

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร glyphosate, glufosinate และ AMPA ในกากถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์โดยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

วิภาดา สิริสมภพชัย* วรัญญา แก้วทิพย์

บทคัดย่อ

สาร glyphosate และ glufosinate เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และสาร aminomethylphosphonic acid (AMPA) เป็นเมทาบอลไลท์หลักจากการสลายตัวของ glyphosate สารเหล่านี้สามารถปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและมีผลต่อสุขภาพเมื่อเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชข้างต้นในกากถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS ชนิด Triple quadrupole โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ระหว่างวิธี QuPPE กับวิธีที่ดัดแปลง พบว่าวิธีสกัดที่ใช้ตัวอย่างน้อยกว่าและ clean-up ด้วย SPE ชนิด HLB ของวิธีที่ดัดแปลงให้ผลดีกว่าวิธี QuPPE สำหรับการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชด้วยเครื่อง LC-MS/MS กับ LC column 3 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่และสารมาตรฐานที่อยู่ในตัวทำละลายต่างกัน พบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานใน 10% acetonitrile ในน้ำ ตั้งแต่ 10-500 ng/mL ของ LC column ทั้ง 3 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.990 แต่คอลัมน์ Selectra Diol มีช่วงความเป็นตรงของกราฟมาตรฐานในสารสกัดจากเมทริกซ์ที่กว้างกว่าคอลัมน์ Acclame Trinity Q1 และ Accucore aQ จึงเลือกการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่ดัดแปลงและวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Selectra Diol เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองมีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณเป็น 0.02 และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ สำหรับช่วงการวิเคราะห์ 0.05-0.5 mg/kg มีความแม่นยำจากค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 70-120 และความเที่ยงของการทวนซ้ำและการทำซ้ำโดยพิจารณาจากค่า %RSD $\leq$ 20 สอดคล้องตามเกณฑ์ของ SANTE/12682/2019 มีค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ตั้งแต่ 16.1-28.0% วิธีที่พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีแล้วมีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้วิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชในตัวอย่างกากถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์ได้ซึ่งไม่พบสารตกค้างสารกำจัดวัชพืชที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง

คำสำคัญ : glyphosate, glufosinate, AMPA, LC-MS/MS กากถั่วเหลือง เนื้อสัตว์

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0304-027

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง ปทุมธานี 12000

*ผู้รับผิดชอบ, E-mail : wipdld@yahoo.com

Method development and validation for the determination of glyphosate, glufosinate and AMPA in soybean meal and muscle by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Wiphada Sirisompobchai*

Warunya Kaewthip

ABSTRACT

Glyphosate and glufosinate are widely used herbicides. Aminomethylphosphonic acid (AMPA) is the major metabolite from glyphosate degradation. These compounds can contaminate environment and affect human health if it enters the food chain. The aims of this study were to develop and validate methods for the detection of the above herbicides in soybean meal and muscle by LC-MS/MS (Triple quadrupole). The efficiency of QuPpe and modified method for sample extraction and clean-up was compared. The study showed that the modified method with HLB-SPE performed better than the QuPpe method. For LC-MS/MS optimization with 3 types of LC columns, mobile phase and solvent for standard dilution were varied. The result demonstrated that all columns gave the linearity of standard with 10% acetonitrile in water ranging from 10-500 ng/mL, the coefficient determination (R^2) was greater than 0.990. However, the linearity of standard with matrix extract by Selectra Diol column was better than Acclame Trinity Q1 and Accucore aQ. The modified method and LC-MS/MS condition with Selectra Diol column was selected to be validated. Method validation in chicken muscle and soybean meal samples indicated that the limit of detection and the limit of quantitation were 0.02 and 0.05 mg/kg respectively. Accuracy and precision studies performed with soybean meal and chicken muscle showed the absolute average recoveries were in the range of 70-120%, with relative standard deviation values of repeatability and intermediate precision below 20%, for all the herbicides tested (analytical range of 0.05-0.5 mg/kg, according to the SANTE/12682/2019 criteria). The relative expanded uncertainty ranged from 16.1-28.0%. In conclusion, the analytical method developed and validated in this study is suitable for analyzing herbicides in soybean meal and muscle samples which showed no residues of the herbicides test.

Keywords : glyphosate, glufosinate, AMPA, LC-MS/MS, soybean meal, muscle

Registered No : 65(2)-0304-027

Bureau of Quality Control of Livestock Products, Tivanont Road, Bangkadi, Muang, Pathumthani 12000

*Correspondence author, E-mail : wipdld@yahoo.com

บทนำ

สาร glyphosate และ glufosinate เป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลาย (nonselective herbicides) หมายถึง สารที่เป็นพิษต่อพืชปลูกและวัชพืชทุกชนิด ที่นิยมใช้ในการกำจัดวัชพืชกับการปลูกพืชเกษตร เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวสาลี อ้อย เป็นต้น เพราะราคาไม่แพง และใช้ปริมาณไม่มากก็สามารถกำจัดวัชพืชได้ glyphosate สลายตัวเป็น aminomethylphosphonic acid (AMPA) ได้อย่างเร็ว ซึ่งเมทาบอลไลท์หลักของ glyphosate (Chamkasem and Harmon, 2016) พบว่ามีการปนเปื้อนของ glyphosate ในลำต้น ใบ และเมล็ดถั่วเหลือง รวมทั้งมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจก่อให้เกิดการตกค้างในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยพืชเหล่านี้ที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ ส่งผลไปถึงมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคด้วย (Krüger et al., 2014) ในปี 2015 International Agency for Research on Cancer (IARC) ซึ่งเป็นหน่วยงานหนึ่งขององค์การอนามัยโลก ได้รายงานไว้ว่า glyphosate จัดเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชก่อมะเร็ง กลุ่ม 2A คือ สิ่งที่เป็นไปได้ที่จะก่อมะเร็งในมนุษย์ (probably carcinogenic to humans)

ประเทศในทวีปอเมริกา ได้แก่ เบอร์มิวดา และเซนต์วินเซนต์และเกรนาดีนส์ ประเทศในแถบตะวันออกกลาง ได้แก่ โอมาน บาร์เรน กาตาร์ คูเวต ซาอุดีอาระเบีย และอาหรับอามีเรตส์ และทวีปเอเชียมีเพียงประเทศเวียดนามมีการยกเลิกการใช้ glyphosate แต่หลายประเทศส่วนใหญ่ยังมีการใช้รวมถึงมีการจำกัดการใช้สารนี้อยู่รวมทั้งประเทศไทย (Baum Hedlund Aristei & Goldman, 2020) โดยเมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน 2562 คณะกรรมการวัตถุอันตรายให้จำกัดการใช้สาร glyphosate โดยให้เหตุผลว่า หากมีการยกเลิกในวันที่ 1 ธันวาคม 2562 จะส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและการส่งออกสินค้าเกษตร โดยเฉพาะกลุ่มพืชอาหารจนถึงอุตสาหกรรมต่อเนื่อง โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ หากประกาศห้ามใช้ glyphosate จะทำให้ไม่สามารถนำเข้าถั่วเหลืองและข้าวสาลีจากประเทศที่มีการใช้สาร (คมชัดลึก, 2562) และนับตั้งแต่คณะกรรมการวัตถุอันตรายมีมติให้ยกเลิกการใช้ paraquat และ chlorpyrifos และจำกัดการใช้ glyphosate ตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2563 ทำให้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมต่อเนื่องถึง 2 ล้านล้านบาท เนื่องจากสารเคมีดังกล่าวเป็นต้นน้ำของหลายๆ อุตสาหกรรม ทั้ง ยา เกษตร ปิโตรเคมี อาหาร เป็นต้น และจากการยกเลิกการใช้พาราควอต ทำให้เกษตรกรได้นำ glufosinate มาใช้แทน (สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย, 2563ก, 2563ข)

กากถั่วเหลือง (soybean meal) นิยมใช้เป็นวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ โดยเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงสุด มีโปรตีนเฉลี่ย 44 – 50 % และมีกรดอะมิโนจำเป็นหลายตัว (ชูศักดิ์ และคณะ, 2562) จึงเป็นสินค้าทางเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดของไทย การผลิตและการนำเข้ากากถั่วเหลืองที่มีคุณภาพและปลอดภัยจึงมีความสำคัญ ซึ่งกากถั่วเหลืองถูกกำหนดเป็นอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2558 ด้วย โดยประเทศไทยมีการผลิตอาหารสัตว์ 20 ล้านตันต่อปี มีการนำเข้าวัตถุดิบมากกว่า 10 ล้านตัน โดยเป็นถั่วเหลือง และกากถั่วเหลือง ประมาณ 6 ล้านตัน ข้าวสาลีประมาณ 1.8 ล้านตัน ซึ่งเป็นการนำเข้าจากประเทศที่ยังคงมีการใช้ glyphosate (สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย, 2563ก)

สำหรับการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ในปี พ.ศ. 2564 โดยรวมแล้วมีปริมาณส่งออก 743,072.661 ตัน คิดเป็นมูลค่าส่งออก 85,330,790 ล้านบาท (กองแผนงาน กรมปศุสัตว์, 2564) ทั้งนี้สหภาพยุโรปได้ประกาศกฎระเบียบเรื่องการเฝ้าระวังสารเคมีตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ใน Council Directive 96/23/EC ลงวันที่ 29 พฤษภาคม ค.ศ. 1996 กำหนดให้ประเทศสมาชิกในกลุ่มสหภาพยุโรปและประเทศที่สามที่มีการค้าที่มีแหล่งกำเนิดจากสัตว์กับสหภาพยุโรป ต้องมีแผนการเฝ้าระวังสารตกค้างในสัตว์มีชีวิตและผลิตภัณฑ์แยกตามกลุ่มของสารที่ต้องการเฝ้าระวัง ระเบียบนี้ยังกำหนดรายละเอียดการสุ่มตัวอย่างความถี่ในการเก็บตัวอย่างของชนิดสัตว์ ประเทศที่เป็นคู่ค้ากับสหภาพยุโรปจะต้องมีแผนการตรวจสอบสารตกค้างโดยต้องส่งแผนและผลการตรวจวิเคราะห์ไปยังสหภาพยุโรปในวันที่ 31 มีนาคม ของทุกปี เพื่อให้สหภาพยุโรปพิจารณาและให้ความเห็นชอบกับแผนการตรวจสอบ

ตกค้าง และเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2563 คณะกรรมาธิการยุโรปได้ออกประกาศ Commission Implementing Regulation (EU) 2020/585 ว่าด้วยการกำหนดแผนสุ่มตรวจหาสารปราบศัตรูพืชตกค้างในสินค้าอาหารประจำปี 2564-2566 ใน EU Official Journal L135/1 ให้ประเทศสมาชิกฯ มีการสุ่มตรวจสารปราบศัตรูพืชตกค้าง ในสินค้าอาหารที่วางจำหน่ายในสหภาพยุโรป ตั้งแต่ปี 2564-2566 โดยกำหนดชนิดของสินค้าที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชและสัตว์และสารปราบศัตรูพืชที่ให้ดำเนินการสุ่มตรวจ พบว่ามีรายชื่อสาร glyphosate และ glufosinate ที่ถูกกำหนดให้สุ่มตรวจทั้งในสินค้าที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชและสัตว์ด้วย

ในปัจจุบันมีการวิเคราะห์สาร glyphosate, glufosinate และ AMPA ในธัญพืช พืชผัก และน้ำตามแหล่งน้ำต่างๆ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ทางด้านเกษตรอื่น ๆ โดยการวิเคราะห์เหล่านี้ต้องทำการเปลี่ยนรูปของสารตั้งต้นก่อนหรือเรียกว่าการทำอนุพันธ์ (derivatization) แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Liquid Chromatograph (LC) และตัวตรวจวัดชนิด fluorescence แต่เนื่องจากเทคโนโลยีที่เปลี่ยนไปอย่างรวดเร็วของเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ที่มีการใช้เครื่อง Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) โดยที่ไม่ต้องทำการอนุพันธ์และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล เทคนิค LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชในเมทริกซ์ (matrix) ที่มีความซับซ้อนได้ แต่ความสามารถในการวิเคราะห์นั้น ยังขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง และขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวน รวมทั้งชนิดอุปกรณ์และวัสดุสารเคมีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วย ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ต้องได้รับการพัฒนาเพื่อให้เหมาะสมในแต่ละชนิดของตัวอย่าง (Stachniuk and Fornal, 2016) glyphosate, glufosinate และ AMPA เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีชีวสูง มีคุณสมบัติ amphoteric และไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นเรื่องยากในการที่จะสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Chamkasem and Harmon, 2016) อีกทั้งมีขนาดโมเลกุลที่เล็กและความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างที่ได้จากพืชที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น กรดอะมิโนและสารประกอบทุติยภูมิ (secondary plant compounds) ด้วยเหตุนี้การแยกและการหาปริมาณของ glyphosate จึงเป็นเรื่องท้าทายสำหรับนักวิเคราะห์ (Rubio et al., 2014)

กากถั่วเหลืองและถั่วเหลืองถูกกำหนดให้เป็นอาหารสัตว์แต่ต่างกลุ่มกัน ตามปริมาณไขมันและความชื้น กากถั่วเหลืองถูกจัดเป็นตัวแทนอยู่ในกลุ่ม intermediate oil content and low water content ส่วนถั่วเหลืองเป็นตัวแทนอยู่ในกลุ่ม high lipid content and very low water content (SANTE, 2019) ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์ที่มีการรายงานส่วนใหญ่เป็นถั่วเหลือง ข้าวโพด เช่น การวิเคราะห์ glyphosate ในธัญพืชโดยสกัดด้วยน้ำ ตามด้วยการ clean-up ด้วย reverse phase column ก่อนการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS (Triple Quadrupole) (Granby et al., 2003) และมีการศึกษาการวิเคราะห์ glyphosate และ AMPA ในเรพซีด (rapeseed) โดยการสกัดตัวอย่างเรพซีดโดยใช้น้ำเปรียบเทียบกับสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือพวกตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าการใช้น้ำในการสกัดตัวอย่างมีค่าร้อยละการกลับคืนสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่นในการสกัด และมีค่าสูงขึ้นเมื่อมีการเติม 0.1% formic acid ด้วย (Kaczynski and Lozowicka, 2015) สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูงต้องมีการกำจัดโปรตีนออกในขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ซึ่งส่วนมากมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น methanol (Martins-Ju'nior et al., 2009) นอกจากนี้มีการแนะนำการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชที่มีชีวสูงในธัญพืช เมล็ดถั่วและเมล็ดพืชที่มีน้ำมันในเอกสาร Quick Polar Pesticides สำหรับอาหารที่มีแหล่งกำเนิดจากพืช (QuPPE-PO-Method) (Anastassiades et al., 2021) และในฉบับ ไต กล้ามเนื้อสัตว์และน้ำมันในเอกสาร Quick Polar Pesticides สำหรับอาหารที่มีแหล่งกำเนิดจากสัตว์ (QuPPE-AO-Method) (Anastassiades et al., 2019) โดยทั้งสองฉบับแนะนำวิธีสกัดตัวอย่างด้วยน้ำและ acidified methanol เติมสารละลาย 10% EDTA เพื่อจับกับไอออนของโลหะหนักในสารละลายที่อาจมีผลต่อการวิเคราะห์ glyphosate และ AMPA กำจัดโปรตีนและไขมันและวิเคราะห์โดย LC-MS/MS ชนิด Q-Trap ทั้งนี้มีความแตกต่างกันบ้างในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชและสัตว์ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

จากข้อมูลข้างต้น ห้องปฏิบัติการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในสินค้าปศุสัตว์ เห็นถึงความสำคัญที่ต้องดำเนินการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร glyphosate, glufosinate และ AMPA ในกากถั่วเหลืองที่เป็นอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 ประเภทวัตถุดิบ ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากการสกัดน้ำมันในเมล็ดถั่วเหลือง เพื่อรองรับการดำเนินการในกิจกรรมตรวจสอบตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 และในเนื้อสัตว์เพื่อรองรับการดำเนินการในกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้าง (residue monitoring plan) ประจำปี ที่กรมปศุสัตว์เป็นหน่วยงานที่มีอำนาจในการกำกับ ดูแลและรับรองการส่งออกของประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังประเทศต่างๆ ป้องกันการนำมาใช้เป็นข้อต่อรองหรือกีดกันการค้าได้ หากไทยยังไม่มีข้อมูลการตรวจสอบการตกค้าง และสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาจัดทำมาตรฐานสินค้าในประเทศได้ด้วย ซึ่งสหภาพยุโรปได้กำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่สามารถมีได้ (maximum residue limits, MRL) ในเนื้อสัตว์ (สัตว์ปีก สุกร โคกระบือ) สำหรับสาร glyphosate และ glufosinate ที่ 0.05 mg/kg เท่ากัน โดยยังไม่มีค่า MRL ของ AMPA และในกากถั่วเหลือง แต่ได้กำหนดค่า MRL สำหรับสาร glyphosate และ glufosinate ที่ 20 และ 2 mg/kg ในถั่วเหลืองไว้ (European Union, 2005)

ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชชนิด glyphosate, glufosinate และ AMPA รวมถึงสาร N-acetyl-glyphosate กับ N-acetyl-AMPA ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ของ glyphosate ด้วย ในกากถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์โดยใช้เนื้อไก่เป็นตัวแทนของเนื้อสัตว์ (Codex, 2010) ด้วยวิธี LC-MS/MS โดยเริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS (Triple quadrupole) และทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี QuPPE กับวิธีที่ดัดแปลง หลังจากพัฒนาวิธีได้แล้ว ทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ SANTE/12682/2019 โดยทดสอบพารามิเตอร์ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) และความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility หรือ intermediate precision) และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกากถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์เมื่อวิธีผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้วิธีแล้ว เพื่อจะได้ทราบข้อมูลการตกค้างไว้สำหรับประกอบการพิจารณากำหนดทิศทางเชิงนโยบายของประเทศต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ (Equipments)

เครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSQ Quantis เครื่องเขย่าแนวตั้ง (shaker) เครื่องผสมสาร (vortex mixer) เครื่องชั่งความละเอียด 0.00001 กรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน เครื่องชั่งความละเอียด 0.01/0.001 กรัม สำหรับชั่งสารเคมีและตัวอย่าง เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ เครื่อง pH meter ชุด SPE vacuum manifold, micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ 10-100, 20-200, 100-1000 และ 500- 5000 μ L และ LC column :

- Accucore aQ ขนาด 100 x 2.1 mm, 2.6 μ m ยี่ห้อ Thermo Scientific เป็นคอลัมน์ประเภท C18 Polar Endcapped
- Acclaim Trinity Q1 ขนาด 2.1 x 100 mm, 3 μ m P/N: 079715 ยี่ห้อ Thermo Scientific เป็นคอลัมน์ประเภท mixed mode (WCX, WAX, RP)

- Selectra Diol ขนาด 100 x 2.1 mm, 5 μ m ยี่ห้อ UCT เป็นคอลัมน์ที่มีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี :

- Acetonitrile (ACN) และ Methanol (MeOH) เกรด HPLC
- Ammonium formate, formic acid, ethylenediaminetetraacetic acid, tetrasodium (EDTA), trifluoroacetic acid สารทั้งหมดเกรด AR
- น้ำขจัดไอออน (deionized, DI) มีความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18 M Ω .cm

ตัวดูดซับ (sorbents) : C18 ยี่ห้อ Vertical

Solid phase extraction (SPE) : ชนิด HLB ปริมาณ 200 mg ปริมาตรบรรจุ 6 mL กับชนิด MCX ปริมาณ 150 mg ปริมาตรบรรจุ 6 mL ยี่ห้อ Waters และชนิด DAU ปริมาณ 200 mg ปริมาตรบรรจุ 6 mL ยี่ห้อ UCT

การเตรียมสารเคมี

- 500 mM ammonium formate/formic acid (pH 2.9) โดยการชั่ง ammonium formate 15.76 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปรับให้มีค่า pH 2.9 ด้วย formic acid และเจือจางด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตร 500 mL
- 50 mM ammonium formate/formic acid (pH 2.9) โดยการผสม 500 mM ammonium formate/formic acid (pH 2.9) กับน้ำ DI ในอัตราส่วน 1:9

สารมาตรฐาน (standards) เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง :

- Glyphosate ความเข้มข้น 100.00 ± 5.00 μ g/mL in water ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer
- Glufosinate ความเข้มข้น 101.98 ± 3.71 μ g/mL in water ยี่ห้อ CPA chem
- Aminomethyl phosphonic acid (AMPA) ความเข้มข้น 100.01 ± 1.40 μ g/mL in water ยี่ห้อ CPA chem
- N-acetyl AMPA ความบริสุทธิ์ $97.51 \pm 1.85\%$ ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer
- N-acetyl-Glyphosate ความบริสุทธิ์ $95 \pm 2\%$ ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน : ชั่งน้ำหนักและละลายสาร N-acetyl-AMPA และ N-acetyl-glyphosate ในตัวทำละลายน้ำ DI ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 μ g/mL แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ 100 μ g/mL ด้วย 10% ACN ในน้ำ DI สารละลายที่เตรียมได้เก็บรักษาในที่อุณหภูมิ 4°C ในหลอดพลาสติกเพื่อหลีกเลี่ยงการดูดซับสารที่ผิวแก้ว

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเจือจาง

- เตรียมสารมาตรฐานให้ความเข้มข้นประมาณ 1, 10 และ 100 μ g/mL ใน 10% ACN ในน้ำ DI
- เตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 10, 20, 50 และ 100 ng/mL จากสารมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1 μ g/mL และเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 200 และ 500 ng/mL จากสารมาตรฐานผสมความเข้มข้น 10 μ g/mL ในตัวทำละลาย เช่น 10% ACN ในน้ำ DI, ACN : water (60:40) + 0.2%TFA หรือในสารสกัดตัวอย่างเมทริกซ์ (blank matrix extract) ที่ได้จาก ปริมาตรอย่างละ 1 mL

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อสุกร เนื้อโค ที่บดละเอียด และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

ตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่บดละเอียดและผ่านตะแกรงคัดขนาดให้มีขนาดไม่เกิน 500 μ m และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

ฉีดสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 mg/L ในน้ำ DI เข้าส่วน mass spectrometer ผ่านการ flow แบบ direct infusion และเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวกและลบ (positive, negative) เพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสม เช่น ionization mode, gas pressure, transfer tube temp เป็นต้น สำหรับทำให้ precursor ions ของสารที่จะวิเคราะห์มี intensity สูงที่สุด เมื่อได้ค่าพารามิเตอร์ของแหล่งกำเนิดไอออนที่เหมาะสมกับ precursor ions แล้ว หาสภาวะของ mass transition ได้แก่ RF lens และ collision energy เพื่อหา product ions ของแต่ละสารที่จะวิเคราะห์ให้มี intensity สูงที่สุด

4.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS/MS

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร 5 ชนิด ด้วย LC-MS/MS (Triple quadrupole) โดยศึกษา LC column 3 ชนิด คือ Acclaim Trinity Q1, Accucore aQ และ Selectra Diol กับ mobile phase ชนิด 50 mM Ammonium formate, pH 2.9, 0.1% formic acid ในน้ำ DI และ ACN ด้วยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 ng/mL ในตัวทำละลายและสารสกัดเมทริกซ์ (เนื้อไก่กับกากถั่วเหลือง) ดังนี้

- สารมาตรฐานที่ละลายใน 10 % ACN ในน้ำ DI
- สารมาตรฐานที่ละลายใน ACN : water (60:40) + 0.2%TFA เฉพาะกับคอลัมน์ Accucore aQ
- สารมาตรฐานที่ละลายในสารสกัดเมทริกซ์

แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการแยก สัญญาณพิกัด และช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) กำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า $R^2 \geq 0.990$

4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีสกัดและการ Clean-up ในการเตรียมตัวอย่าง

1) วิธีที่ 1 : QuPPE method

ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว (เนื้อไก่ 10 กรัม กากถั่วเหลือง 5 กรัม) แยกใส่ในหลอดพลาสติกพอลิโพรพิลีน ขนาด 50 mL เติมน้ำ 8 mL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ประมาณ 30 วินาที เติมน้ำ 1% formic acid ใน MeOH ปริมาตร 10 mL (สำหรับตัวอย่างเนื้อไก่) เติมน้ำ conc. formic acid ปริมาตร 100 μ L และ 10% EDTA ปริมาตร 1 mL นำไปเข้าเครื่องเขย่า 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนและกำจัดไขมัน แล้วนำส่วนใสปริมาตร 2 mL เติมน้ำ ACN 2 mL และ C18 100 mg เขย่า 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เป็นเวลา 15 นาที กรองส่วนใสด้วย syringe membrane filter ใส่ vial พลาสติกนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

2) วิธีที่ 2 : วิธีดัดแปลง

ทดลองเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 จนถึงขั้นตอนปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนและกำจัดไขมัน แต่เปลี่ยนน้ำหนักตัวอย่างเป็น 2 กรัม หลังจากนั้นนำส่วนใสผ่าน SPE ชนิด HLB, MCX หรือ DAU (สำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ SPE) ทำการ condition SPE ด้วย MeOH และน้ำ DI อย่างละ 3 mL ตามลำดับ แล้ว load สารสกัดลง SPE จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 3 mL โดยทิ้งส่วนแรก 3 mL เก็บที่เหลือ 3 mL กรองด้วย syringe membrane filter นำปริมาตร 2 mL ไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ละลายสารด้วย 10% ACN ในน้ำ ปริมาตร 0.5 mL ใส่ vial พลาสติกนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

โดยในการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่าง ทำการทดสอบ spiked sample อย่างละ 3 ซ้ำ ที่เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/kg, sample blank และ method blank (reagent blank) ทำการสกัดและวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS จากนั้นนำมาคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) โดยพิจารณาเกณฑ์การประเมิน %MR อยู่ในช่วง 70-120% และ RSD $\leq$ 20%

5. การพิสูจน์ความใช้ได้วิธี

5.1 ตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ด้วยจากค่า %signal suppression and enhancement (%SSE) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายจากการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่มีสภาวะของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ดีที่สุด ซึ่งค่าการยอมรับอยู่ระหว่าง 80-120%

$$\%SSE = \frac{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย}} \times 100$$

5.2 ทดสอบค่า LOD และ LOQ

ทำการทดสอบหาค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานจำนวน 5 ซ้ำ ลงในตัวอย่างเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.02 mg/kg โดยพิจารณาค่าสัญญาณสารต่อสัญญาณรบกวนต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ($S/N \geq 3$) และหาค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานจำนวน 5 ซ้ำ ลงในตัวอย่างเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 0.05 mg/kg โดยพิจารณาค่า $S/N \geq 10$, %MR ช่วง 70-120% และ RSD $\leq$ 20% (SANTE/12682/2019)

5.3 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองจำนวน 5 ซ้ำ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.05 mg/kg (LOQ), 0.1 mg/kg (2xLOQ) และ 0.5 mg/kg (10xLOQ) จำนวน 2 ชุด ทดสอบต่างวันกัน ประเมินความแม่นยำ โดยพิจารณาจากค่า %MR และความเที่ยงพิจารณาจาก %RSD ของแต่ละระดับความเข้มข้น เกณฑ์ %MR ช่วง 70-120% และ RSD $\leq$ 20% (SANTE/12682/2019)

5.4 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ ตามวิธีการของ Eurachem (2014) แล้วคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U_E) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2

6. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ เป็ด และสุกร ของกิจกรรมเฝ้าระวังสารตกค้าง และเนื้อโคจากตลาดในจังหวัดปทุมธานี รวม 10 ตัวอย่าง และกากถั่วเหลืองของกิจกรรมตรวจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยในการวิเคราะห์มีการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ด้วย spiked sample ที่ความเข้มข้น 50 μ g/kg และ sample blank และ method blank ด้วย

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 สภาพที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

จากการปรับหาสภาวะเครื่อง LC-MS/MS (Triple quadrupole) พบว่าสารที่วิเคราะห์แตกตัวเป็นไอออนใน negative ionization mode และได้พารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการหา precursor ion ของสารที่วิเคราะห์ ได้ดังตารางที่ 1 และเมื่อตั้งค่า parameters ตามนี้แล้ว ปรับค่า RF lens ซึ่งเป็นค่าพลังงานที่เฉพาะกับสารประกอบหนึ่งๆ ที่จะทำให้ precursor ion ของสารนั้นสามารถเดินทางเข้าสู่ส่วนของ mass analyzer ได้ด้วย intensity สูงที่สุด จากนั้นได้ใช้โหมด product ion scan เพื่อให้เครื่องทำการหาค่าของ product ions และพลังงานการชนที่เหมาะสม ซึ่งในขั้นตอนนี้ จะยังคงใช้การ flow สารแบบ direct infusion ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 2 โดยค่าของ product ions ที่ได้จะเป็นรูปแบบเฉพาะของสารแต่ละชนิดที่มีการ fragment ที่ตำแหน่งโครงสร้างทางโมเลกุลแตกต่างกัน นอกจากนี้ collision energy หรือพลังงานที่ใช้ในการ fragment ก็เป็นส่วนสำคัญที่ส่งผลต่อ product ions ที่เกิดขึ้นด้วย และสามารถใช้ค่าพลังงานที่แตกต่างกันได้สำหรับแต่ละ mass transition

ตารางที่ 1 ESI parameter เครื่อง LC-MS/MS (Triple quadrupole)

Parameters	Value
Ionization mode	Negative
Negative ion (V)	4500
Sheath gas pressure (arb)	60
Auxillary gas pressure (arb)	20
Sweep gas pressure (arb)	0
Ion transfer tube temp (°C)	350
Vaporizer temp (°C)	400

ตารางที่ 2 Mass transition ของสารกำจัดวัชพืชด้วยเครื่อง LC-MS/MS

No	Pesticides	Precursor ion, Q1 (m/Z)	Product ion, Q3 (m/Z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
1	AMPA	110	63	20	103
			79	28	
			81	13	
2	Glyphosate	138	63	23	104
			124	12	
			150	10	
3	Glufosinate	180	95	17	131
			119	16	
			136	16	
4	N-acetyl glyphosate	210	124	19	114
			150	13	
			192	10	
5	N-acetyl AMPA	152	63	25	107
			110	13	
			134	12	

1.2 สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชด้วย LC-MS/MS

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ในขั้นตอนหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือเป็นสิ่งสำคัญต่อการวิเคราะห์สารตกค้างหลายชนิดพร้อมกัน นอกจากจะต้องได้สภาวะและ mass transition ที่เหมาะสมแล้ว ยังต้องตรวจสอบความสามารถในการแยกสารและเมทริกซ์ที่อยู่ในสารสกัดตัวอย่างด้วย LC column ทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาศึกษาเป็นคอลัมน์ที่สามารถใช้วิเคราะห์สารประเภทนี้ซ้ำได้ ซึ่งในการศึกษาหาสภาวะการแยกและมีสัญญาณฟิคที่ดีที่สุดจากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ละลายในตัวทำละลายต่างกันและการปรับอัตราส่วนผสมของ mobile phase จนกระทั่งได้สภาวะในตารางที่ 3 พบว่าค่าสัญญาณของฟิคสารมาตรฐาน 5 ชนิด ที่ละลายด้วย 10% ACN ในน้ำ DI และวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ 3 ชนิด พบว่าคอลัมน์ Accucore aQ ให้สัญญาณและฟิคที่สูงแฉกดีกว่า Acclaim Trinity Q1 และ Selectra Diol นอกจากนี้ สารมาตรฐานที่ละลายใน ACN:water (60:40) + 0.2% TFA ค่าสัญญาณต่ำกว่าที่ละลายใน 10% ACN ในน้ำ ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 1

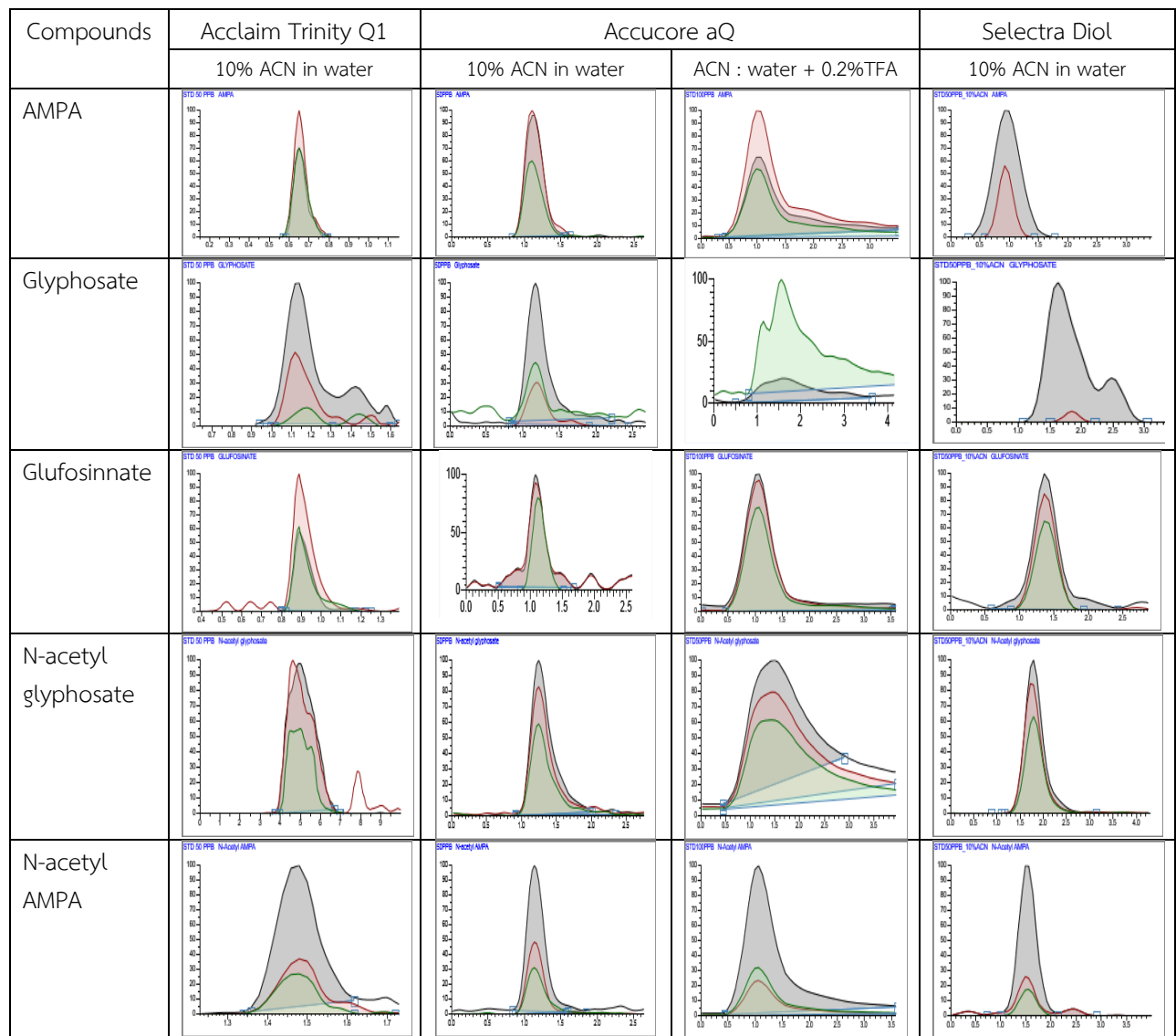
ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 10–500 ng/mL ใน 10% ACN ในน้ำ DI ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงทุกการทดลอง โดยมีค่า $R^2 > 0.990$ เมื่อเปรียบเทียบสารมาตรฐานที่ละลายในสารสกัดเมทริกซ์ พบว่า สารทุกตัวมีสัญญาณลดลงเมื่ออยู่ในสารสกัดเมทริกซ์ เมื่อตรวจสอบความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นระดับต่ำ พบว่ามีสารรบกวนกับทุกคอลัมน์ ทำให้ได้ช่วงความเป็นตรงที่ค่า $R^2 > 0.990$ แฉก โดยส่วนใหญ่จะได้ช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 50–500 ng/mL สำหรับคอลัมน์ Selectra Diol ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 20–500 ng/mL กับทุกสารที่ทดสอบ ดังตารางที่ 5 และให้การแยกและมีพื้นที่ใต้ฟิคดีกว่าคอลัมน์อื่น จึงเลือกใช้คอลัมน์ Selectra Diol ในการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 LC column และสภาวะในการทดสอบสารกำจัดวัชพืช

Instrument parameters		Conditions		
Column Type	Acclaim Trinity Q1	Accucore aQ	Selectra Diol	
Eluent A	50 mM Ammonium formate, pH 2.9	0.1% Formic acid in DI Water	50 mM Ammonium formate, pH 2.9	
Eluent B	Acetonitrile	Acetonitrile	Acetonitrile	
Temperature	30°C	30°C	40°C	
Injection Volume	20 µL	20 µL	20 µL	
Flow (Min/min)	0.5	0.2	0.3	
Elution mode	Gradient	Gradient	Gradient	
Flow program	Initial 96% A; 6.0 min, 20%A; 7-9 min, 96%A; 9.10-15 min	Initial 90% A; 4.0 min, 20%A; 6-10 min, 90%A; 11.0-15.0 min	Initial 50% A; 5.0 min, 80%A; 6-10 min, 50%A; 11.0-15.0 min	
Run time	15 min	15 min	15 min	

ตารางที่ 4 LC Column กับค่าสัญญาณของฟิคสารที่ความเข้มข้น 50 µg/L ที่ละลายใน 10% ACN ในน้ำ DI

Pesticides	Acclaim Trinity Q1			Accucore aQ						Selectra Diol		
	10% ACN in water			10% ACN in water			ACN: water + 0.2%TFA			10% ACN in water		
	Area	S/N	RT	Area	S/N	RT	Area	S/N	RT	Area	S/N	RT
AMPA	179	19.5	0.65	40610	120.9	1.13	10255	154.9	0.99	934.03	854.6	0.92
Glyphosate	1277	85.6	1.14	64040	299.8	1.17	13480	324.2	1.63	1723.30	972.4	1.35
Glufosinate	428	29.9	0.89	7264	145.3	1.12	23480	310.8	1.07	1709.52	193.1	1.63
N-acetyl-glyphosate	1584	238.4	4.96	238655	546.8	1.25	62073	194.3	1.15	4565.28	360.5	1.48
N-acetyl- AMPA	1809	52.4	1.48	155761	429.9	1.16	384192	421.8	1.06	3558.94	497.3	1.78



ภาพที่ 1 LC column กับค่าสัญญาณของพีคสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 ng/mL

ตารางที่ 5 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และ ค่า R^2 ของสารมาตรฐานในเมทริกซ์

Pesticides	Acclaim Trinity Q1		Accucore aQ		Selectra Diol	
	Range (ng/mL)	R^2	Range (ng/mL)	R^2	Range (ng/mL)	R^2
Chicken muscle						
Glyphosate	50-500	0.9919	20-500	0.9944	20-500	0.9982
Glufosinate	50-500	0.9923	50-500	0.9923	20-500	0.9975
AMPA	50-500	0.9957	50-500	0.9907	20-500	0.9954
N-acetyl-glyphosate	50-500	0.9912	50-500	0.9945	20-500	0.9968
N-acetyl-AMPA	50-500	0.9854	50-500	0.9921	20-500	0.9949
Soybean meal						
Glyphosate	50-500	0.9914	20-500	0.9926	20-500	0.9910
Glufosinate	50-500	0.9947	50-500	0.9918	20-500	0.9905
AMPA	50-500	0.9929	50-500	0.9902	20-500	0.9900
N-acetyl-glyphosate	50-500	0.9944	50-500	0.9935	20-500	0.9924
N-acetyl-AMPA	50-500	0.9931	50-500	0.9916	20-500	0.9912

1.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีสกัดและการ Clean-up

กากถั่วเหลืองและเนื้อไก่มีโปรตีนและไขมันมาก ในการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์สารตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS จึงต้องตะตะกอนโปรตีนและกำจัดไขมันด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงและอุณหภูมิเย็น นอกจากนี้ยังต้องทำการ clean-up ด้วยเทคนิค dispersive SPE ที่ใช้ C18 หรือใช้ SPE เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความบริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งจากการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ปริมาณ 10 กรัม และ clean-up ด้วย C18 ตามวิธี QuPPE พบว่าในขั้นตอนสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยน้ำและ 1% formic acid ใน MeOH เนื้อไก่ดูดตัวทำละลายสกัดจนทำให้การเขย่าทำได้ไม่ตึง และเมื่อนำสารที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบว่ามีสัญญาณรบกวนสูงมาก

สำหรับวิธีที่ดัดแปลงด้วยการสกัดกับตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม และเปรียบเทียบการ clean-up ด้วย SPE 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด HLB ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ hydrophilic N-vinylpyrrolidone กับ lipophilic divinylbenzene, SPE ชนิด MCX ประกอบด้วย mixed-mode cation exchange และ SPE ชนิด DAU มีตัวดูดซับเป็น copolymer ที่ประกอบด้วย C8 และ ion exchange (benzenesulfonic acid) โดย load สารสกัดตัวอย่างลงใน SPE และเก็บสารที่ไหลผ่านลงในลักษณะ pass through พบว่าการ clean-up ด้วย SPE ทั้ง 3 ชนิด ได้ค่า %MR อยู่ในช่วง 70-90% และค่า RSD ได้ไม่เกิน 20% ไม่แตกต่างกัน โดยค่า %RSD จากการทดสอบกับ SPE ชนิด HLB มีค่า %RSD ที่ต่ำกว่า SPE ชนิด MCX และ DAU

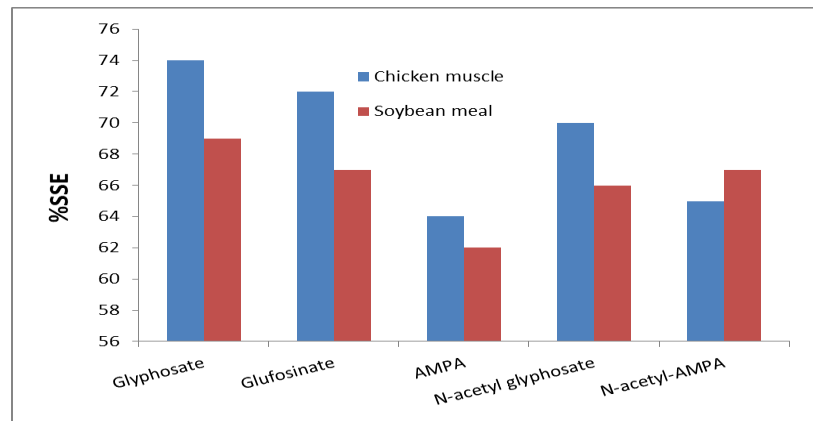
นอกจากนี้ มีรายงานว่า การใช้ EDTA ช่วยจับกับไอออนของโลหะหนักที่อาจรบกวนในการวิเคราะห์ glyphosate, glufosinate และ AMPA ในตัวอย่างถั่วเหลืองและข้าวโพด ตามด้วยการ clean-up ด้วย SPE ชนิด HLB ซึ่งสามารถกำจัด phospholipid และสารประกอบพวกที่ไม่มีขั้วในสารสกัดตัวอย่างได้ดี (Chamkasem and Harmon, 2016) อีกทั้งการตะตะกอนโปรตีนและกำจัดไขมันด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่อุณหภูมิเย็นแล้ว สำหรับการสกัดสารประเภทมีขั้ว ยังมีวิธีการที่นำตัวอย่างสกัดใส่ในตู้แช่แข็ง -80°C นาน 15-30 นาที แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่มากกว่า 3,000 g อุณหภูมิ 10°C นาน 10 นาที และใช้ MCX-SPE ในการ clean-up สำหรับการวิเคราะห์สารประเภทมีขั้วสูงในตัวอย่างดิบ ไต เนื้อไก่ ไข่ไก่ เพื่อลดการบำรุงรักษาเครื่องวิเคราะห์ LC-MS/MS แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าในการ clean-up มีการสูญเสียของสาร glufosinate ในตับและเนื้อไก่ไปบ้าง (López, et.al., 2020)

จากผลการทดสอบและข้อมูลการรายงานข้างต้น จึงเลือกวิธีดัดแปลงที่สกัดกับตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม และใช้ SPE ชนิด HLB ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีต่อไป

2. ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี

2.1 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

คำนวณ %SSE เพื่อตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์จากผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาว่า หากค่า SSE 100% หมายถึง ไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์ หากค่าต่ำกว่า 100% หมายความว่าเมทริกซ์กดสัญญาณ (suppression) และค่าสูงกว่า 100% หมายความว่าเมทริกซ์เพิ่มสัญญาณ (enhancement) (Chamkasem and Harmon, 2016 และ Melo, et.al., 2020) พบว่าสารมาตรฐานในสารสกัดเมทริกซ์มีสัญญาณลดลง (response suppression) ในลักษณะ negative matrix effect ทุกสาร ได้ค่า %SSE < 80 ดังภาพที่ 2 แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบกับสารที่วิเคราะห์ ซึ่งอาจเกิดจากการชะร่วมนของส่วนประกอบเมทริกซ์และส่งผลต่อประสิทธิภาพของการแตกตัวเป็นไอออนของสารที่วิเคราะห์ การชดเชยจากผลกระทบการวิเคราะห์สามารถใช้สารมาตรฐานภายในที่เป็นไอโซโทปของสารที่วิเคราะห์ แต่เนื่องจากในการศึกษาฯ ยังไม่มีสารเหล่านี้ ดังนั้น จึงใช้กราฟมาตรฐานที่เตรียมแบบ procedural standard curve จากสารละลายในเมทริกซ์ ด้วยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างก่อนทำการสกัด ซึ่งเป็นอีกทางเลือกเพื่อความเหมาะสมในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี (SANTE, 2019)



ภาพที่ 2 กราฟแสดง %SSE ของสารมาตรฐานในสารสกัดเนื้อไก่และกากถั่วเหลือง

2.2 ค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg พบว่า S/N ของสารทั้ง 5 ชนิด มีค่ามากกว่า 3 โดย S/N ของสารที่ต่ำสุดคือ AMPA และที่ความเข้มข้น 0.05 mg/kg ได้ค่า S/N > 10 โดย S/N ของสารที่ต่ำสุดคือ AMPA ค่า %MR อยู่ในช่วง 72% (AMPA) – 84% (glyphosate) และค่า RSD < 20% แสดงว่าขีดความสามารถต่ำสุดของวิธีที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ คือที่ 0.05 mg/kg และที่ค่า LOQ ของสาร glyphosate และ glufosinate ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ของวิธีที่พิสูจน์ได้นี้ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ SANTE/12682/2019 กำหนดไว้ คือ LOQ ≤ MRL เมื่อค่า MRL ของทั้งสองสารเท่ากับ 0.05 mg/kg (European Union, 2005)

2.3 ความแม่นยำและความเที่ยง

ผลการตรวจสอบความแม่นยำจาก %MR และความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability precision) จาก %RSD_r และแบบการทำซ้ำได้ (intermediate precision) จาก %RSD_i ในตัวอย่างที่เติมสารที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.5 mg/kg พบว่า ผลประเมินความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างแต่ละชุดที่วิเคราะห์ได้ มีค่า %MR อยู่ในช่วง 70–120% และค่า RSD_r ไม่เกิน 20% และผลประเมินความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ พบว่า %MR และ %RSD_i อยู่ในเกณฑ์ %MR ช่วง 70-120 และ %RSD ไม่เกิน 20% เช่นกัน

ตารางที่ 6 ค่า %Mean recovery และ (%RSD) ของการวิเคราะห์ใน spiked sample

Pesticides	Day 1, Conc. (mg/kg), n = 5			Day 2, Conc. (mg/kg) , n = 5			Intermed, Conc. (mg/kg) , n = 10		
	0.05	0.1	0.5	0.05	0.1	0.5	0.05	0.1	0.5
Chicken muscle									
Glyphosate	82 (11.1)	81 (12.8)	82 (6.1)	80 (14.6)	78 (11.4)	81 (5.5)	77 (12.7)	84 (9.2)	81 (5.5)
Glufosinate	70 (11.2)	84 (12.6)	80 (8.1)	79 (11.4)	79 (8.8)	83 (3.9)	78 (10.7)	83 (8.5)	82 (6.1)
AMPA	74 (10.4)	83 (12.6)	79 (9.4)	76 (13.8)	73 (10.7)	85 (4.2)	75 (11.8)	82 (10.4)	85 (6.9)
N-acetyl- glyphosate	76 (12.4)	82 (11.8)	79 (11.4)	79 (16.9)	82 (10.6)	86 (6.2)	79 (14.0)	82 (11.2)	85 (8.7)
N-acetyl-AMPA	76 (11.1)	83 (13.4)	86 (13.4)	78 (8.0)	83 (10.7)	81 (5.3)	75 (9.8)	82 (11.2)	83 (10.3)

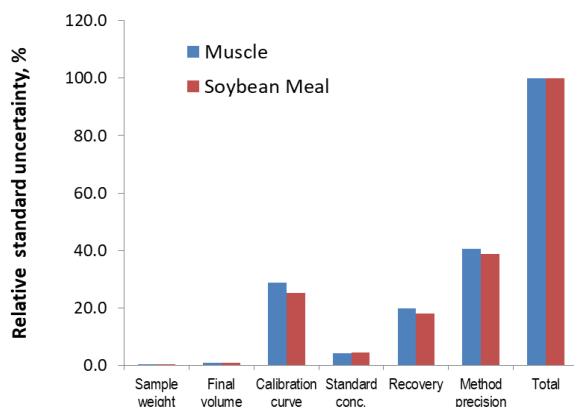
ตารางที่ 6 (ต่อ)

Pesticides	Day 1, Conc. (mg/kg), n = 5			Day 2, Conc. (mg/kg) , n = 5			Intermed, Conc. (mg/kg) , n = 10		
	0.05	0.1	0.5	0.05	0.1	0.5	0.05	0.1	0.5
Soybean meal									
Glyphosate	84 (11.8)	86 (7.1)	82 (7.0)	74 (13.8)	83 (10.7)	79 (5.7)	76 (12.3)	82 (11.2)	79 (6.0)
Glufosinate	76 (12.9)	83 (9.3)	80 (5.0)	74 (9.0)	81 (11.5)	77 (6.9)	75 (10.5)	83 (11.4)	77 (5.8)
AMPA	78 (11.9)	84 (10.8)	83 (6.8)	73 (9.8)	73 (13.6)	79 (7.6)	74 (10.4)	82 (12.4)	79 (6.8)
N-acetyl- glyphosate	80 (11.3)	83 (13.0)	84 (8.7)	77 (8.3)	76 (12.0)	79 (5.8)	72 (11.6)	83 (11.2)	79 (7.0)
N-acetyl-AMPA	78 (11.5)	81 (12.8)	83 (9.6)	72 (14.4)	71 (12.4)	80 (5.6)	73 (12.3)	81 (12.4)	79 (7.5)

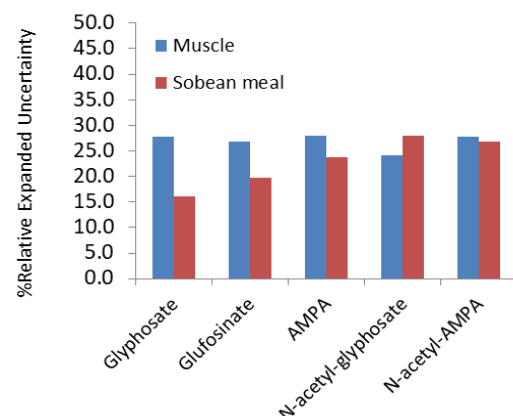
2.5 การประเมินค่าความไม่แน่นอน

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดตัวอย่างเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองที่เติมสารที่วิเคราะห์ตามแนวทางของ Eurachem (2014) ผลจากการประเมิน พบว่าแหล่งของค่าความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุด คือ ค่า method precision รองลงมาคือ calibration curve และค่า %recovery ส่วน sample weight, final volume และ standard conc. มีค่าน้อยมาก ดังภาพที่ 2

เมื่อคำนวณเป็นค่า %relative expanded uncertainty (UE x 100/result ที่ LOQ) พบว่า สารที่มีค่า %RU ต่ำสุดและสูงสุดในเนื้อไก่ คือ N-acetyl-glyphosate (24.2%) และ AMPA (27.9%) ตามลำดับ สำหรับสารที่มีค่า %RU ต่ำสุดและสูงสุดในกากถั่วเหลือง คือ glyphosate (16.1%) และ N-acetyl-glyphosate (28.0%) ตามลำดับ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนที่มีต่อการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชในเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับความไม่แน่นอนทั้งหมด



ภาพที่ 3 ค่า % Relative expanded uncertainty ของสารกำจัดวัชพืช 5 ชนิด ในเนื้อไก่และกากถั่วเหลือง

3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อสุกร เนื้อโค และกากถั่วเหลืองตามวิธีที่ได้จากการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้แล้ว ไม่พบสาร glyphosate, glufosinate, AMPA, N-acetyl-glyphosate และ N-acetyl-AMPA โดยการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ด้วย spiked sample ที่ความเข้มข้น 50 µg/kg ได้ %recovery อยู่ในช่วง 70-120%

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์สาร glyphosate, glufosinate, AMPA, N-acetyl-glyphosate และ N-acetyl-AMPA ในเนื้อไก่และกากถั่วเหลืองด้วย LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ด้วยวิธีที่พัฒนาการสกัดตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม ด้วยน้ำและ 1% formic acid ใน MeOH และ clean-up ด้วย SPE ชนิด HLB และวิเคราะห์เทียบกับ procedural standard curve เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม SANTE/12682/2019 โดยได้ค่า LOD 0.02 mg/kg, LOQ 0.05 mg/kg ช่วงการวิเคราะห์ที่ 0.05-0.500 mg/kg ทั้งในเนื้อไก่และกากถั่วเหลือง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างพร้อมกับการควบคุมคุณภาพภายในเพื่อตรวจสอบกับค่ามาตรฐานของสหภาพยุโรปได้ และจากการวิเคราะห์สาร glyphosate, glufosinate, AMPA, N-acetyl-glyphosate และ N-acetyl-AMPA ในตัวอย่างเนื้อไก่ เป็ด สุกร และโค จำนวน 10 ตัวอย่าง และกากถั่วเหลือง 10 ตัวอย่าง ไม่พบสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างดังกล่าว ทั้งนี้เป็นการสำรวจข้อมูลการตกค้างเบื้องต้นและควรมีการตรวจเฝ้าระวังสารตกค้างในสินค้าปศุสัตว์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์เท่ากับค่า MRL ของบางสารและอยู่ในเกณฑ์ของ SANTE/12682/2019 อย่างไรก็ตาม ควรปรับปรุงสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ให้มีความสามารถที่วิเคราะห์ได้ในระดับปริมาณต่ำกว่านี้ด้วยการใช้สาร isotope-labeled internal standards ร่วมกับ matrix match calibration standard ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดวัชพืช

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นายสัตวแพทย์สมชาย วงศ์สมุทร ผู้เชี่ยวชาญด้านตรวจสอบคุณภาพปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์นมที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และบุคลากรงานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กองแผนงาน กรมปศุสัตว์. 2564. ข้อมูลและสถิติ. สรุปปริมาณและมูลค่าการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ปี 2548 - 2564. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้ที่ <https://planning.dld.go.th/th/index.php/th/stat-menu/1329-2548-2564>
- คมชัดลึก. 2562. ด่วน ! เลื่อนแบน 2 สาร 6 เดือน จำกัดการใช้ไกลโฟเซต. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้ที่ <https://www.komchadluek.net/news/agricultural/401311>.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2558 (2558, 4 ธันวาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 132 ตอนพิเศษ 322 ง. หน้า 3-4.

- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง การจำกัดการใช้ การกำหนดฉลากและภาชนะบรรจุวัตถุอันตรายที่เกี่ยวข้องกับไกลโฟเซต ที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ พ.ศ. 2562 (2562, 23 เมษายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 136 ตอนพิเศษ 100 ง. หน้า 50-51.
- ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ. 2556. (2556, 27 กันยายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 130 ตอนพิเศษ 125 ง. หน้า 6-7.
- พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535. (2535, 29 มีนาคม).
- ชูศักดิ์ พลูมา, มานะ สุภาดี, น.ส.พ. สกิต อรุณแสง, สุวนันท์ งามอักษร, ระพีพัฒน์ ตีสิงห์ และพรกิตติ พุฒมะรัง. 2562. อิทธิพลของการใช้กากถั่วเหลืองหมักต่ออาการท้องเสียและประสิทธิภาพการผลิตในลูกสุกร Effects of fermented soybean meal on diarrhea and feed efficiency in weaned piglets. มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี, คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้ที่ <http://research.rmutsb.ac.th/fullpaper/2561/research.rmutsb-2561-20191128153954448.pdf>. (7 ธันวาคม, 2563)
- สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. 2563ก. ผลกระทบของการแบนสารเคมีทางการเกษตรต่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์และปศุสัตว์ไทย. ธุรกิจอาหารสัตว์. ปีที่ 37 (ประจำเดือน กรกฎาคม – สิงหาคม 2563) : หน้า 8.
- สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. 2563ข. ขี้แบนสารเคมี สูญ 2 ล้านล้าน ส.อ.ท. วอนรัฐบาลทวง อย่าใช้ 2 มาตรฐาน. ธุรกิจอาหารสัตว์. ปีที่ 37 (ประจำเดือน กันยายน – ตุลาคม 2563) : หน้า 59.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8802-2558 กากถั่วเหลือง
- Anastassiades M., Wachtler, A.K., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Zechmann, S., Mack, D., Barth, A., Wildgrube, C., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D. and Cerchia, G. (2019). Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement II. Food of Animal Origin (QuPPE-AO-Method). Available source: https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN.
- Anastassiades M., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Wachtler, A.-K., Benkenstein, A., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk D. and Cerchia, G. (2020). Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method). [Online]. Available source: https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN.
- Baum Hedlund Aristei & Goldman. 2020. Where is Glyphosate Banned?. [Online]. Available source: <https://www.baumhedlundlaw.com/toxic-tort-law/monsanto-roundup-lawsuit/where-is-glyphosate-banned/?fbclid=IwAR2LuIWJh5jogHU4cv7nQkkSAk36Y9RlenpckXoEigpzV8xz3DH4Hdapys>
- Chamkasem N. and T. Harmon. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. DOI: 10.1007/s00216-016-9597-6.

- Codex. 2010. CAC/GL 40-1993. Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis. Revision 2003. Amendment 2010. [Online]. Available form: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>
- Eurachem Guide. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. [Online]. Available form: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- European Union. 1996. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. Official Journal of the European Community. L125, 10-32.
- European Union. 2005. 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. Official Journal of the European Union L70, 1-16.
- European Union. 2020. Commission Implementing Regulation (EU) 2020/585 of 27 April 2020 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2021, 2022 and 2023 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin Official Journal of the European Union. L135, 1-12.
- Granby K., Johannesen, S. and Vahl, M. 2003. Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). Food Additives and Contaminants, 20(8), 692-698.
- International Agency for Research on Cancer [IARC]. 2015. World Health Organization. [Online]. Available source: <https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/MonographVolume112-1.pdf>
- Kaczynski P. and Łozowicka, B. 2015. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization /fluorescence detection. Open Chem, 13,1011-1019.
- Krüger M., Schledorn, P., Schrödl, W., Hoppe, H.W., Lutz, W. and Shehata, A.A. 2014. Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 4(2),1-5.
- López, S.H., Dias,J., Kok, A.D.(2020) Analysis of highly polar pesticides and their main metabolites in animalorigin matrices by Sonia hydrophilic interaction liquid chromatography and massspectrometry.Food Control, 115,1072789, 1-12
- Martins-Ju nior H. A., Lebre, D.T., Wang, A. Y., Pires, M. A. F. and Bustillos, O. V. 2009. An alternative and fast method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom, 23,1029-1034.

- Melo, M.G., Carqueijo, A., Freitas, A., Barbosa, J. and Silva, A.S. 2020. Modified QuEChERS Extraction and HPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of 155 Pesticide Residues in Rice (*Oryza sativa* L.). *Foods*, 9(18), 1-16.
- Rubio F., Guo, E. and Kamp, L. 2014. Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy Products. *J. Environ Anal Toxicol*, 5(1) 1000249,1-12
- SANTE/12682/2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. [Online]. Available source: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf
- Stachniuk A. and Fornal, E. 2016. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal Methods*, 9,1654-1665.