

การลดปัญหาการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในแตงกวาด้วย
วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

Reduction of Matrix Enhancement Effect in Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis
of Pesticide Residues in Cucumber

ลักษมณ เลติกุล¹ และ ปราโมทย์ คูวิทิจิตจารู¹
Lugsamon Layitkul¹ and Pramote Khuwittijjaru¹

Abstract

One of the major problems in pesticide residue analysis using gas chromatography-mass spectrometry is a matrix enhancement effect from samples. The matrix components make unexpected higher recovery of pesticides than those in pure solvent. Pesticides including hydroxy (-OH), amino (R-NH-), imidazoles and benzimidazoles (-N=), carbamates (-O-CO-NH-), urea derivatives (-NH-CO-NH-) and several organophosphate compounds (-P=O) are the most affected analytes. Therefore, this research was intended to study the reduction of this problem in an analysis of 68 pesticide residues in cucumber fruits using 2 types of analytical protectants (APs): (1) ethylglycerol (10 g/L), D-(+)-gluconic acid- δ -lactone (1 g/L), D-sorbitol (1 g/L) and shikimic acid (0.5 g/L) and (2) D-ribonic acid- γ -lactone (40 g/L). The results showed that the pesticide residues analyzed using a calibration curve prepared from pure solvent added with 100 μ L of APs (1) showed the better results than 50 μ L, but only 16 pesticides could be quantified with acceptable ranges of relative accuracy and recovery (80–120% and 60–120% respectively). Using 50 μ L and 100 μ L of D-ribonic acid- γ -lactone did not show significantly difference. Forty eight pesticide residues could be quantified with acceptable ranges of relative accuracy and recovery.

Keywords: matrix enhancement effect, gas chromatography-mass spectrometry, cucumber

บทคัดย่อ

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี คือ การเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในตัวอย่างไม่ดี โดยองค์ประกอบในตัวอย่างไม่ดีทำให้ความเข้มของสัญญาณของสารพิษตกค้างในตัวอย่างไม่ดีสูงกว่าเมื่ออยู่ในตัวทำละลายบริสุทธิ์และเป็นสาเหตุให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ได้มีค่าสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สารพิษตกค้างที่มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH), หมู่อะมิโน (R-NH-), หมู่อิมิดาโซลและเบนซิมิดาโซล (-N=), หมู่คาร์บาเมต (-O-CO-NH-), อนุพันธ์ยูเรีย (-NH-CO-NH-) และสารประกอบออร์แกโนฟอสฟอรัส (-P=O) ได้รับผลกระทบจากการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์มากกว่ากลุ่มอื่นๆ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการลดผลกระทบจากการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกำจัดแมลง 68 ชนิด ในผลแตงกวา ด้วยการใส่สารประกอบที่ทำหน้าที่เป็น analytical protectants (APs) 2 ชุด คือ (1) ethylglycerol (10 g/L), D-(+)-gluconic acid- δ -lactone (1 g/L), D-sorbitol (1 g/L), shikimic acid (0.5 g/L) และ (2) D-ribonic acid- γ -lactone (40 g/L) จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างโดยใช้กราฟมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลายบริสุทธิ์และเติมสารละลายผสม APs ชุด (1) พบว่าการเติมสารละลายผสม APs 100 μ L ให้ผลที่ดีกว่าการใช้ 50 μ L แต่มีสารพิษตกค้างเพียง 16 ชนิด ที่ให้ความถูกต้องสัมพัทธ์ (relative accuracy) และค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (recovery) อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ คือ 80–120% และ 60–120% ตามลำดับ และพบว่าการใช้ D-ribonic acid- γ -lactone 50 μ L และ 100 μ L ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยมีสารตกค้างกำจัดแมลง 48 ชนิด มีความถูกต้องสัมพัทธ์และค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

คำสำคัญ: การเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์, แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี, แตงกวา

¹ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

¹ Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000

คำนำ

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวเป็นขั้นตอนที่จำเป็นเพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจอย่างแพร่หลาย แต่พบว่าหากละลายสารพิษตกค้างที่สนใจด้วยตัวทำละลายบริสุทธิ์และฉีดเข้าไปยังส่วนฉีดตัวอย่าง (injector port liner) ซึ่งมีอุณหภูมิสูง สารพิษตกค้างที่สนใจอาจได้รับความเค้นเนื่องจากความร้อน (thermal stress) หรืออาจทำปฏิกิริยากับหมู่ซิลานอล (silanol) หรือโลหะ (metal active site) บนพื้นผิวแก้วของส่วนฉีดตัวอย่าง ทำให้ไม่สามารถเดินทางไปสู่ส่วนการตรวจวัดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับใช้สารสกัดจากผักหรือผลไม้ที่มีความเข้มข้นของสารพิษตกค้างเท่าๆกัน พบว่าองค์ประกอบในผักและผลไม้ (แมทริกซ์) จะทำปฏิกิริยากับผิวของส่วนฉีดตัวอย่าง หรือไปแข่งขันกับสารที่สนใจในการทำปฏิกิริยากับผิวของส่วนฉีดตัวอย่าง หรือปลดความเค้นเนื่องจากอุณหภูมิ ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของมวลไปยังส่วนการตรวจวัดได้ดีกว่า ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยกราฟมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลายบริสุทธิ์ทำให้ผลการวิเคราะห์สูงกว่าความเป็นจริง ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า “การเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์” หรือ “matrix enhancement effect” (Rahman *et al.*, 2013) วิธีที่นิยมใช้ในการแก้ปัญหานี้ได้แก่การทำ matrix-matched calibration ซึ่งเป็นการเตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้แมทริกซ์ตัวอย่างที่ปราศจากสารพิษตกค้างเป็นตัวทำละลาย แต่ด้วยข้อจำกัดในการหาตัวอย่างที่ปราศจากสารพิษตกค้าง และขั้นตอนการทำงานที่ยุ่งยากจึงมีการใช้สารเคมีอื่นๆ เข้ามาทำหน้าที่แทนแมทริกซ์หรือเรียกว่า analytical protectants เพื่อทดแทนวิธีดังกล่าว (Poole, 2007)

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการใช้ analytical protectants (APs) 2 ชุด คือ (1) ethylglycerol, D-(+)-gluconic acid- δ -lactone, D-sorbitol, shikimic acid และ (2) D-ribonic acid- γ -lactone เพื่อทดแทนการทำ matrix-matched calibration สำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดแมลง 68 ชนิดในแตงกวา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานแบบ matrix-matched calibration

สกัดตัวอย่างแตงกวาที่ปราศจากสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS (AOAC, 2012) ให้ได้แมทริกซ์แตงกวา จากนั้นเตรียมกราฟมาตรฐานซึ่งประกอบด้วยสารกำจัดแมลงจำนวน 68 ชนิด ความเข้มข้น 40–800 $\mu\text{g/L}$ โดยใช้แมทริกซ์แตงกวาที่สกัดได้เป็นตัวทำละลาย ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

2. การใช้สารละลายผสม APs

เตรียมสารละลายผสม APs (ethylglycerol 10 g/L, D-(+)-gluconic acid- δ -lactone 1 g/L, D-sorbitol 1 g/L และ shikimic acid 0.5 g/L), matrix-matched calibration และกราฟมาตรฐานสารพิษตกค้างในตัวทำละลายโทลูอีนความเข้มข้น 40–800 $\mu\text{g/L}$ เปรียบเทียบผลการเติมสารละลายผสม APs ลงในกราฟมาตรฐานสารพิษตกค้าง 50 และ 100 μL เกณฑ์ที่ใช้เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาได้แก่ความถูกต้องสัมพัทธ์และค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (Codex Alimentarius Commission, 2010) ความถูกต้องสัมพัทธ์มีเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 80–120 % ทดสอบโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 100 g/L ที่เตรียมในแมทริกซ์แตงกวาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายโทลูอีนที่มีการเติม D-ribonic acid- γ -lactone และค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับมีเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 60–120 % ทดสอบโดย spike สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/L}$ ลงในตัวอย่างแตงกวาแล้วสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (AOAC, 2012) ทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3. การใช้ D-ribonic acid- γ -lactone

เตรียมสารละลาย D-ribonic acid- γ -lactone เข้มข้น 40 g/L, matrix-matched calibration และกราฟมาตรฐานสารพิษตกค้างในตัวทำละลายโทลูอีนความเข้มข้น 40–800 $\mu\text{g/L}$ เปรียบเทียบผลการเติม D-ribonic acid- γ -lactone ลงในกราฟมาตรฐาน 25, 50 และ 100 μL ซึ่งทำให้มีความเข้มข้นของ D-ribonic acid- γ -lactone เท่ากับ 2, 4 และ 8 g/L ตามลำดับ เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาได้แก่ความถูกต้องสัมพัทธ์และค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2 ทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

ผล

1. ผลการใช้สารละลายผสม APs

เมื่อใช้สารละลายผสม APs 4 ชนิดที่ประกอบด้วย ethylglycerol (10 g/L), D-(+)-gluconic acid-δ-lactone (1 g/L), D-sorbitol (1 g/L) และ shikimic acid (0.5 g/L) ปริมาตร 50 µL เติมลงในกราฟมาตรฐานที่เตรียมในโทลูอีน พบว่ากราฟมาตรฐานของ acephate, omethoate และ phosphamidon มี $R^2 < 0.995$ จึงไม่สามารถนำผลมาพิจารณาต่อได้ เมื่อเติมสารละลายผสม APs 100 µL พบว่าสารพิษตกค้างทั้งหมดมี $R^2 > 0.995$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณเป็น 100 µL ให้ผลที่ดีกว่า โดยมีสารพิษตกค้างที่มีความถูกต้องสัมพัทธ์ผ่านเกณฑ์การยอมรับ 80–120 % จำนวน 22 ชนิด สารพิษตกค้างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับผ่านเกณฑ์การยอมรับ 60–120 % จำนวน 26 ชนิด และผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งความถูกต้องสัมพัทธ์และเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเพียง 16 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับ matrix-matched calibration ที่สารพิษตกค้างทั้งหมด 68 ชนิดผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ใช้พิจารณา (Table 1)

Table 1 Number of analyzed pesticide residues within and not-within criteria.

Criteria	Solvent calibration with Mixed APs solution (50 µL) ^{a)}	Solvent calibration with Mixed APs solution (100 µL)	Matrix-matched calibration
Relative accuracy <80	1	1	-
80–120 %	22	22	68
>120 %	42	45	-
Recovery <60	3	3	-
60–120 %	25	26	68
>120 %	36	39	-

^{a)} Solvent calibration of acephate, omethoate and phosphamidon has $R^2 < 0.995$, therefore their results are not presented in the table.

2. ผลการใช้ D-ribonic acid-γ-lactone

จากการใช้ D-ribonic acid-γ-lactone ความเข้มข้น 2 g/L ทำให้ได้กราฟมาตรฐานสำหรับสารพิษตกค้างหลายชนิดมีค่า $R^2 < 0.995$ ซึ่งไม่สามารถนำผลมาพิจารณาต่อได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ D-ribonic acid-γ-lactone เป็น 4 และ 8 g/L พบว่ามีสารพิษตกค้างที่มีความถูกต้องสัมพัทธ์ผ่านเกณฑ์การยอมรับ 54 ชนิดและ 49 ชนิดตามลำดับ และค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับผ่านเกณฑ์การยอมรับ 60 ชนิดและ 59 ชนิดตามลำดับ การเพิ่มความเข้มข้นของ D-ribonic acid-γ-lactone เป็น 8 g/L ไม่สามารถกำจัดปัญหาจากแมทริกซ์ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้เมื่อเปรียบเทียบกับ matrix-matched calibration ที่สารพิษตกค้างทั้งหมด 68 ชนิดผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ใช้พิจารณา (Table 2)

Table 2 Number of analyzed pesticide residues within and not-within criteria.

Criteria	Solvent calibration with D-ribonic acid-γ-lactone 4 g/L	Solvent calibration with D-ribonic acid-γ-lactone 8 g/L	Matrix-matched calibration
Relative accuracy <80	-	-	-
80–120 %	54	49	68
>120 %	14	19	-
Recovery <60	-	-	-
60–120 %	60	59	68
>120 %	8	9	-

วิจารณ์ผล

เนื่องจากความสามารถของ APs ในการกำจัดปัญหาการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในตัวอย่างไม่ขึ้นอยู่กับความสามารถในการระเหยของ APs และสารพิษตกค้างที่ส่วนฉีดสารตัวอย่างของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี หาก APs มีความสามารถในการระเหยเท่าเทียมกับสารพิษตกค้างแล้ว APs จะสามารถแข่งขันกับสารพิษตกค้างในการทำปฏิกิริยากับส่วนที่มีไขมันผิวของส่วนฉีดตัวอย่าง ทำให้สารพิษตกค้างที่สนใจไม่สามารถทำปฏิกิริยากับส่วนที่มีไขมันผิวของส่วนฉีดตัวอย่างจึงเดินทางไปสู่ส่วนตรวจวัดได้ดีขึ้น โดย ethylglycerol เหมาะกับสารพิษตกค้างที่มีความสามารถในการระเหยง่าย, D-(+)-gluconic acid- δ -lactone เหมาะกับสารพิษตกค้างที่มีความสามารถในการระเหยปานกลาง, D-sorbitol เหมาะกับสารพิษตกค้างที่มีความสามารถในการระเหยต่ำและ shikimic acid ช่วยป้องกันการสลายตัวของสารพิษตกค้างบางชนิดในสภาวะที่เป็นเบส (Mastovska *et al.*, 2005) จากผลการวิจัยพบว่าการใช้สารละลายผสม APs 4 ชนิดที่ความเข้มข้นที่ศึกษาไม่สามารถทดแทนการทำ matrix-matched calibration สำหรับแตงกวาได้ แม้ว่ามีการวิจัยอื่นที่กล่าวถึงประสิทธิภาพของสารผสม APs 4 ชนิดนี้ในการกำจัดปัญหาการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในตัวอย่างไม่ โดยลักษมีและวิทยา (2553) ได้รายงานว่าการใช้สารผสม APs ซึ่งประกอบด้วย ethylglycerol, D-(+)-gluconic acid- δ -lactone, D-sorbitol และ shikimic acid เติมนลงในกราฟมาตรฐานที่เตรียมในอะซีโตไนโตรที่ทดแทนการทำ matrix-matched calibration ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพริกได้ Anastassiades *et al.* (2006) รายงานว่าการใช้สารผสม APs ซึ่งประกอบด้วย ethylglycerol, D-(+)-gluconic acid- δ -lactone, D-sorbitol และ shikimic acid นอกจากสามารถกำจัดการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในตัวอย่างไม่แล้ว ยังสามารถลดข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเชิงปริมาณด้วย Yan *et al.* (2012) รายงานว่าการใช้ D-ribonic acid- γ -lactone ร่วมกับ triglycerol เติมนลงในกราฟมาตรฐานที่เตรียมในอะซีโตไนโตรสามารถทดแทนการทำ matrix-matched calibration ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่สนใจ 186 ชนิดในตัวอย่างไม่

สรุป

จากการศึกษาการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 68 ชนิดในแตงกวาพบว่าสารพิษตกค้างบางกลุ่มโดยเฉพาะที่มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH), หมู่คาร์บอนิล (-C=O) และสารประกอบออร์แกโนฟอสฟอรัส (-P=O) ได้รับผลกระทบจากการเพิ่มของสัญญาณเนื่องจากแมทริกซ์มากกว่ากลุ่มอื่นๆ การใช้ D-ribonic acid- γ -lactone และสารผสม APs 4 ชนิดยังไม่สามารถทดแทนการทำ matrix-matched calibration ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในแตงกวาได้อย่างสมบูรณ์ จำเป็นต้องศึกษาการปรับสัดส่วนหรือชนิดของ APs ที่เหมาะสมกับสารพิษตกค้างแต่ละกลุ่มต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล และวิทยา บัวศรี. 2553. การเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวิธีการ QuChERS ด้วยเครื่อง gas chromatograph โดยใช้ Analytical Protectants. เอกสารเผยแพร่ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553 กรมวิชาการเกษตร เล่มที่ 1. 2553 : 95-105
- Anastassiades, M., B. Tasdelen and E. Scherbaum. 2006. Investigations on the use of analyte protectants for multiresidue GC analysis. *In*: The European Pesticide Residue Workshop (EPRW) 2006. 21-25 May, Corfu Island, Greece. [Online]. Available source: http://cvuas.untersuchungsämter-bw.de/pdf/poster_scherbaum_eprw2006_ap.pdf
- AOAC International. 2012. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. AOAC Official Method 2007.01.
- Codex Alimentarius Commission. 2010. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis. CAL/GL 43-1993.
- Mastovska, K., S.J. Lehotay and M. Anastasias. 2005. Combination of analytical protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrices. *Analytical Chemistry* 77 : 8129-8137.
- Rahman, M.Md., A.M.A. El-Atya and J.H. Shim. 2013. Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography?-A review. *Analytical Chimica Acta* 801 : 14-21.
- Poole, C.F. 2007. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1158 : 241-250.
- Yan, L., X. Chen, C. Fan and G. Pang. 2012. Compensation for matrix effects in the gas chromatography-mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analytical protectants. *Journal of Chromatography A* 1266 : 131-142.