะทำให้การเกิดไอออนลดลง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความสับสนในการตรวจวัด ดังนั้นในการหาค่าการรบกวนการตรวจวัดจากอิทธิพลของเมทริกซ์ทำได้โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบสัญญาณการตอบสนองของสารแต่ละชนิดเมื่ออยู่ในตัวทำละลายกับสัญญาณการตอบสนองของสารเมื่ออยู่ในสารละลายสกัดเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2.5 จะเห็นได้ว่าการตอบสนองสัญญาณของสารจะลดลงในช่วงร้อยละ 79-99 ยกเว้นสาร DSTR และ STR ที่มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 53 และ 4 ตามลำดับ ด้วยเหตุผลนี้ในการทดลองนี้จึงเลือกที่จะใช้การเทียบมาตรฐานในสารละลายที่มีเนื้อเมทริกซ์เพื่อตัดการรบกวนของเมทริกซ์ที่มีผลให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณผิดพลาดในการทดลองต่อไป

#### 4.2.3.3.4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

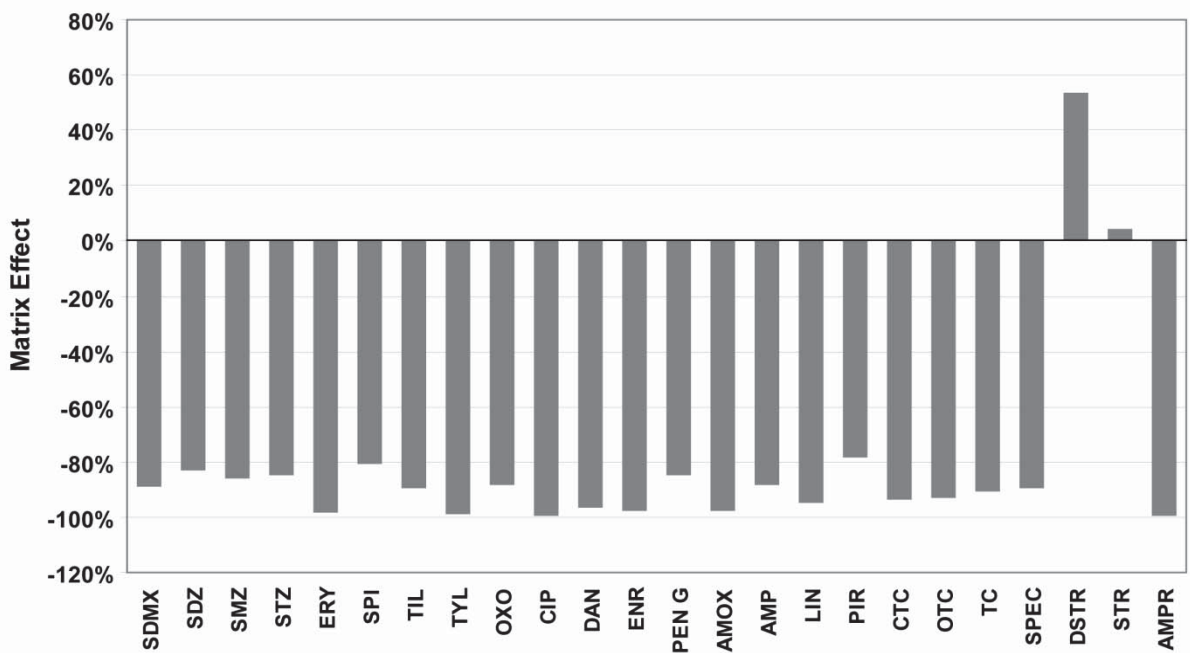
ความเป็นเส้นตรงของวิธีการตรวจวัดทำโดยการสร้างกราฟเทียบมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายสกัดเมทริกซ์แบล็ก เตรียมที่ 10 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยใช้สมการ linear regression และพิจารณาค่า  $R^2$  พบว่าสารทั้ง 24 ชนิดให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี ค่า  $R^2$  อยู่ในช่วง 0.9991-0.9938 ดังแสดงในตารางที่ 4.2.3



**รูปที่ 4.2.5** ภาพโครมาโทแกรมเปรียบเทียบความแรงของตัวทำละลายที่มีผลต่อการแยกสาร lincomycin (LIN) และ pirlimycin (PIR) ที่ระดับความเข้มข้น MRL อัตราส่วนสารละลาย สกัดตัวอย่างต่อตัวทำละลายผสม (10% formic acid ในน้ำ : MeCN (1:9, v/v); (a) 1:9, (b) 2:8, (c) 3:7, (d) 4:6 และ (e) 5:5

**ตารางที่ 4.2.2** Molecular weights, retention times,  $t_R$  (acceptable ranges,  $\pm 3$  SD), ion transitions, optimized MS/MS parameters, and ion ratios (acceptable ranges,  $\pm 3$  SD) vs. concentrations of the 24 veterinary drugs in HILIC-UPLC-ESI(+)-MS/MS.

Analyte	M.W.	$t_R$ (min)	Cone voltage(V)	Quantification transition ( $m/z$ )	CE (eV)	Confirmation Transition ( $m/z$ )	CE (eV)	Ion ratio		
								0.5-MRL	MRL	1.5-MRL
Sulfamethoxine	310.3	1.42 $\pm$ 0.03	40	311.08 > 156.16	25	311.08 > 108.16	35	0.34 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.01
Sulfamethazine	278.3	1.47 $\pm$ 0.02	35	279.09 > 186.02	20	279.09 > 124.07	30	0.56 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.03
Penicillin G	334.4	1.50 $\pm$ 0.01	45	335.32 > 217.24	15	335.32 > 90.91	35	0.83 $\pm$ 0.18	0.80 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.02
Oxolinic acid	261.2	1.50 $\pm$ 0.02	32	262.10 > 244.13	20	262.10 > 216.02	35	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
Sulfadiazine	250.3	1.55 $\pm$ 0.02	25	251.10 > 155.91	15	251.10 > 107.84	25	0.48 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.01
Sulfathiazole	255.3	1.76 $\pm$ 0.02	30	256.09 > 107.87	25	256.09 > 155.93	15	0.40 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.02
Tylosin	916.1	4.37 $\pm$ 0.03	57	916.48 > 174.19	40	916.48 > 772.94	35	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Erythromycin	733.9	4.44 $\pm$ 0.06	25	734.57 > 576.38	25	734.57 > 522.34	25	0.30 $\pm$ 0.09	0.29 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.08
Enrofloxacin	359.4	4.55 $\pm$ 0.06	30	360.14 > 245.09	35	360.14 > 316.00	26	0.68 $\pm$ 0.17	0.69 $\pm$ 0.18	0.65 $\pm$ 0.09
Chlortetracycline	478.9	4.62 $\pm$ 0.03	30	479.11 > 462.07	18	479.11 > 444.16	20	0.91 $\pm$ 0.23	0.91 $\pm$ 0.09	0.90 $\pm$ 0.09
Danofloxacin	357.3	4.65 $\pm$ 0.03	35	358.15 > 82.22	45	358.15 > 340.00	35	0.31 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.06
Ciprofloxacin	331.3	4.69 $\pm$ 0.02	37	332.22 > 314.22	23	332.22 > 245.22	25	0.58 $\pm$ 0.16	0.55 $\pm$ 0.14	0.62 $\pm$ 0.13
Pirlimycin	410.1	4.71 $\pm$ 0.02	35	411.17 > 111.82	27	411.17 > 363.15	18	0.25 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.02
Ampicillin	349.4	4.75 $\pm$ 0.02	25	350.23 > 105.90	20	350.23 > 192.10	15	0.31 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.12	0.36 $\pm$ 0.13
Amoxicillin	365.4	4.81 $\pm$ 0.06	20	366.25 > 208.15	13	366.25 > 349.20	10	0.57 $\pm$ 0.13	0.58 $\pm$ 0.19	0.56 $\pm$ 0.06
Tetracycline	444.4	4.82 $\pm$ 0.03	25	445.25 > 410.45	20	445.25 > 154.15	25	0.72 $\pm$ 0.16	0.69 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.07
Lincomycin	406.5	4.85 $\pm$ 0.02	40	407.16 > 126.09	30	407.16 > 359.21	20	0.07 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.03
Tilcomycin	869.1	4.88 $\pm$ 0.03	55	869.53 > 174.39	55	869.53 > 696.51	50	0.53 $\pm$ 0.14	0.52 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.18
Oxytetracycline	460.4	4.89 $\pm$ 0.04	27	461.19 > 426.18	20	461.19 > 443.21	13	0.52 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.11	0.50 $\pm$ 0.08
Spiramycin	843.1	4.97 $\pm$ 0.04	30	843.51 > 174.10	45	843.51 > 101.07	58	0.22 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.05
Amprolium	278.8	5.41 $\pm$ 0.05	20	243.11 > 150.05	15	243.11 > 122.03	25	0.14 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.03
Spectinomycin	332.3	6.33 $\pm$ 0.03	35	351.21 > 333.27	20	351.21 > 97.75	30	0.76 $\pm$ 0.15	0.80 $\pm$ 0.14	0.79 $\pm$ 0.16
Dihydrostreptomycin	583.6	7.57 $\pm$ 0.04	60	584.14 > 263.18	30	584.14 > 246.15	40	0.35 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.07
Streptomycin	581.6	7.65 $\pm$ 0.03	65	582.14 > 263.27	30	582.14 > 246.14	40	0.54 $\pm$ 0.27	0.53 $\pm$ 0.13	0.51 $\pm$ 0.21



รูปที่ 4.2.6 ผลของเมทริกซ์ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS แสดงค่าเปรียบเทียบร้อยละของความแตกต่างของสัญญาณการตอบสนองของกรณีสารมาตรฐานอยู่ในตัวทำลายเทียบกับกรณีสารมาตรฐานอยู่ในสารละลายสกัดเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้น MRL ของสารทุกชนิดที่ทำการตรวจวัด

#### 4.2.3.3.5 ค่าร้อยละการคืนกลับ (Recovery)

การยืนยันความแม่นยำของวิธีการทำโดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ เมื่อเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่เอนกแบลงก์ ในงานวิจัยนี้ทดลองทำที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 เท่าของค่า MRL ของสารแต่ละชนิด ในการศึกษาที่แต่ละความเข้มข้นจะทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.2.4 จะเห็นได้ว่าสารส่วนใหญ่ให้ค่าร้อยละการคืนกลับดีมากในช่วง 70-99 ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของสหภาพยุโรปที่กำหนดที่ระดับ 70-120% แต่อย่างไรก็ตามสาร sulfonamides, ERY และ SPI มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่สารสลายตัว กลุ่ม sulfonamides ให้ค่าร้อยละการคืนกลับในช่วง 60-73 และมีค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์  $\leq 11\%$  สำหรับ ERY ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 53-57 และมีค่าเท่ากับในทุกระดับความเข้มข้น แสดงให้เห็นถึงการสูญหายไปของสารในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง หรืออาจเนื่องจากการที่ ERY มีค่า  $pK_a \sim 8.8$  จะเกิดการแตกตัวเป็นประจุเมื่อทำการสกัดด้วยกรดและอาจเข้ารวมตัวกับเมทริกซ์จึงทำให้มีค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ อีกทั้งจากการศึกษาผลของเมทริกซ์พบว่าสารชนิดนี้มีผลการรบกวนของเมทริกซ์สูงกว่า 98% ในกรณีของ SPI

จะให้ผลคล้ายคลึงกันกับ ERY โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับที่ 65-75 แต่แม้ว่าทั้งสารกลุ่ม sulfonamides, ERY และ SPI จะให้ค่าร้อยละการคืนกลับต่ำ แต่ให้ค่าความเที่ยงหรือค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ต่ำ  $\leq 15\%$  จึงสรุปได้ว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับในการศึกษา ทั้ง 24 ชนิด

#### 4.2.3.3.6 ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยงของวิธีการอธิบายได้ในเทอมของค่า repeatability (intra-day precision) และ within-laboratory reproducibility (inter-day precision) โดยใช้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการตรวจวัดซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 0.5 MRL และ MRL ซีดจำกัดของค่าความเที่ยงนั้นขึ้นกับระดับความเข้มข้นที่ศึกษา ในงานวิจัยนี้ใช้สมการฮอร์วิทซ์ (Horwitz equation) ในการคำนวณเกณฑ์การยอมรับของค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.2.4 พบว่าความเที่ยงในวันเดียวกันของทุกสารที่ทำการศึกษามีค่าความเที่ยงน้อยกว่า 15% RSD ทั้งในระดับ MRL และ 0.5 MRL ยกเว้น AMOX มีค่า 18% RSD ที่ระดับ 0.5 MRL และ MRL และ SDZ อยู่ที่ระดับ 16% RSD ที่ 0.1 MRL ในการศึกษาความเที่ยงที่ทำในต่างวันนั้นค่าความเที่ยงของสารทุกชนิดยังคงอยู่ในระดับน้อยกว่า 15% RSD เช่นเดียวกัน ค่าความเที่ยงของวิธีการนี้ไม่เกินค่าขีดจำกัดของสมการฮอร์วิทซ์ ดังนั้นจึงถือได้ว่าวิธีการที่ใช้มีความเที่ยงในเกณฑ์ดีและเป็นที่ยอมรับได้

#### 4.2.3.3.7 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Analytical Limit)

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของกลุ่มสารที่มีการกำหนดค่า MRL โดยใช้ค่ารวมความเข้มข้นของสารทั้งหมดนั้น วิธีการที่เลือกใช้ในการตรวจวัดจำเป็นที่จะต้องมีความมั่นใจในค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน (lowest calibrated level, LCL) ในงานวิจัยนี้เตรียมกราฟเทียบมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานที่อยู่ในตัวทำละลายเนื้อเมทริกซ์หรือที่เรียกว่า matrix-matched calibration standards ค่า LODs และ LOQs ทำโดยการใช้ตัวอย่างเนื้อไก่แบลงก์ที่เติมสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ระดับ LCL ลงไป และทำการวัดค่าสัญญาณการตอบสนอง จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นที่จะทำให้สัญญาณการตอบสนองที่ 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนตามลำดับ โดยเลือกเฉพาะค่า transition ที่ให้สัญญาณสูงสุดของสารแต่ละชนิดในการกำหนดค่า พบว่าค่า LODs ของสารทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.1-20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQs อยู่ที่ 0.3-60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น aminoglycosides และ AMPR จะมีค่า LOD และ LOQ สูงกว่าสารอื่น เนื่องจากสารเหล่านี้ออกมาจากคอลัมน์ช้าที่สุดทำให้มีสภาพไวการตรวจวัดต่ำ และผลของเมทริกซ์รบกวนมากกว่าสารอื่นๆ แต่ค่าที่ได้นั้นยังคงต่ำกว่าค่า MRL ของสารแม้ว่าในการตรวจวัดของวิธีการนี้จะทำการเจือจางสารถึง 2:8 แต่สามารถตรวจวัดได้ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมให้มีได้ ดังนั้นวิธีการนี้จึงจัดได้ว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวัดได้อย่างดียิ่ง

ตารางที่ 4.2.3 Established maximum residue limit (MRL) for 24 veterinary drugs in chicken muscle and analytical limits of 24 analytes in chicken muscle extracts

Analyte	MRL (EU) (µg/kg)	Typical $R^2$	LCL (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	CC $\alpha$ (µg/kg)	CC $\beta$ (µg/kg)
SDMX	100 <sup>a</sup>	0.9938	0.5	0.1	0.3	108	115
SDZ	100 <sup>a</sup>	0.9987	0.5	0.1	0.3	110	117
SMZ	100 <sup>a</sup>	0.9970	0.5	0.1	0.3	107	117
STZ	100 <sup>a</sup>	0.9971	0.5	0.1	0.3	108	117
CIP	100 <sup>b</sup>	0.9940	1.0	1.5	5.0	112	136
DAN	200	0.9953	5.0	0.2	0.7	213	232
ENR	100 <sup>b</sup>	0.9945	1.0	0.5	1.7	110	124
OXO	100	0.9986	2.0	3.0	10	108	116
CTC	100	0.9973	2.0	1.0	3.0	106	120
OTC	100	0.9972	2.0	3.0	10	108	120
TC	100	0.9985	2.0	1.0	3.0	109	125
AMOX	50	0.9942	1.0	2.5	8.5	68	81
AMP	50	0.9973	1.0	1.5	5.0	58	73
PEN G	50	0.9989	1.0	1.5	5.0	58	65
LIN	100	0.9989	2.0	0.5	1.8	106	125
PIR	100	0.9988	2.0	0.2	0.7	105	120
ERY	200	0.9955	5.0	1.5	5.0	205	211
SPI	200	0.9970	5.0	4.0	13	213	226
TIL	50	0.9973	1.0	0.5	1.7	67	84
TYL	100	0.9991	2.0	1.5	5.0	105	109
AMPR	200	0.9956	5.0	8.0	25	215	233
DSTR	500	0.9988	10	20	60	509	522
SPEC	300	0.9974	5.0	10	30	307	320
STR	500	0.9979	10	20	60	510	525

<sup>a</sup> Expressed in form of sum-MRLs of all sulfonamides

<sup>b</sup> Expressed in form of sum-MRLs of ENR and its metabolite (CIP)

ตารางที่ 4.2.4 Recovery, repeatability, within-laboratory reproducibility, and acceptable RSD values for chicken muscle at different spiking levels.

Analyte	% Recovery (%RSD) <sup>a</sup>			Repeatability <sup>b</sup>						Within-laboratory reproducibility <sup>c</sup>		Acceptable RSD value <sup>d</sup>	
	0.5-MRL	MRL	1.5-MRL	0.5-MRL			MRL			0.5-MRL	MRL	0.5-MRL	MRL
				Day1	Day2	Day3	Day1	Day2	Day3				
SMZ <sup>e</sup>	61(11)	66(3)	68(8)	11	11	8	3	8	5	10	6	19	17
SDZ <sup>e</sup>	65(8)	70(4)	72(7)	8	16	5	4	12	4	12	8	19	17
SDMX <sup>e</sup>	60(11)	66(4)	66(6)	11	12	5	4	10	5	10	7	19	17
STZ <sup>e</sup>	68(10)	73(6)	66(7)	8	11	4	6	7	4	9	7	19	17
CIP <sup>f</sup>	85(6)	84(10)	84(5)	10	15	11	10	5	11	12	10	19	17
DAN	82(8)	86(9)	93(6)	8	8	6	9	12	9	9	10	15	13
ENR <sup>f</sup>	77(6)	93(6)	92(10)	6	13	12	6	7	7	11	7	19	17
OXO	72(6)	68(5)	99(4)	6	12	5	5	9	4	8	6	17	15
CTC	79(12)	80(4)	89(6)	12	15	10	4	4	9	14	7	17	15
OTC	70(14)	73(6)	93(4)	14	9	8	6	6	5	13	6	17	15
TC	83(10)	83(4)	83(5)	10	10	9	4	9	10	10	9	17	15
AMOX	68(14)	76(14)	68(14)	14	18	13	14	14	12	15	13	19	17
AMP	73(15)	71(7)	79(7)	15	4	9	7	6	8	13	8	19	17
PEN G	64(6)	70(5)	87(5)	6	8	7	5	4	7	7	7	19	17
LIN	75(4)	71(2)	98(3)	4	2	6	2	7	9	5	8	17	15
PIR	71(3)	73(5)	90(4)	3	6	6	5	2	7	6	5	17	15
ERY	53(6)	57(4)	55(7)	6	12	10	4	4	6	11	6	15	13
SPI	75(7)	67(7)	65(7)	7	11	8	7	9	8	10	10	15	13
TIL	85(10)	81(6)	84(5)	10	15	12	6	14	9	13	11	19	17
TYL	80(4)	75(4)	80(7)	4	11	4	4	3	3	8	4	17	15
AMPR	77(7)	85(9)	91(4)	7	8	8	9	9	9	8	11	15	13
DSTR	82(12)	72(8)	84(9)	12	10	5	8	8	9	9	9	13	12
SPEC	83(6)	77(6)	88(6)	6	8	8	6	5	7	7	6	15	13
STR	83(12)	74(9)	84(3)	12	11	9	9	5	9	11	9	13	12

<sup>a</sup> Recovery results of spiked samples for 10 replicates of 3 days at each spiking level

<sup>b</sup> Repeatability results of spiked samples for 10 replicates at each spiking level

<sup>c</sup> Within-laboratory reproducibility results for 3 days (n=30) at each spiking level

<sup>d</sup> Acceptable RSD values calculated from Horwitz equation at each concentration levels

<sup>e</sup> All sulfonamides spiked at 0.1-, 0.2-, and 0.4-MRL <sup>f</sup> ENR and CIP spiked at 0.2-, 0.5- and 1.0-MRL

ค่าขีดจำกัดการตัดสินใจ (decision limit,  $CC\alpha$ ) ของวิธีการสามารถหาได้จากค่าความคลาดเคลื่อนทางสถิติที่ระดับ 5% ของความเชื่อมั่น หรือโอกาสที่จะเป็นความผิดพลาดในเชิงบวก (false positive) และขีดจำกัดความสามารถ (detection capability,  $CC\beta$ ) คือค่าความเข้มข้นของสารที่วิธีการสามารถตรวจวัด บ่งชี้ และหาปริมาณได้ โดยมีความผิดพลาดของการระบุผลน้อยกว่า 5% (false negative) กรณีสารที่มีค่า MRL กำหนด การหาค่า  $CC\alpha$  และ  $CC\beta$  ทำได้โดยการใช้กราฟเทียบมาตรฐานหรือใช้ตัวอย่างเนื้อไก่แปลงที่เติมสารมาตรฐานทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้น MRL ลงไป จำนวน 20 ตัวอย่างก่อนการสกัด ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการหลังเนื่องจากให้ความมั่นใจได้มากกว่า จากการตรวจวัดทั้ง 20 ตัวอย่าง หาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) จากนั้นรายงานค่า  $CC\alpha$  โดยใช้ค่า  $MRL + 1.64\ sd$  และค่า  $CC\beta$  มีค่าเท่ากับค่า  $CC\alpha - 1.64\ sd$  แสดงผลไว้ในตารางที่ 4.2.3

#### 4.2.3.4 การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง

เพื่อเป็นการยืนยันความเหมาะสมของวิธีการ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ในการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อไก่ในท้องตลาดจำนวน 30 ตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายแตกต่างกันในกรุงเทพมหานคร และใช้กราฟเทียบมาตรฐานในเนื้อเมทริกซ์เช่นเดิม โดยใช้หลักการบ่งชี้สารที่มีคาร์เทนชันโทรม์ในช่วง  $t_R \pm 3\ sd$  และค่าอัตราส่วนไอออนของทั้ง 2 transitions ที่เลือกต้องอยู่ในช่วง  $\pm 3\ sd$  เช่นกัน (จากค่าที่เคยกำหนดไว้ในขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ) พบว่าเนื้อไก่ตัวอย่างที่ตรวจสอบนั้น พบเฉพาะสาร ENR เพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ในระดับปริมาณ 6.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่เกินค่า MRL ของสารนี้ที่กำหนดอยู่ที่ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าเนื้อไก่ที่จำหน่ายในท้องตลาดมีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนสารกลุ่มยาสัตว์ และผู้วิจัยยังได้ทดลองใช้วิธีการเดียวกันนี้ในการตรวจสอบสารตกค้างกลุ่มนี้ในตัวอย่างกุ้งและไข่ พบว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบได้ดีเช่นเดียวกัน

#### 4.2.4 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดสารกลุ่มยาสัตว์ตกค้างในเนื้อไก่ที่ครอบคลุมกลุ่มของยา 7 กลุ่ม คือ Sulfonamides, Quinolones, Tetracyclines, Penicillins, Aminoglycosides, Lincosamides, Coccidiostats และ Macrolides โดยเลือกสารตัวแทนของแต่ละกลุ่ม รวมสารที่ใช้ในการศึกษาทั้งสิ้น 24 ชนิด ใช้วิธีการสกัดตัวอย่างที่ง่ายและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS ใช้คอลัมน์แยกในระบบ HILIC สามารถแยกและวิเคราะห์สารเชิงปริมาณได้อย่างดีเยี่ยม การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทำตามหลักเกณฑ์ของมาตรฐานวิธีการตรวจสอบสารตกค้างของสหภาพยุโรป ผลการทดสอบทั้งค่าการบ่งชี้ ความเฉพาะเจาะจง ความเที่ยง ความแม่นยำ ความเป็นเส้นตรง และขีดจำกัดการวิเคราะห์ ชี้ให้เห็นชัดเจนว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้เป็นวิธีการที่ง่าย ตรวจสอบได้รวดเร็ว

ครอบคลุมสารที่มีสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้ไม่น้อยกว่า 30-40 ตัวอย่างต่อวัน มีประสิทธิภาพความเที่ยงและความแม่นยำสูง เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

#### 4.2.5 เอกสารอ้างอิง

1. A.A.M. Stolker, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15–53.
2. Commission of the European Communities, Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC). *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8–36.
3. A. Strasser, R. Dietrich, E. Usleber, E. Martlbauer, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 11–19.
4. S. Sachetelli, C. Beaulac, J. Lagace, *Biochim. Biophys. Acta* 1379 (1998) 35–41.
5. T.F.H. Bovee, M.G. Pikkemaat, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8035–8050.
6. A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259–264.
7. S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 63–70.
8. M. Becker, E. Zittlau, M. Petz, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 19–32.
9. A. Kaufmann, K. Maden, *J AOAC Int.* 88 (2005) 1118–1125.
10. W. Zhu, J. Yang, W. Wei, Y. Liu, S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 29–37.
11. K. Granelli, C. Branzell, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 289–295.
12. J. Chico, A. Ruybies, F. Centrich, R. Company, M.D. Prat, M. Granados, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 189–199.
13. Y.A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.H. LeBreton, P.A. Guy, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 58–76.
14. H. Li, P.J. Kijak, S.B. Turnipseed, W. Cui, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 836 (2006) 22–38.
15. D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8217–8223.
16. G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68–78. 585
17. V. Carretero, C. Blasco, Y. Pico, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 162–173.
18. R. Yamada, M. Kozono, T. Ohmori, F. Morimatsu, M. Kitayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 54–65. 588
19. A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 66–79. 590
20. A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177–196.
21. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 474–503.

22. E.S. Grumbach, D.M.Wagrowski-Diehl, J.R. Mazzeo, B. Alden, P.C. Iraneta, LC–GC N. Am. 22 (2004) 1010–1023.
23. A.R. Oyler, B.L. Armstrong, J.Y. Cha, M.X. Zhou, Q. Yang, R.I. Robinson, R. Dunphy, D.J. Burinsky, J. Chromatogr. A 734 (1996) 378–383.
24. W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 82–91.
25. A.J. Alpert, M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly, R. Orlando, J. Chromatogr. A 676 (1994) 191–202.
26. C.P. Dell’Aversano, P. Hess, M.A. Quilliam, J. Chromatogr. A 1081 (2005) 190–201.
27. G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, J. Chromatogr. A 1092 (2005) 246–249.
28. Z. Huang, M.A. Richards, Y. Zha, R. Francis, R. Lozano, J. Ruan, J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 809–814.
29. R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, J. Chromatogr. A 1058 (2004) 197–201.
30. R. Oertel, U. Renner, W. Kirch, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 633–638.
31. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate- General, Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC, 609 SANCO/2004/2726 rev. 4, 2008.
32. SeQuant, A Practical Guide to HILIC, SeQuant, Umeå, Sweden, 2008.
33. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, 2009, Nutrient Data Laboratory Home Page: [www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl](http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl). (assessed on October 2010)
34. U. Koesukwiwat, S. Jayanta, N. Leepipatpiboon, J. Chromatogr. A 1140 (2007) 147–156. 616
35. W. Horwitz, R. Albert, J. AOAC Int. 89 (2006) 1095–1109.

### 4.3 โครงการย่อย 3.2: การวิเคราะห์แบบพร้อมกันของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่ตกค้างในน้ำด้วยการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาและตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

#### 4.3.1 บทนำ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสนใจทั้งในด้านอันตรายและผลกระทบต่อระยะยาว จำนวนประชากรและแหล่งอุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นส่งผลอย่างมากต่อการเกิดมลภาวะทั่วโลกโดยเฉพาะมลภาวะทางน้ำ ปริมาณของเสียที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำมีมากเกินกว่าที่ระบบนิเวศจะรองรับได้ สารเคมีปนเปื้อนในแหล่งน้ำจัดเป็นปัญหาสำคัญ ที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อทั้งทางสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชากร เช่น การที่สารปฏิชีวนะตกค้างในแหล่งน้ำจะส่งผลให้เกิดการดื้อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียหรือการดื้อยา ลดประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ [1-4] เนื่องจากสารปฏิชีวนะนิยมใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรีย หรือใช้เร่งการเจริญเติบโตของฝูงปศุสัตว์อย่างผิดกฎหมาย กลุ่มสารปฏิชีวนะสำคัญที่พบว่าการปนเปื้อนในแหล่งน้ำมี 4 กลุ่ม คือ Macrolide, Sulfonamide, Tetracycline และ Quinolone [5] สารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide นิยมใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจของสัตว์ กลุ่ม Sulfonamide ใช้ป้องกันและรักษาโรคสัตว์ในฟาร์มสัตว์เลี้ยงและสัตว์น้ำ กลุ่ม Tetracycline เป็นยาสำหรับมนุษย์และปศุสัตว์รักษาโรคจากแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ กลุ่ม Quinolone รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของมนุษย์และสัตว์ สารปฏิชีวนะหลายชนิดออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน และจากการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง จึงตรวจพบการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ได้ในแหล่งน้ำ [6] มีรายงานการวิจัยการตรวจพบสารปฏิชีวนะในแหล่งน้ำอย่างกว้างขวาง [5,7] ความหลากหลายของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแตกต่างกัน ประกอบกับการที่สารปฏิชีวนะมีการตกค้างในแหล่งน้ำอยู่ในระดับต่ำ (ไมโครกรัมต่อลิตรถึงนาโนกรัมต่อลิตร) ทำให้การตรวจวัดสารตกค้างหลายชนิดในน้ำมีความยากและซับซ้อน ต้องอาศัยวิธีการที่มีความจำเพาะและสภาพไวสูง

เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดสารปฏิชีวนะเนื่องจากสามารถแยกและตรวจวัดสารในสารผสมไม่ว่าจะเป็นสารกลุ่มเดียวกันหรือสารต่างกลุ่มกัน และเทคนิคนี้เข้ามาแทนที่เทคนิคเดิมที่เคยใช้กันอยู่ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการแยกสารและสภาพไวการวิเคราะห์สูงกว่า [8,9] ในด้านของเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง การสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) และการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction) จัดเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์น้ำ [4,8-12] เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป แต่ต้องใช้ตัวทำละลายและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง Pedersen-Bjergaard และคณะ [13] นำเสนอวิธีการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง (hollow-fiber liquid-phase microextraction) เทคนิคนี้มีข้อดีเหนือกว่าเนื่องจากมีความจำเพาะและประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น (enrichment

factor) สูง เส้นใยกลวงมีลักษณะเหมือนกับเมมเบรนขนาดใหญ่ แต่มีขนาดเล็กกว่า ราคาถูก สามารถใช้แล้วทิ้งได้ทันที ไม่พบปัญหาสารตกค้างเหมือนในเมมเบรนขนาดใหญ่ และการที่เส้นใยกลวงมีขนาดเล็กทำให้มีข้อได้เปรียบหลายด้าน เช่น ใช้งานง่าย ไม่ต้องอาศัยปั๊มแรงดันสูง ค่าใช้จ่ายต่ำ ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยมาก และมีประสิทธิภาพในการขจัดสิ่งรบกวน (clean up) ตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในรูพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงทำหน้าที่เป็นเมมเบรนชนิดของเหลว สารที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกสกัดจากสารตัวอย่างหรือเรียกว่าสารละลายตัวให้ (Donor) ผ่านเมมเบรนชนิดของเหลวหรือตัวทำละลาย เข้าสู่สารละลายตัวรับ (Acceptor) ที่บรรจุอยู่ภายในท่อของเส้นใยกลวง หากสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นกรดหรือเบสที่มีหมู่ฟังก์ชันที่เกิดประจุได้ จะใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงชนิด 3 เฟส [14-16] คือเฟสสารละลายตัวอย่างที่เป็นน้ำ กับเฟสสารละลายอินทรีย์ในรูพรุนของเส้นใยกลวง และเฟสสารละลายตัวรับที่เป็นเอเควีเอส การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงมีการนำไปใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของสารในตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ เช่น น้ำดื่ม [17] น้ำประปา [18] น้ำจากแม่น้ำ [19] น้ำทิ้ง [20]

การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา (carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction) พัฒนาโดย Ho และคณะ [21] อาศัยหลักการจับคู่ของประจุ (ion-pairing) เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการสกัดโดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสภาพเป็นกลางระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์และสารตัวพา (carrier) ซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลาย ทำหน้าที่ให้เกิดการจับคู่ของประจุ (ion-pairing agent) ตัวอย่างของสารตัวพาที่นิยมนำไปใช้ ได้แก่ Aliquat336 [22-25], D2EHPA [22, 24, 26, 27], 2-ethylhexyl phosphonic acid [24] และ Sodiumoctanoate [21, 28] เทคนิคนี้มีผู้การนำไปใช้ในการสกัดสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในตัวอย่างชีวภาพ พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารได้ 3 ชนิดแต่ต้องเป็นสารที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเหมือนกัน ตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง-ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรเมตรีได้ที่ระดับไมโครกรัมต่อลิตร [25] สำหรับการสกัดสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มในตัวอย่างน้ำ มีการศึกษาโดยใช้อุปกรณ์การสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง 4 รูปแบบที่แตกต่างกัน เพิ่มความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ 4 ชนิดจาก 4 กลุ่ม ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจวัดสารปฏิชีวนะได้เพียง 3 ชนิดโดยใช้อุปกรณ์การสกัด 3 รูปแบบที่แตกต่างกันสำหรับสารแต่ละชนิด [29] ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นของเทคนิคนี้จะขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ค่าคงที่การแตกตัวของกรด (pKa) ชนิดของสารตัวพา สภาพในการสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดขึ้นกับสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารนั้น งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง โดยใช้สารตัวพาในการสกัดสารปฏิชีวนะ 11 ชนิดจาก 4 กลุ่มพร้อมกันและใช้อุปกรณ์การสกัดเพียงรูปแบบเดียว โดยเลือกตัวทำละลายที่มีสารตัวพาที่เหมาะสมบรรจุในรูพรุนของเส้นใยกลวง หาภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจวัด ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

#### 4.3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

##### 4.3.2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

สารปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้มีทั้งหมด 11 ชนิดจาก 4 กลุ่ม ได้แก่ Erythromycin (ERY), Spiramycin (SPI), Tilmicosin (TIL), Ciprofloxacin (CFC), Enrofloxacin (EFC), Danofloxacin (DFC), Sulfathiazole (STZ), Sulfamethazine (SMZ), Sulfamerazine (SMR), Oxytetracyclinehydrochloride (OTC) และ Tetracycline hydrochloride (TC) โครงสร้างทางเคมีและค่าคงที่การแตกตัวของกรดของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดแสดงในตารางที่ 3.1

สำหรับสารตัวพาที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ Tricaprylmethylammonium chloride (Aliquat 336), Bis(2-ethylhexyl) monohydrogenphosphoric acid (D2EHPA) และ 2-Hydroxy-5-nonylacetophenoneoxime (LIX 84) สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Dihexyl ether (DHE), Ammonium acetate, Ammonium formate, Disodium tetraborate decahydrate, Acetonitrile, Acetic acid, Hydrochloric acid, Formic acid, Sodium hydroxide, Methanol และน้ำบริสุทธิ์สูง (Milli-Q water)

##### 4.3.2.2 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานผสมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดมีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมได้จากการละลายสารปฏิชีวนะ ERY, SPI, TIL, STZ, SMZ, SMR, DFC และ EFC แต่ละชนิดใน Acetonitrile และสำหรับสารปฏิชีวนะ OTC และ TC ละลายสารแต่ละชนิดใน Methanol และละลายสาร CFC ด้วยสารละลาย 0.1 M formic acid การเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานดังกล่าวทำโดยในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อจะนำไปใช้ให้นำสารละลายมาตรฐานทั้ง 11 ชนิดนี้เจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงเพื่อให้ได้สารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

##### 4.3.2.3 ระบบการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ

เครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

เครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมากใช้ระบบ Acquity ของบริษัท Waters เชื่อมต่อกับ ระบบ Micromass Quattro Premier™ XE benchtop quadrupole ของส่วนแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีโดยใช้การสร้างประจุแบบ positive electrospray ionization (ESI+) สำหรับการแยกสารในส่วนของเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมากจะใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดด้วยการแยกแบบ gradient elution และใช้คอลัมน์ในการแยกสารคือ Acquity UPLC BEH ของบริษัท Waters มีขนาดความยาวเท่ากับ 100 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด

2.1 มิลลิเมตร และเฟสอยู่กับที่มีขนาด 1.7 ไมโครเมตร อัตราการไหลของสารเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร ต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ชนิด A คือ 10 mM ammonium acetate และ 0.3% (v/v) acetic acid เฟสเคลื่อนที่ชนิด B คือ methanol:acetonitrile (50:50 v/v) และ 0.3% (v/v) acetic acid ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่องคือ 10 ไมโครลิตร การแยกสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดใช้เวลา 5.5 นาที ใช้การแยกแบบ gradient elution ดังนี้คือ เริ่มต้นที่อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 95:5 (v/v) A:B ในเวลา 1.5 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็น 35:65 (v/v) A:B ที่เวลา 3.0 นาที และใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่นี้เป็นเวลา 2.0 นาที จากนั้น เพิ่มเป็น 100% B ในเวลา 5.5 นาที และรักษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่นี้เป็นระยะเวลา 4.5 นาที จากนั้นกลับเข้าสู่ 5% B เป็นเวลา 10.5 นาที

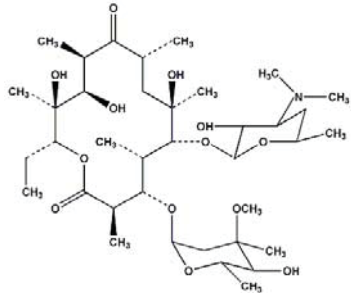
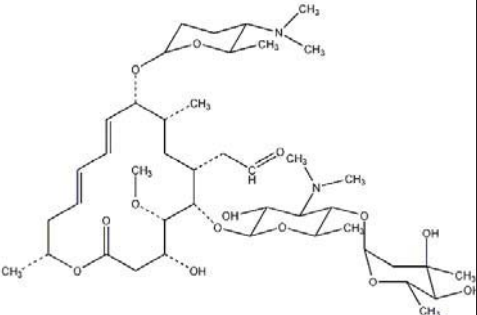
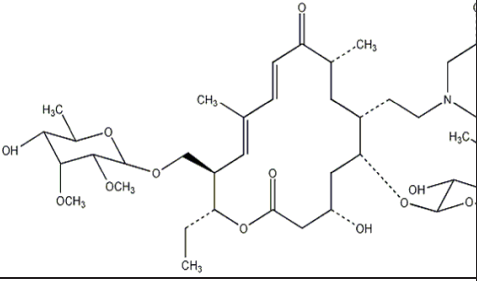
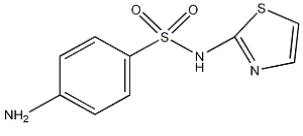
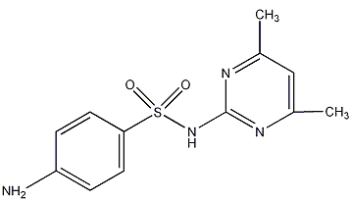
สภาวะของระบบแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีเป็นดังนี้คือ capillary voltage 1 kV, extractor voltage 3 V, source temperature 120°C, desolvation temperature 350°C, cone gas (nitrogen) flow 50 L h<sup>-1</sup>, desolvation gas (nitrogen) flow 1000 L h<sup>-1</sup> และ collision gas (argon) 0.22 mL min<sup>-1</sup> ที่ cell pressure 0.35 Pa ตรวจวัดประจูดัวยระบบ Multiple reactions monitoring โดยการเลือกช่วง transition ที่มีสภาพไวสูงสุด 2 ค่า สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ซึ่งค่า transition ของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดที่เลือกใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3.2 ระบบควบคุมเครื่องมือและประมวลผลใช้ MassLynx 4.1 software package

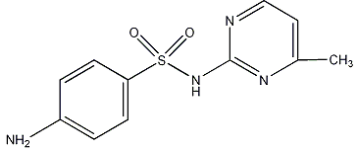
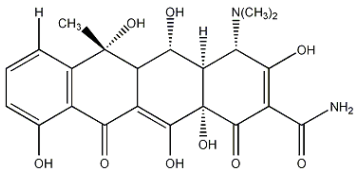
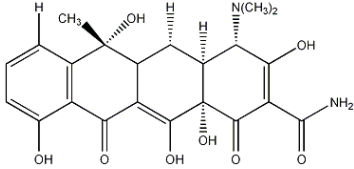
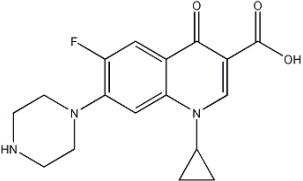
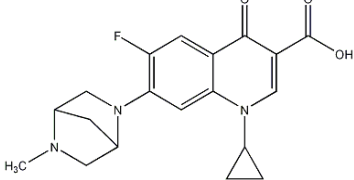
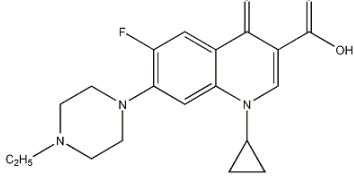
#### 4.3.2.4 ขั้นตอนของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวง

การศึกษาเลือกใช้เส้นใยกลวงชนิด polypropylene รุ่น Accurel<sup>®</sup> PP Q3/2 ของบริษัท Membrana มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 600 ไมโครเมตร ความหนาของผนังเท่ากับ 200 ไมโครเมตร มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร และมีความเป็นรูพรุนคิดเป็น 75% การเตรียมอุปกรณ์การสกัดเริ่มจากการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยกลวงด้วยการทำ sonication ใน acetone จากนั้นทิ้งให้แห้ง เส้นใยกลวงแต่ละชิ้นจะใช้เพียงครั้งเดียว เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อน นำเส้นใยกลวงไปแช่ใน 20%(w/v) Aliquat 336 ใน DHE เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้ตัวทำละลายที่มีสารตัวพาแทรกเข้าสู่ภายในรูพรุนของเส้นใยกลวง จากนั้นไล่ตัวทำละลายส่วนเกินที่อยู่ภายในท่อกลวงด้วยอากาศออกโดยใช้กระบอกเข็มฉีดยาประเภท gastight กดอากาศผ่านเข้าไป รูปแบบของอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดมีการดัดแปลงจากงานวิจัยของ Pedersen-Bjergaard และ Rasmussen [13] คือ บริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของเส้นใยกลวงจะยึดด้วยปลายเข็มฉีดยาและแขวนในลักษณะรูปตัว U อยู่บนฝาของขวดทดลองขนาด 24 มิลลิเมตร

การสกัดเริ่มจากการบรรจุสารละลายตัวอย่างหรือเรียกว่าสารละลายตัวให้ที่ปรับค่า pH ตามต้องการด้วย Sodium tetraborate ลงในขวดทดลองขนาด 24 มิลลิเมตร และนำส่วนของเส้นใยกลวงที่บรรจุสารละลายตัวรับ 20 ไมโครลิตรและแขวนเตรียมไว้บนฝาขวดแล้วในลักษณะรูปตัว U มา

ตารางที่ 4.3.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง

กลุ่ม	สารที่ต้องการวิเคราะห์	โครงสร้างทางเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	pKa [31,33]
<b>Macrolide</b>	Erythromycin (ERY)		733.93	8.9
	Spiramycin (SPI)		843.05	7.9
	Tilmicosin (TIL)		855.11	7.4 8.5
<b>Sulfonamide</b>	Sulfathiazole (STZ)		255.32	2.0 7.1
	Sulfamethazine (SMZ)		278.33	2.1 7.5

	Sulfamerazine (SMR)		264.30	2.1 7.0
<b>Tetracycline</b>	Oxytetracycline (OTC)		460.43	3.2 7.5 8.9
	Tetracycline (TC)		444.43	3.3 7.9 9.6
<b>Quinolone</b>	Ciprofloxacin (CFC)		331.34	3.0 6.1 8.7 10.6
	Danofloxacin (DFC)		357.38	3.9 6.1 8.6 9.9
	Enrofloxacin (EFC)		359.39	3.9 6.2 7.6 9.9

จุ่มลงในขวดทดลองและนำไปวางบนเครื่อง multi-station magnetic stirrer ของบริษัท IKA เพื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเป่าไล่สารละลายตัวรับในท่อกลวงลงสู่ขวด vial และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส และตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี ค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นจะใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการ มีสูตรในการคำนวณค่า [23] ดังนี้

$$\text{Enrichment factor (EF)} = \frac{C_a}{C_d} = \frac{n_a V_d}{n_d V_a}$$

เมื่อ  $c_d$  และ  $c_a$  คือความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวให้ (d) และสารละลายตัวรับ (a)

ค่า  $n_d$  และ  $n_a$  คือ จำนวนโมลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับ  $V_d$  และ  $V_a$  คือ ปริมาตรของสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ

#### 4.3.3 ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

##### 4.3.3.1 เวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการสกัด วัสดุที่ผนังของเส้นใยกลวงจะต้องบรรจุด้วยตัวทำละลายด้วยการจุ่มเส้นใยกลวงลงในตัวทำละลาย ศึกษาเวลาเหมาะสมในการแช่เส้นใยที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที โดยพิจารณาค่า enrichment factor หรือการเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในการประเมินผล จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3.1 ค่า enrichment factor เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการจุ่มนานขึ้น จนถึงเวลา 60 นาที หลังจากนั้น enrichment factor จะมีค่าคงที่ การจุ่มเส้นใยกลวงเป็นระยะเวลาสั้นๆ อาจทำให้การบรรจุของสารในรูพรุนไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเวลาในการจุ่มสารที่เหมาะสมคือ 60 นาทีโดยสามารถจุ่มเส้นใยกลวงได้หลายเส้นพร้อมๆกัน เพื่อพร้อมใช้งานได้ทันที

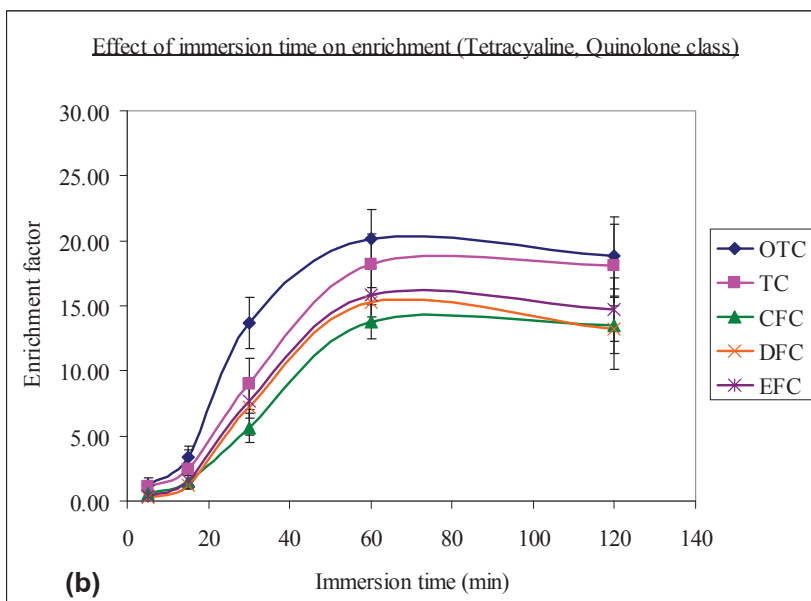
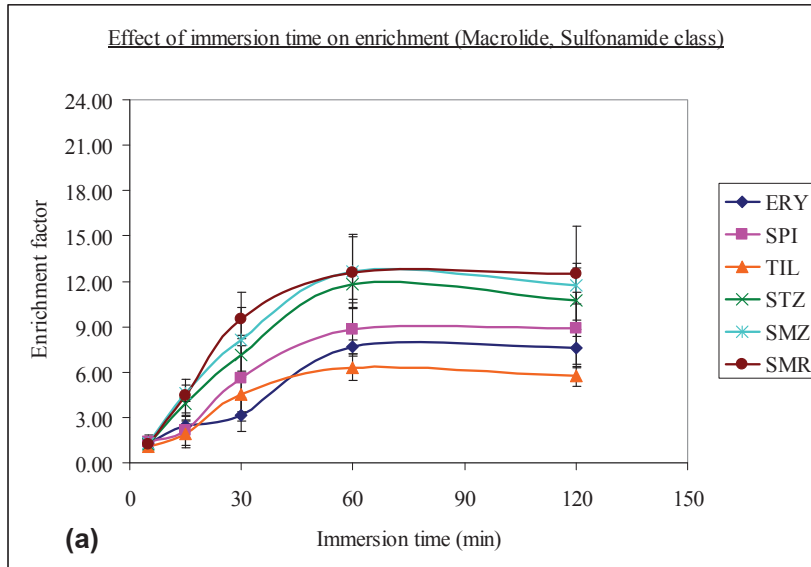
##### 4.3.3.2 สารตัวพาและการเลือกตัวทำละลาย

ตัวทำละลายและสารตัวพาที่บรรจุภายในรูพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ตัวทำละลายจะช่วยเพิ่มการแพร่ของสารที่ต้องการวิเคราะห์จากสารละลายตัวให้สู่สารละลายตัวรับ สมบัติที่สำคัญของสารละลายที่เลือกใช้คือไม่ละลายน้ำและสามารถใช้ได้กับวัสดุที่ใช้ทำเมมเบรน การทดลองเลือกตัวทำละลายนี้ใช้ตัวทำละลายแบบไม่มีสารตัวพาที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน 6 ชนิด คือ 1-octanol, 1-decanol, DHE, undecane, dodecane และ toluene ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3.2 ค่า enrichment factor ของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดมีค่าต่ำอยู่ในช่วง 1-12 เท่า DHE เป็นตัวทำละลายที่ให้ค่าสูงสุดเนื่องจากมีสภาพขั้วเหมาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ จึงเลือกเป็นตัวทำละลายในการศึกษาผลของการเติมสารตัวพา กลไกของการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงแบบไม่มีสารตัวพาขึ้นกับการแพร่แบบ passive ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ [30]

ตารางที่ 4.3.2 ตัวอย่างระบบ Multiple reactions monitoring ของสารปฏิชีวนะในภาควิเคราะห์ด้วยแทมแมสสเปกโทรมetrie

สารปฏิชีวนะ	Retention time (min)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Quantification transition	Collision energy (ev)	Confirmation transition	Collision energy (ev)
Erythromycin	4.76	0.03	40	734.45 > 158.28	30	734.45 > 576.26	30
Spiramycin	4.22	0.02	30	843.51 > 174.10	45	843.51 > 101.07	58
Tilmicosin	4.49	0.03	55	869.53 > 696.51	55	869.53 > 174.39	50
Sulfathiazole	3.99	0.03	30	256.09 > 155.93	15	256.09 > 107.87	25
Sulfamethazine	4.40	0.03	35	279.09 > 186.02	20	279.09 > 124.07	30
Sulfamerazine	4.18	0.02	30	265.08 > 171.99	20	265.08 > 155.96	25
Oxytetracycline	4.18	0.1	27	461.10 > 426.14	25	461.10 > 443.07	15
Tetracycline	4.12	0.1	30	445.08 > 410.11	20	445.08 > 153.88	27
Ciprofloxacin	4.12	0.04	35	332.05 > 314.09	25	332.05 > 245.04	30
Danofloxacin	4.07	0.05	35	358.15 > 340.00	45	358.15 > 82.22	35
Enrofloxacin	4.17	0.05	30	360.14 > 245.09	35	360.14 > 316.00	35

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพามีกลไกในการสกัดหลายชนิด ได้แก่ การแพร่ ผลของการจับคู่ประจุ (ion-pairing effect) ค่าความต่างของ pH (pH gradient) ค่าคงที่การแตกตัวของกรดของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดในตารางที่ 4.3.1 ใช้ในการทำนายค่า pH ที่เหมาะสมในการสกัดสารแต่ละชนิด โครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide



รูปที่ 4.3.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใยกลวงในตัวทำละลายที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

(a) สารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide และ sulfonamide (b) สารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline และ quinolone

ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันเบส  $[-N(CH_3)_2]$  และมีค่า pKa ประมาณ 8 [31] สภาพความเป็นเบสของโครงสร้างทำให้สารอยู่ในรูปประจุบวกและเป็นกลางในสารละลายตัวให้ที่เป็นเบส สำหรับโครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamide ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันเบส  $[-NH_2]$  และหมู่ฟังก์ชันกรด  $[-NH-]$  มีค่า pKa อยู่ในช่วง 2.0–2.1 สัมพันธ์กับการ protonation ของหมู่เบส aniline และช่วง pKa 7.0–7.5 สัมพันธ์กับการ deprotonation of ของหมู่กรด amide สารปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamide มีแนวโน้มอยู่ในรูปประจุลบในสารละลายที่เป็นเบส [32, 33] ค่า pKa ของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline มีค่าเท่ากับ 3.3, 7.7 และ 9.3 จากหมู่ฟังก์ชัน tricarbonyl, dimethylamine และ beta-diketone ตามลำดับ [25, 31–33] ทำให้สารอยู่ในรูปประจุลบและเป็นกลางในสารละลายเบส ส่วนสารปฏิชีวนะกลุ่ม quinolone มีคุณสมบัติ amphoteric คือมีสภาพทั้งกรดและเบสจากหมู่ฟังก์ชัน carboxylic และ amino ที่เกาะกับวง heterocyclic จากการที่มีค่า pKa หลายช่วง (3.0–3.9, 6.1–6.2, 7.6–8.7 และ 9.9–10.6) ทำให้สารสามารถอยู่ได้ทั้งสภาพประจุบวก ประจุลบ เป็นกลางหรือประจุบวกและลบในสารละลายตัวให้ที่เป็นเบส [31,32]

สารตัวพาที่ศึกษามี 3 ชนิด คือ Aliquat 336 (สารตัวพาประจุบวก), D2EHPA (สารตัวพาประจุลบ) และ LIX 84 (สารตัวพาที่เป็นกลาง) โดยละลายใน DHE จากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3.3 พบว่า Aliquat 336 เป็นสารตัวพาที่เพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดได้สูงกว่าสารตัวพาอีก 2 ชนิด เนื่องจากสารตัวพาที่เป็นประจุบวกสามารถเกิด ion-pair formation กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้แข็งแรงในสภาวะ pH ที่เลือก นอกจากนี้ Yamini และคณะได้ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการละลาย Aliquat 336 ที่แตกต่างกัน [22] พบว่าระหว่างการใช้ DHE และ 2-heptanone เป็นตัวทำละลาย การใช้ DHE จะให้ค่า enrichment factor ที่สูงกว่า งานวิจัยนี้ศึกษาผลของความเข้มข้นของ Aliquat 336 ตั้งแต่ 5 ถึง 40% ใน DHE พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตัวพาที่ต่ำเกินไป (5 และ 10%) จะให้ค่า enrichment factor ต่ำ เนื่องจากการเกิด ion-pair formation ไม่สมบูรณ์ หากค่าความเข้มข้นของสารตัวพาที่สูงเกินไป (30 และ 40%) จะให้ค่า enrichment factor ต่ำเช่นกัน เนื่องจากสารตัวพาในปริมาณมากจะทำให้ตัวทำละลายภายในรูพรุนที่ผนังของเส้นใยกลวงมีความหนืดสูงการสกัดผ่านเส้นใยกลวงทำได้ยากขึ้น จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.3.3 จึงเลือกใช้ 20% Aliquat 336 ใน DHE เป็นปริมาณที่เหมาะสมของสารตัวพาในตัวทำละลายที่เลือก

#### 4.3.3.3 สารละลายตัวให้และสารละลายตัวรับ

การสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์จากสารตัวอย่างสู่สารละลายตัวรับต้องอาศัยการปรับค่า pH ที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย 2 ชนิด เพื่อปรับค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นและค่าร้อยละของการคืนกลับของสาร (recovery) ค่า pH ของสารตัวอย่างควรเป็นค่าที่ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ในรูปที่สามารถสกัดด้วยตัวทำละลายได้มากที่สุด เพื่อให้เกิด ion-pair formation สูงสุดเติมสารละลาย sodium tetraborate เพื่อศึกษาที่ค่า pH 7-12 ค่าที่ให้การเพิ่มความเข้มข้นสารสูงสุด

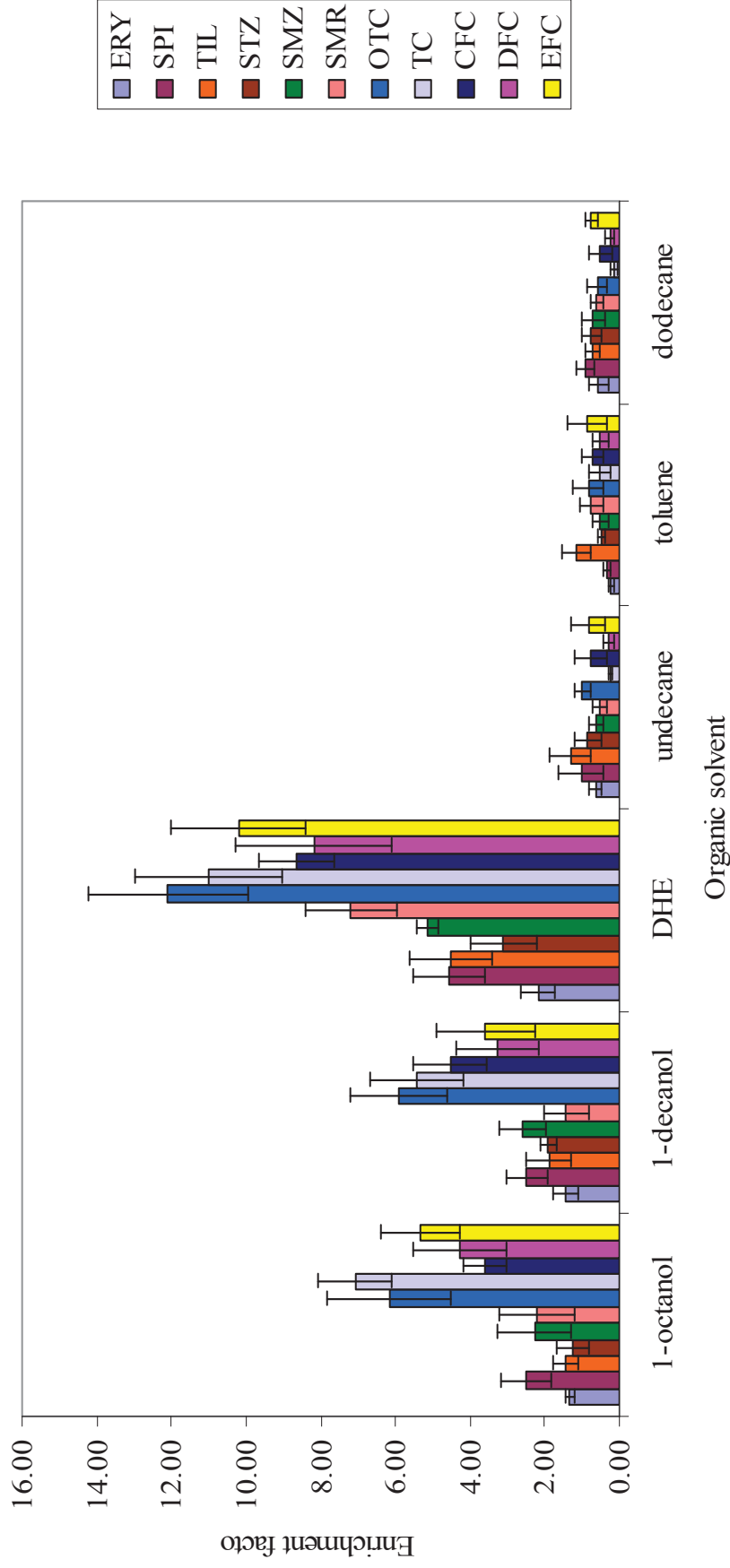
คือ pH 8 เมื่อพิจารณาจากค่า  $pK_a$  ของสารทั้ง 11 ชนิดพบว่าค่า pH 8 ของสารละลายตัวอย่างทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการสกัดมากที่สุด

สารละลายตัวรับต้องมีค่า pH เหมาะสมในการจับสารที่ต้องการวิเคราะห์และป้องกันการสกัดย้อนกลับสู่สารตัวอย่าง ด้วยการเกิด ion-pair formation ควรให้สารละลายตัวรับมีปริมาณโปรตอนมากเพียงพอเพื่อใช้เป็น exchanged counter-ion ทั้งนี้ ค่า pH ของสารละลายตัวรับต้องไม่ต่ำมากจนเกินไป เพื่อให้เหมาะกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี สารละลายตัวรับที่ทำการศึกษามี 2 ชนิด คือ acetic acid และ formic acid ศึกษาในช่วง pH 3-6 เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นกรดอ่อนสามารถนำไปฉีดเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีได้โดยตรงไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเจือจางสาร จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.4 พบว่า เมื่อใช้สารละลาย acetic acid ที่ pH 4 เป็นสารละลายตัวรับ สารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจะมีค่า enrichment factor ที่สูง (10.9–153 เท่า) เมื่อเทียบกับที่ pH 5 (8.9–105 เท่า) เนื่องจากที่ pH 4 มีปริมาณโปรตอนมากกว่า และค่า pH ที่มากจะส่งผลให้เกิดความแตกต่างของค่า pH ระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายตัวรับน้อย ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการสกัดได้ดี ดังนั้น สารละลาย acetic acid ที่ pH 4 จึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารละลายตัวรับในการสกัดสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

#### 4.3.3.4 เวลาที่ใช้ในการสกัด

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาเป็นเทคนิคการสกัดที่ขึ้นกับสมดุลของระบบ ปริมาณสารที่สกัดได้ขึ้นกับระยะเวลา ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการสกัดจึงเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้ระบบเข้าสู่สมดุล เนื่องจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายตัวรับจะมีความเสถียรและมีอยู่ในปริมาณสูงสุดที่จุดสมดุล และให้ค่า enrichment factor สูงสุด ทดลองสกัดที่เวลา 5 ถึง 90 นาที ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มคล้ายกับงานวิจัยอื่นๆ [18–20, 23, 25] คือ เมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ค่า enrichment factor จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเพิ่มสูงสุดที่จุดสมดุล จากนั้นค่า enrichment factor จะคงที่หลังจุดสมดุล ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เวลาในการสกัด 60 นาที แม้ว่าขั้นตอนของเทคนิคทั้งหมดจะใช้เวลาค่อนข้างนานแต่จากการที่สามารถจุ่มเส้นใยกลวงหลายเส้นในตัวทำละลายได้พร้อมกัน ทำให้ลดเวลาที่ใช้ในการจุ่มเส้นใย และเนื่องจากปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้น้อย (20 มิลลิลิตร) อุปกรณ์การสกัดมีขนาดเล็ก ทำให้สามารถสกัดได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน งานวิจัยนี้สามารถทำการสกัดสารตัวอย่างได้พร้อมกันตั้งแต่ 1-17 ตัวอย่างโดยใช้เครื่อง multistirrer เพื่อลดเวลาที่ต้องการใช้ในการสกัดลงไปได้มาก

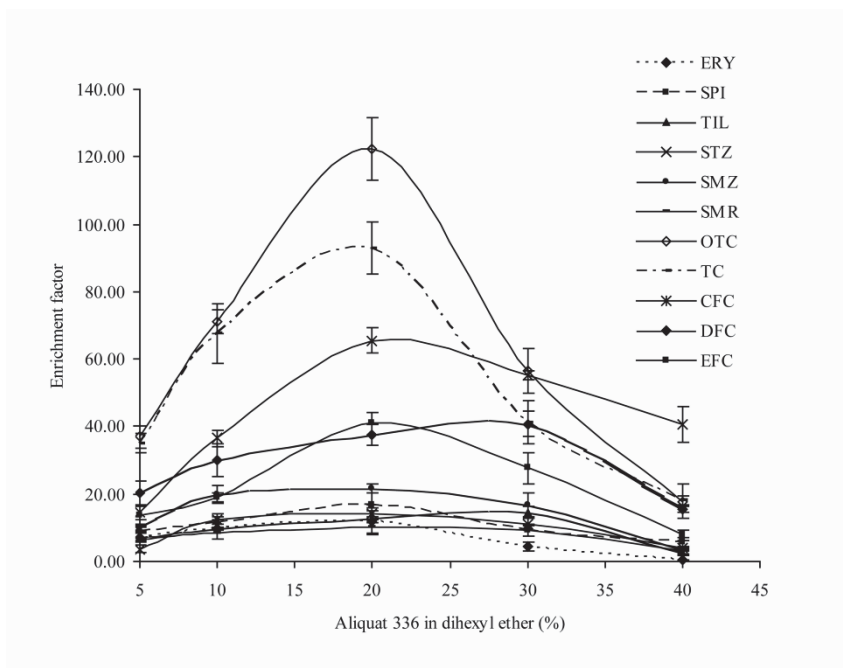
**Effect of organic solvent on enrichment (Macrolide, Sulfonamide, Tetracycline, Quinolone class)**



**รูปที่ 4.3.2** ผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆแบบไม่มีสารตัวพาที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

ตารางที่ 4.3.3 ผลของสารตัวทั้ง 3 ชนิดที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

สารปฏิชีวนะ	Enrichment factor (n=3)		
	Aliquat 336	D2EHPA	LIX 84
Erythromycin	3.1 ± 1.6	1.5 ± 0.7	1.9 ± 0.9
Spiramycin	6.1 ± 1.9	0.9 ± 0.3	2.7 ± 1.3
Tilmicosin	14.0 ± 4.5	1.8 ± 0.5	3.5 ± 1.3
Sulfathiazole	5.9 ± 2.0	0.9 ± 0.2	2.9 ± 1.6
Sulfamethazine	10.7 ± 2.5	0.7 ± 0.3	1.6 ± 0.4
Sulfamerazine	9.5 ± 1.8	1.1 ± 0.3	2.3 ± 1.7
Oxytetracycline	74.4 ± 9.5	3.7 ± 1.5	5.5 ± 3.1
Tetracycline	49.5 ± 7.6	2.1 ± 0.9	11.7 ± 3.9
Ciprofloxacin	25.9 ± 3.8	1.9 ± 1.0	4.8 ± 1.4
Danofloxacin	15.6 ± 2.5	2.6 ± 0.9	5.6 ± 2.6
Enrofloxacin	13.0 ± 2.9	2.6 ± 1.8	8.1 ± 4.1



รูปที่ 4.3.3 ผลของปริมาณสารตัวพาใน DHE ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

#### 4.3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ

ความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด ประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้น และความแม่นยำ

ในการประเมินเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาจะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง คือ เวลาในการจุ่มเส้นใยกลวง 60 นาที ใช้สารตัวพา 20% Aliquat 336 ใน DHE เป็นตัวทำละลาย สารละลายตัวให้ pH 8 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เติมสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ acetic acid pH 4 ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเป็นสารละลายตัวรับ เวลาในการสกัด 60 นาที ความเร็วในการคนเท่ากับ 200 รอบต่อ นาที โดยใช้สภาวะดังกล่าวในการศึกษาความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และความแม่นยำ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3.5

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาที่ความเข้มข้น 0.5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น เพื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดระหว่างความเข้มข้นของสารกับสัญญาณพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) อยู่ในช่วง 0.9823 (STZ) และ 0.9974 (CFC)

ตารางที่ 4.3.4 ผลของสารละลายตัวรับและค่า pH ที่มีต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสาร

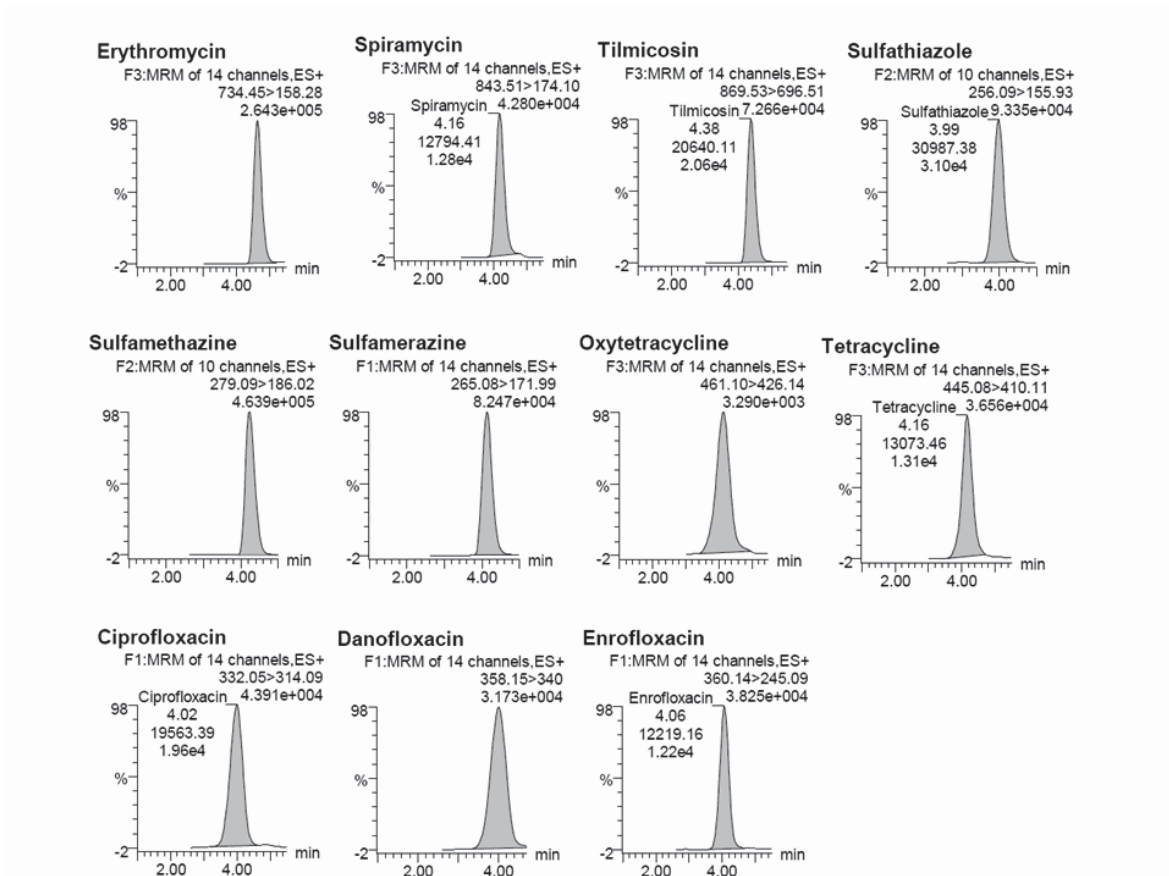
สารปฏิชีวนะ	Enrichment factor											
	Acceptor = CH <sub>3</sub> COOH						Acceptor = HCOOH					
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
Erythromycin	3.59	13.1	8.94	6.78	2.26	8.10	2.46	1.34	4.59	10.2	3.58	0.96
Spiramycin	5.41	19.0	14.1	9.56	3.53	8.58	9.81	4.23	5.52	7.82	6.99	2.17
Tilmicosin	12.4	14.0	9.67	4.12	12.9	14.9	7.61	5.42	9.40	9.76	7.50	6.34
Sulfathiazole	3.47	12.2	14.1	11.9	48.6	76.2	30.2	19.7	14.9	49.4	50.2	20.9
Sulfamethazine	8.37	21.5	14.9	2.68	37.4	45.8	20.1	16.3	12.9	14.9	21.1	22.7
Sulfamerazine	2.89	10.9	11.5	1.59	26.7	35.6	31.5	15.9	9.40	9.76	7.50	6.34
Oxytetracycline	68.6	153	105	47.8	48.6	76.2	30.2	19.7	48.6	76.2	30.2	19.7
Tetracycline	52.3	110	79.1	33.6	14.9	49.4	50.2	20.9	14.9	49.4	50.2	20.9
Ciprofloxacin	22.0	69.2	70.8	19.78	37.4	45.8	20.1	16.3	37.4	45.8	20.1	16.3
Danofloxacin	9.87	30.6	19.2	9.24	13.2	21.1	22.7	3.59	13.2	21.1	22.7	3.59
Enrofloxacin	13.6	48.8	50.2	11.8	26.7	35.6	31.5	15.9	26.7	35.6	31.5	15.9

แสดงว่าวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มได้พร้อมกัน ชีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดและชีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณภายใต้สภาวะของเครื่องแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรีสูงกว่าสัญญาณรบกวน 3 เท่าและ 10 เท่าตามลำดับ ทำการคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานให้ค่าชีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดอยู่ในช่วง 10–250 นาโนกรัมต่อลิตร และค่าชีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณอยู่ในช่วง 40–850 นาโนกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.3.5 จากการที่ค่า pKa ของสารทั้ง 11 ชนิดมีค่าในช่วงกว้าง ทำให้ได้ค่า enrichment factor ตั้งแต่ 12.5 เท่า (ERY) จนถึง 156 เท่า (OTC) ทำการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) โดยใช้ตัวอย่างน้ำที่เติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของสารทั้ง 11 ชนิดเท่ากับ 30 นาโนกรัมต่อลิตร ทำซ้ำ 10 ครั้งใน 1 และ 2 วัน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 3.27% ถึง 11.0% และสำหรับความเที่ยงระหว่างวันอยู่ในช่วง 6.50% ถึง 11.4% แม้ว่าจะไม่มีค่ากำหนดการควบคุมสารปฏิชีวนะในแหล่งน้ำ แต่พบข้อมูลใช้ในการอ้างอิงได้จากบทความวิจัยอื่นๆ [5, 7] ซึ่งให้ข้อมูลในการสำรวจปริมาณสารปฏิชีวนะในแหล่งน้ำต่างๆ (ส่วนใหญ่มักอยู่ในระดับนาโนกรัมต่อลิตรถึงมิลลิกรัมต่อลิตร) ทางสหภาพยุโรปได้สร้างกฎเกณฑ์ในการตรวจวัดสารปฏิชีวนะในอาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ [34] ทำให้สามารถนำงานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างประเภทอื่น และจากข้อมูลต่ำสุดในการตรวจวัดและชีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวมีสภาพไวในการตรวจวัดสูงเพียงพอสำหรับสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดในน้ำที่ระดับความเข้มข้นนาโนกรัมต่อลิตร

#### 4.3.5 การใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

เมื่อนำเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะได้หลายชนิดพร้อมกันไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแม่น้ำในจังหวัดกรุงเทพฯ ประเทศไทย เริ่มต้นด้วยการกรองน้ำตัวอย่างเพื่อกำจัดตะกอนและบรรจุเก็บในขวดแก้วสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร เมื่อนำไปวิเคราะห์พบว่าในน้ำตัวอย่างไม่ปรากฏสารปฏิชีวนะตกค้างจึงทำการเติมสารปฏิชีวนะมาตรฐาน 2 ความเข้มข้นคือ 2 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาวิธีการ จากนั้นทำการปรับค่า pH ของสารตัวอย่างให้เป็น pH 8 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ตารางที่ 4.3.5 แสดงถึงค่าร้อยละของการคืนกลับของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดในน้ำตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 79.2% (SPI) ถึง 119% (STZ) คำนวณจากความเข้มข้นระหว่างความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (คำนวณจากสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสาร) เทียบกับความเข้มข้นที่เติมในสารตัวอย่าง รูปภาพที่ 4.3.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา เลือกใช้สภาวะที่ได้

จากการทดลองและทำการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในน้ำตัวอย่าง พบว่าไม่มีผลจากเมทริกซ์เมื่อเทียบผลที่ได้จากการใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐานกับผลจากน้ำตัวอย่างที่เติมสารปฏิชีวนะ แสดงถึงข้อดีของเทคนิคในการ clean-up และการเพิ่มความเข้มข้นซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์น้ำประเภทต่างๆ



**รูปที่ 4.3.4** โครมาโทแกรมของสารปฏิชีวนะทั้ง 11 ชนิดจากเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี ผ่านการสกัดด้วยเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพา

#### 4.3.6 สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะหลายกลุ่มได้พร้อมกันสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีระดับต่ำมากในน้ำ ทำให้การเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้ง่าย มีราคาถูก และมีความจำเพาะต่อสารรวมทั้งมีศักยภาพสูงในการเพิ่มความเข้มข้นและการ clean-up สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูงมาก-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรีได้โดยตรงไม่ต้องผ่านขั้นตอน

**ตารางที่ 4.3.5** ความใช้ได้ของวิธีการจากการใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคในเฟสของเหลวด้วยเส้นใยกลวงโดยใช้สารตัวพาในการวิเคราะห์สารปฏิชีวนะหลายกลุ่มตกค้างในน้ำพร้อมกันในสภาวะที่เหมาะสม

สารปฏิชีวนะ	Linearity		LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Enrichment factor	Precision (%RSD)		Recovery (%)
	Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Correlation coefficient (r)				Intra-day	Inter-day	
Erythromycin	0.5-50	0.9966	0.02	0.07	12.5 $\pm$ 2.2	11.0	10.8	110
Spiramycin	0.5-50	0.9886	0.08	0.27	19.2 $\pm$ 2.6	7.98	11.4	79.2
Tilmicosin	0.5-50	0.9936	0.03	0.09	14.4 $\pm$ 1.9	3.27	6.50	94.5
Sulfathiazole	0.5-50	0.9823	0.07	0.22	12.7 $\pm$ 3.0	10.1	7.99	118
Sulfamethazine	0.5-50	0.9935	0.01	0.04	20.0 $\pm$ 3.4	5.65	8.92	94.9
Sulfamerazine	0.5-50	0.9916	0.06	0.21	12.7 $\pm$ 2.3	6.49	9.64	105
Oxytetracycline	0.5-50	0.9929	0.25	0.85	156 $\pm$ 11	8.91	7.81	98.7
Tetracycline	0.5-50	0.9950	0.13	0.43	113 $\pm$ 12	9.56	9.64	99.3
Ciprofloxacin	0.5-50	0.9974	0.06	0.20	68.9 $\pm$ 8.7	7.66	7.19	84.2
Danofloxacin	0.5-50	0.9878	0.06	0.18	31.3 $\pm$ 3.6	5.80	6.67	90.2
Enrofloxacin	0.5-50	0.9931	0.04	0.14	50.4 $\pm$ 5.9	8.11	10.2	83.5

การเจือจางสาร เทคนิคนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะได้ตั้งแต่ 12.5 ถึง 15 เท่า มีระดับขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ต่ำในช่วง 10–250 นาโนกรัมต่อลิตร และระดับขีดจำกัดต่ำสุดในการบอกปริมาณในช่วง 40–850 นาโนกรัมต่อลิตร จากการประเมินความใช้ได้ของวิธีการ พบว่าเทคนิคนี้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ควบคุมคุณภาพน้ำในประเทศไทยและที่อื่น เมื่อนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจริงพบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารได้อย่างมีประสิทธิภาพให้ค่าร้อยละของการคืนกลับในช่วง 79.2% ถึง 119% ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการวิเคราะห์สารตกค้างระดับต่ำในน้ำอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติแตกต่างกันหลายชนิดได้พร้อมกัน

#### 4.3.7 เอกสารอ้างอิง

1. Richardson SD (2009) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. Anal Chem 81:4645
2. Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Guerrero C (2007) Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. Trends Anal Chem 26:466
3. Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. J Antimicrob Chemother 52:5

4. Kostopoulou M, Nikolaou A (2008) Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends Anal Chem* 27:1023
5. Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 2:1
6. Stolker AAM, Brinkman UAT (2005) Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-A review *J Chromatogr A* 1067:15
7. Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I. *Chemosphere* 75:417
8. Li B, Zhang T, Xua Z, Fang HHP (2009) Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 645:64
9. Chico J, Rúbies A, Centrich F, Companyó R, Prat MD, Granados M (2008) High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1213:189
10. Babić S, Ašperger D, Mutavdžić D, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M (2006) Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* 70:732
11. Reverté S, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM (2003) Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1010:225
12. Gros M, Petrović M, Barceló D. (2006) Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70:678
13. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (1999) Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* 71:2650
14. Psillakis E, Kalogerakis N (2003) Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 22:565
15. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2004) Developments in hollow fibrebased, liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 23:1

16. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2008) Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *J Chromatogr A* 1184:132
17. Kou D, Wang X, Mitra S (2004) Supported liquid membrane microextraction with high-performance liquid chromatography–UV detection for monitoring trace haloacetic acids in water. *J Chromatogr A* 1055:63
18. Esrafilı A, Yamini Y, Shariati S (2007) Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Anal Chim Acta* 604:127
19. Berhanu T, Liu J, Romero R, Megersa N, Jönsson J<sup>Å</sup> (2006) Determination of trace levels of dinitrophenolic compounds in environmental water samples using hollow fiber supported liquid membrane extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1103: 1
20. Quintana JB, Rodil R, Reemtsma T (2004) Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *J Chromatogr A* 1061:19
21. Ho TS, Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2003) Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *J Chromatogr A* 998:61
22. Yamini Y, Reimann CT, Vatanara A, Jönsson J<sup>Å</sup> (2006) Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *J Chromatogr A* 1124:57
23. Piriyaipittaya M, Jayanta S, Mitra S, Leepipatpiboon N (2008) Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector. *J Chromatogr A* 1189:483
24. Zhang Z, Zhang C, Su X, Ma M, Chen B, Yao S (2008) Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. *Anal Chim Acta* 621:185
25. Shariati S, Yamini Y, Esrafilı A (2009) Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC–UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. *J Chromatogr B* 877:393

26. Mulugeta M, Megersa N (2004) Carrier-mediated extraction of bipyridilium herbicides across the hydrophobic liquid membrane. *Talanta* 64:101
27. Drapata A, Wieczorek P (2004) Facilitated SLM extraction of peptides with D2EHPA as a carrier. *Desalination* 163:47
28. Ho TS, Reubsaet JLE, Anthonen HS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2005) Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma. *J Chromatogr A* 1072:29
29. Hylton K, Sangwan M, Mitra S (2009) Microscale Membrane Extraction of Diverse Antibiotics from Water. *Anal Chim Acta* 653:116
30. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2005) Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J Chromatogr B* 817:3
31. Qiang Z, Adams C (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38:2874
32. Seifrtová M, Nováková L, Lino C, Pena A, Solich P (2009) An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal Chim Acta* 649:158
33. Babić S, Horvat AJM, Pavlović DM, Kaštelan-Macan M (2007) Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal Chem* 26:1043
34. Commission Decision 2377/90/EEC (1990) Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Commun L* 224:1

## บทที่ 5

### บทสรุปงานวิจัย วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยในหัวข้อ “การพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อน และสารตกค้างในอาหาร” ที่ดำเนินการมาเป็นระยะเวลา 3 โดยได้แยกออกเป็น 3 โครงการย่อย บทสรุปเชิงวิชาการในแต่ละโครงการย่อยได้เขียนไว้ในแต่ละบทของโครงการย่อยแล้ว ในที่นี้จะกล่าวถึงบทสรุปโดยรวมของงานวิจัยเท่านั้น

จาก โครงการที่ 1 การพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์การเกษตร ครอบคลุมการตรวจวัดสารกำจัดวัชพืชในข้าว และสารกำจัดศัตรูพืชในธัญพืช ถั่ว และผลิตภัณฑ์ที่ทำจากธัญพืชนั้น ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ เป็นที่ยอมรับ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 2 ผลงาน และวิธีการนี้ปัจจุบันใช้เป็นวิธีการตรวจสอบหลักในห้องปฏิบัติการบริษัทผู้ผลิตอาหาร “General Mills” เมือง Minnesota ประเทศสหรัฐอเมริกา และจากผลจากการดำเนินงานวิจัยในโครงการแรกทำให้กลุ่มผู้วิจัยได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งกลุ่มวิจัยที่มีบทบาทในการพัฒนาเทคนิควิธีการด้านการตรวจสอบอาหารปลอดภัยอย่างจริงจัง ได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการประเมินวิธีการที่เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้กันในปัจจุบัน และได้มีบทสรุปเป็นผลงานตีพิมพ์ร่วมกับนักวิจัยอเมริกา จีน เกาหลี และสหภาพยุโรป<sup>1</sup> (แต่ไม่ได้ระบุผลงานนี้ไว้ใน Output ของโครงการวิจัยที่ได้รับจากทุน สกว.นี้) และจากงานนี้ได้พัฒนาต่อเนื่องไปในด้านของการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดให้มีความรวดเร็วเพื่อสอดคล้องกับงานการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างปริมาณมาก และต้องการความรวดเร็วเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายของผลิตภัณฑ์ในระหว่างที่รอผลการตรวจสอบเพื่อการส่งออก งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคที่เรียกว่า low pressure gas chromatography โดยการต่อคอลัมน์ขนาดเล็กเชื่อมกับคอลัมน์ขนาดใหญ่ ทำให้เกิดแรงผลักจากคอลัมน์เล็กสู่คอลัมน์ใหญ่ โดยใช้อัตราการไหลของแก๊สที่ต่ำ เมื่อนำมาใช้กับงานการตรวจวัดกลุ่มสารกำจัดศัตรูพืช พบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง สามารถลดระยะเวลาในการตรวจวัดลงได้มากกว่า 5-10 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการเดิม หรือเทียบกับวิธีการสมัยปัจจุบันที่ใช้เครื่องมือชนิดเดียวกัน และมีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติจากงานวิจัยนี้ 2 ผลงาน และคาดว่าจะสามารถพัฒนางานได้อย่างต่อเนื่องจากแนวความคิดดังกล่าวนี้

<sup>1</sup> Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwivat, U., Fu., W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N., “Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables.” J.Chromtogr.A, 1217 (2010) 2548-2560).

โครงการที่ 2 ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดระบบจุลภาค ด้วยเส้นใยกลวง โดยเลือกศึกษาสารกำจัดวัชพืชชนิดไกลโฟเสตและสารเมตะโบไลต์ ซึ่งเป็นสารที่มีสถิติการใช้และการนำเข้าสูงสุดของประเทศไทย วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายและปลอดภัย ใช้สารเคมีปริมาณน้อยมาก ระดับไมโครลิตร สามารถใช้ได้ดีในการตรวจสอบการปนเปื้อนในแหล่งน้ำการเกษตร แต่หากต้องการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์หรือในเนื้อเมทริกซ์ผัก ผลไม้ นั้น ยังไม่สามารถทำได้ ต้องทำการศึกษาและพัฒนาต่อไปอีก

โครงการที่ 3 พัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างและการตรวจวัดยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการปศุสัตว์ 7 กลุ่มสาร และใช้สารตัวแทนของแต่ละกลุ่มจำนวน 24 ชนิด โดยใช้เมทริกซ์เนื้อไก่ พบว่าวิธีการมีความง่าย ตรวจวัดได้ในระดับต่ำ เป็นไปตามมาตรฐานการตรวจวัดของสหภาพยุโรป และยังได้ทดลองใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยเส้นใยกลวงแต่ยังพบว่ามีข้อจำกัดอยู่มาก และต้องการระยะเวลาในการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเช่นกัน ในโครงการนี้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติทั้งสิ้น 2 ผลงานเช่นกัน

จากการที่ผู้วิจัยได้เริ่มทำงานด้านการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดสารปนเปื้อนในอาหารตามโครงการความปลอดภัยอาหารอย่างจริงจังนั้น พบว่างานวิจัยนี้มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับการสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านของเศรษฐกิจของประเทศด้านการค้า การส่งออกอาหารและผลผลิตการเกษตร และในด้านสุขภาพของประชากร พบว่าแนวโน้มการตรวจพบสารปนเปื้อนยังมีอยู่อย่างต่อเนื่อง หากสารชนิดใดมีการควบคุมสูง ผู้ผลิตอาจหลีกเลี่ยงการใช้งานเลือกใช้ในสารอื่นที่ยังไม่มีการควบคุม หรือเลี่ยงที่จะใช้สารหลายๆ ชนิดแทนการใช้สารชนิดเดียว ดังนั้นโอกาสของการปนเปื้อนของสารจึงมีสูงด้วยเช่นกัน อีกทั้งผลทางอ้อมที่เห็นได้ชัดคือ เมื่อประเทศให้การสนับสนุน และมีนักวิชาการเข้ามามองปัญหาอย่างจริงจัง ทำให้ประเทศคู่ค้า เกิดความมั่นใจว่าประเทศไทยเห็นความสำคัญและหาแนวทางป้องกันปัญหาด้วยเช่นกัน อีกทั้งวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบเป็นวิธีการที่มีเป็นที่ยอมรับเทียบเท่ามาตรฐานสากล ดังนั้นจึงเพิ่มโอกาสและการยอมรับที่ประเทศไทยจะก้าวเข้าสู่การเป็นครัวของโลกที่นอกจากจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและรสชาติที่ดีแล้วยังมีความปลอดภัยสูงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ได้วิธีการที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและมีราคาต่ำ การตรวจสอบสินค้าเกษตรในประเทศ อาจทำได้อย่างจริงจังและไม่มีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณ มาตรฐานของสินค้าในประเทศจะเทียบเท่ากับสินค้าที่ส่งขายต่างประเทศ ยกกระดับมาตรฐานคุณภาพของชีวิตประชากรให้ได้อาหารปลอดภัยอย่างแท้จริง

## Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

### 1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 Urairat Koesukwiwat, Kunaporn Sanguankaew, **Natchanun Leepipatpiboon\***, Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 2008, **626**, 10-20. (Impact factor 4.310\*) published.
- 1.2 Montra Piriypittaya, Siripastr Jayanta, Somenath Mitra, **Natchanun Leepipatpiboon\***, Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1189(1-2)**, 483-492. (Impact factor 4.194\*) published
- 1.3 Urairat Koesukwiwat, Steven J. Lehotay, Katerina Mastovska, Kelly Dorweiler and **Natchanun Leepipatpiboon**, Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts and doughs, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2010, **58**, 5950-5958. (Impact factor 2.816\*) published.
- 1.4 Chayada ChiaoChan, Urairat Koesukwiwat, Soparat Yudthavorasit, **Natchanun Leepipatpiboon**, Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle, *Analytica Chimica Acta*, 2010, **682(1-2)**, pp.117-129 Impact factor 4.310\* published.
- 1.5 Soparat Yudthavorasit, Chayada ChiaoChan, **Natchanun Leepipatpiboon**, Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Micro chimica Acta*, 2011, **172(1)**, pp. 39-49 impact factor 2.578\* published.
- 1.6 Urairat Koesukwiwat, Steven J. Lehotay, Shui Miao and **Natchanun Leepipatpiboon**, High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(43), 6692-6703 Impact Factor 4.194\* published.

- 1.7 Steven J. Lehotay, Urairat Koesukkiwat, Henk van der Kamp, Hans G.J. Mol, and **Natchanun Leepipatpiboon**, Qualitative aspects in the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using fast, low-pressure gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(14), 7544-7556 Impact Factor 2.816\*
- 1.8 Urairat Koesukkiwat, Steven J. Lehotay, **Natchanun Leepipatpiboon**, Fast. Low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry of 150 pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2011, inpress Impact Factor 4.194\*.

## 2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- 2.1 Chancira Chanpreest, Natchanun Leepipatpiboon\*, Siripastr Jayanta, Sanong Ekasit, Sumalee Tangpittayakul, Ubonrat Siripatarawan, Dounghathai Pentrakul, Chinawat Thonchat, "Rapid Determination of Plasticizers in PVC Gasket by ATR FT-IR Microscopy." Proceeding in 16<sup>th</sup> IAPRI World Conference on Packing Exploring Global Packaging Challenges, June 8-12, 2008, Bangkok, Thailand
- 2.2 Siripastr Jayanta, Wannakarn Nitayarerak, Somenath Mitra and **Natchanun Leepipatpiboon\***, "Micro-scale Membrane Extraction of Bipyridilium Herbicides in Water Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis." Oral Presentation and Proceeding in 17<sup>th</sup> Symposium on Environmental Chemistry, Financially Supported by Japan Society for Environmental Chemistry, 11-13 June 2008, Kobe, Japan
- 2.3 Siripastr Jayanta, Pakorn Varanusupakul, **Natchanun Leepipatpiboon\***, "Microscale Membrane Extraction: Theory and Application" Oral Presentation. Yinsei U-Chulalongkorn U The 2<sup>nd</sup> joint Symposium, Department of Chemistry Yonsei University, 18-19 June 2008, Seoul, Korea.
- 2.4 **Natchanun Leepipatpiboon\***, Eunha Hoh, Katarina Mastovska and Steven J. Lehotay, "Effect of chlorophyll on long - term GC performance in pesticide residue analysis." Oral Presentation , 45<sup>th</sup> Florida Pesticide Residue Workshop 20-23 July 2008, Trade Winds Island Grand, St. Peto Beach, Florida, USA.
- 2.5 **Natchanun Leepipatpiboon\***, Steven J. Lehotay, Eunha Hoh, Katarina Mastovska, "Improved removal of chlorophyll from QuEChERS extracts of green vegetables." Oral Presentation, The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology

Thailand (STT 34) Science and Technology for Global Challenges. 30 Oct – 2 Nov 2008, Queen Sirikit Convention Center, Bangkok, Thailand.

- 2.6 **Natchanun Leepipatpiboon\***, Urairat Koesukkiwat, Kunaporn Sanguankaew, “Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and UPLC-MS/MS.” Poster Presentation, 25<sup>th</sup> LC/MS Montreux Symposium, 12-14 November 2008, Montreux, Switzerland.
- 2.7 Wasura Soonthorntantikul, **Natchanun Leepipatpiboon**, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka, Thumnoon Nhujak\*, “Selectivity Comparison of Monolithic Silica Capillary Columns Modified with Poly(Octadecyl Methacrylate) and Octadecyl Moiety for Halogenated Compounds in Reversed-Phase HPLC.” Poster Presentation, HPLC 2008, The 33<sup>rd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, December 2-5, 2008, Kyoto, Japan
- 2.8 Urairat Koesukkiwat, Steven J. Lehotay\*, Katerina Mastovska, Kelly Dorweiler and **Natchanun Leepipatpiboon**, “Evaluation of a modified QuEChERS method for pesticide residues in flaxseeds, peanuts and doughs” Poster Presentation in 123th AOAC Annual Meeting & Exposition, September 13-16, 2009, Philadelphia, Pennsylvania, USA
- 2.9 Urairat Koesukkiwat\*, Steven J. Lehotay, Katerina Mastovska, **Natchanun Leepipatpiboon**, Jack Cochran, Scott Grossman, Jaap de Zeeuw, “Comparison of two different approaches to fast, low-pressure GC-MS for pesticide residue analysis of QuEChERS extracts” Poster Presentation in 123th AOAC Annual Meeting & Exposition, September 13-16, 2009, Philadelphia, Pennsylvania, USA
- 2.10 Thongsuk Payanan, Puttaruksa Varanusupakul, **Natchanun Leepipatpiboon\***, “Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oils by low-temperature cleanup” Poster Presentation in 4<sup>th</sup> International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 4-6, 2009, Prague, Czech Republic
- 2.11 Wanisa Meecharoen, Nuansri Tayaputch, **Natchanun Leepipatpiboon\***, “Determination of carbamate residues in mangosteen using modified QuEChERS analysis by LC-MS/MS” Poster Presentation in 4<sup>th</sup> International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 4-6, 2009, Prague, Czech Republic
- 2.12 Soparat Yudthavorasit, Chayada Chiaoachan, **Natchanun Leepipatpiboon\***, “Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of macrolides and

- tetracyclines residue in water sample” Poster Presentation in 4<sup>th</sup> International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 4-6, 2009, Prague, Czech Republic
- 2.13 **Natchanun Leepipatpiboon\***, Chanchira Chanprasert, Siripastr Jayanta, Maurus Biedermann, Sumalee Tangpittayakul, Dounghathai Pentrakoon, “Determination of PVC plasticizers in preserved Thai herbs in oil and Thai curry pastes by gas chromatography” Poster Presentation in 4<sup>th</sup> International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 4-6, 2009, Prague, Czech Republic
- 2.14 Wanisa Meecharoen, Nunsri Tayaputch and **Natchanun Leepipatpiboon\***, “Simultaneous determination of carbamate and polar organophosphate in mangosteen using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with dispersive-SPE mix sorbent.” Poster presentation and proceeding in Pure and Applied Chemistry International Conference 2010 (PACCON 2010) January 21-23, 2010, Ubonratchathani, Thailand
- 2.15 Urairat Koesukkiwat, Steven J. Lehotay\* and **Natchanun Leepipatpiboon**, “Use of low pressure GC-MS with TOF to routinely analyze 150 pesticide residues in <10 min per food sample.” 11<sup>th</sup> International Symposium on hyphenated techniques in chromatography and hyphenated chromatographic analyzers. and International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation. “January 27-29, 2010, Bruges, Belgium.
- 2.16 Thorsten Hueffer, **Natchanun Leepipatpiboon\***, Tawan Limpiyakorn, “Development of an analytical procedure for the determination of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in sediment from a Nile tilapia earthen nursery pond.” Oral Presentation in 2010 Asian-Pacific Regional Conference on practical environmental technologies, March 24-27, 2010 Ubonratchathani, Thailand
- 2.17 Wasura Soonthorntantikul, Monpichar Srisa-art, **Natchanun Leepipatpiboon**, Thumnoon Nhujak\*, Theoretical models of separation selectivity for charged compounds in cyclodextrin electrokinetic chromatography, *Poster Presentation*, The Tenth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, 10-13 December 2010, Hong Kong
- 2.18 Wasura Soonthorntantikul, **Natchanun Leepipatpiboon\***, Monpichar Srisa-art and Thumnoon Nhujak, Comparison of Separation Selectivity in CZE, MEKC and CD-EKC for Chlorobenzoates/Methylbenzoates, and Application to Separation of

Phenoxy Acid Herbicides, *Poster Presentation*, The Tenth Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, 10-13 December 2010, Hong Kong

- 2.19 Thanutchapor nSemathong and **Natchanun Leepipatpiboon\***, Determination of multiclass pesticides in onion using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), Poster presentation, International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI2010), *Food, Health and Trade* 19-20 November 2010, Chiang Rai, Thailand
- 2.20 Songkran Chikakul and **Natchanun Leepipatpiboon\***, Rapid and Highly Sensitive Analysis of Ethoxyquin Residues in Shrimp Using Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Poster presentation, International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI2010), *Food, Health and Trade*, 19-20 November 2010, Chiang Rai, Thailand
- 2.21 Kunaporn Sanguankaew and **Natchanun Leepipatpiboon\***, Simple Determination of Ochratoxin A in Rice by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass-Spectrometry, Poster presentation, International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI2010) *Food, Health and Trade*, 19-20 November 2010, Chiang Rai, Thailand
- 2.22 Wanisa Meecharoen, Nuansri Tayaputch, Vinai Pitiyont and **Natchanun Leepipatpiboon\***, Validation of Modified QuEChERS Method for Simultaneous Determination of Organophosphates and Carbamates in Mangosteens by LC-MS/MS, Oral presentation, International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI2010) *Food, Health and Trade*, 19-20 November 2010, Chiang Rai, Thailand
- 2.23 **Natchanun Leepipatpiboon\***, Keynote Speaker, "Food Safety in Asia: Current Situation and Perspective" International Symposium – Forensic Science & Environmental Health 2009, 10-11<sup>th</sup> November 2009 in Kuala Lumpur, Malaysia. (Funding Supported from KIMIA, Malaysia)
- 2.24 **Natchanun Leepipatpiboon\***, Invited Speaker, "**High-Throughput Residue Analysis of Food Matrices.**" Separation Science Asia 2011, **27-28 July, 2011, Biopolis, Singapore**

---

ISI 2010