

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
- กิจกรรม : 1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ
3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลง กลุ่มเบนโซอิลยูเรีย (benzoylurea) ในหน่อไม้ฝรั่ง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS
- : Development and validation method for pesticide residue analysis of benzoylureas insecticide in Asparagus by LC-MS/MS technique

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายประพันธ์ เคนท้าว	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมการทดลอง	นางสาวจินตนา ภู่มงกุฏชัย	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวสุพัตร์ หนูสังข์	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวศศิณิภา คงเข้มดี	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. Abstract

The aim of this study was to find the appropriate method for the analysis of benzoylurea pesticide group in Asparagus. QuEchERS: EN 15662 and SweEt methods were selected to extract the sample at 0.02 mg/kg with 10 replications. QuEchERS method showed that the higher recoveries and was chosen as an extraction method with 15 mg of GCB in the clean-up process. There is no matrix effect were found in this method. For the method validation study were found that range of method were 0.02 – 0.2 mg/kg, % recovery were 83 – 105 %, % RSD were between 2.04 – 8.52 and this method had LOD and LOQ at 0.01 and 0.02 mg/kg, respectively. By the intra-laboratory study data were showed that this method have robustness and ruggedness capability.

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ได้แก่ diflubenzuron, triflumuron, teflubenzuron, lufenuron และ flufenoxuron ในหน่อไม้ฝรั่ง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีสกัดตัวอย่าง 2 วิธี ได้แก่ วิธี QuEchERS: EN 15662 และ SweEt method ที่ความเข้มข้น 0.02 mg/kg (n=10) พบว่า % recovery ของวิธี QuEchERS: EN 15662 อยู่ในช่วง 86 - 97 % ส่วนวิธี SweEt method อยู่ในช่วง 28 – 52 %

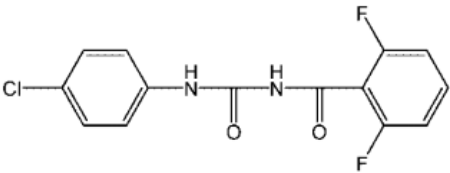
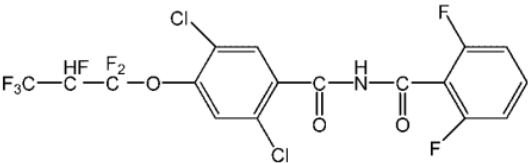
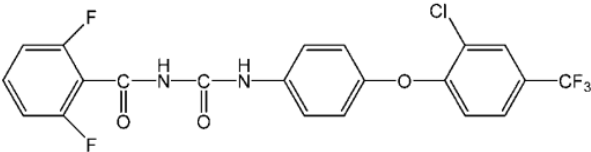
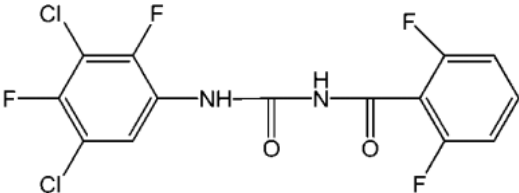
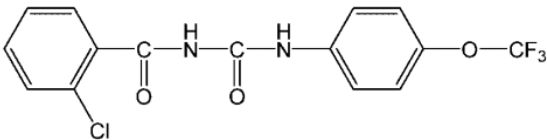
จึงเลือกวิธี QuEChERS: EN 15662 ในการศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาความเหมาะสมของปริมาณ GCB ในขั้นตอนการขจัดสิ่งเจือปนในตัวอย่างปริมาณ 50, 25, 15 และ 5 mg ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg พบว่า GCB 15 mg ให้ค่า % recovery อยู่ในเกณฑ์กำหนดคือ 70 - 120 % ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี QuEChERS และขจัดสิ่งเจือปนในตัวอย่างด้วย GCB 15 mg ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ในหน่อไม้ฝรั่ง ผลการทดสอบมีดังนี้ การศึกษา matrix effect พบว่าไม่มีผลกระทบจากสิ่งเจือปนในตัวอย่าง (matrix) จึงสามารถใช้สารมาตรฐานที่เตรียมในด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไตรล์ในการหาปริมาณสารได้ พบว่าช่วงของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.02 - 0.2 mg/kg ส่วนการศึกษา accuracy ที่ระดับความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.2 mg/kg พบว่าให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 83 - 105 % และมีค่า % RSD อยู่ในช่วง 2.04 - 8.52 วิธีวิเคราะห์นี้ให้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.02 mg/kg ตามลำดับ การศึกษา Intra-laboratory reproducibility ที่ความเข้มข้น 0.02 - 0.2 mg/kg พบว่า % RSD อยู่ในช่วง 3.0 - 11.4 ส่วนการศึกษาค่าปริมาณต่ำสุดของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ที่เครื่อง LC-MS/MS สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (IDL) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.05 - 0.17 ng และจากการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง 0.02, 0.10 และ 0.20 mg/kg โดยปรับเปลี่ยนปริมาตรการฉีดสารตั้งแต่ 5, 3 และ 7 μ L พบว่าให้ค่า % recovery และ % RSD อยู่ในเกณฑ์กำหนด

6. คำนำ

หน่อไม้ฝรั่ง เป็นหนึ่งในพืชผักที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย เนื่องจากให้ผลตอบแทนสูงและสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี โดยแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ราชบุรี ชลบุรี นนทบุรี และระยอง ในปัจจุบันพบว่าความต้องการบริโภคหน่อไม้ฝรั่งทั้งตลาดภายในประเทศและต่างประเทศเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากดังนั้นหน่อไม้ฝรั่งจึงจัดเป็นพืชผักส่งออกที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของไทย ซึ่งสามารถส่งออกได้ทั้งในรูปแบบผลผลิตสดและอาหารแปรรูปเช่น หน่อไม้ฝรั่งบรรจุกระป๋อง โดยตลาดที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น ฮองกง สิงคโปร์ และมาเลเซีย แต่ในการปลูกหน่อไม้ฝรั่งเกษตรกรก็พบปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งคือ แมลงศัตรู ซึ่งระบาดทำลายในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งก่อให้เกิดความเสียหาย ส่งผลให้ผลผลิตไม่ได้คุณภาพตามที่ตลาดต้องการ โดยแมลงศัตรูที่สำคัญ ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนบู่ เพลี้ยไฟ แมลงค่อมทอง และด้วงงวง ดังนั้นเกษตรกรผู้ปลูกหน่อไม้ฝรั่งจึงต้องใช้วัตถุดิบทรายทางการเกษตรในการป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูดังกล่าว ซึ่งสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียเป็นหนึ่งในวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูหน่อไม้ฝรั่ง โดยออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินและรบกวนการก่อตัวของหนังกำพร้าในแมลง ทำให้แมลงศัตรูหน่อไม้ฝรั่งตายในที่สุด คุณสมบัติทางเคมีของสารแสดงดังตารางที่ 1 (FAO, 2020)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย

No.	Structure	IUPAC Name	MW. (g/mol)
-----	-----------	------------	----------------

1.		1- (4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea	310.68
	Diflubenzuron		
2.		1-[2,5-Dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea	511.15
	Lufenuron		
3.		1-[4-(2-chloro- α,α,α -trifluorop-tolyloxy)-2-fluorophenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea	488.77
	Fluflenuroxuron		
4.		1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea	381.11
	Teflubenzuron		
5.		1-(2-chlorobenzoyl)-3-(4-trifluoromethoxyphenyl)urea	358.7
	Triflumuron		

การวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชผักเป็นประเด็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากกระแสด้านความต้องการบริโภคอาหารปลอดภัย (Food safety) และการต้องการปรับปรุงคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร ดังนั้นในการส่งออก นำเข้า หรือการบริโภคภายในประเทศเองก็ตามจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างให้อยู่ในระดับที่ไม่เกินค่า MRLs (ค่าที่กำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่มีได้ในสินค้าเกษตร) สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียมีคุณสมบัติในการหน่วงการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน ระเหยกลายเป็นไอได้ยาก และมีมวลโมเลกุลสูง สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด (Multi-residue analysis) โดยนักวิจัยและห้องปฏิบัติการต่างๆทั่วโลกนิยมใช้เทคนิค LC-MS/MS นี้ ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างแบบ Multi-residue ในตัวอย่างสินค้าเกษตร

Contreras, et al. (2003) ทำการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชผักด้วยเทคนิค Positive/Negative ESI LC-MS/MS สกัดตัวผักอย่างด้วยตัวละลาย ethyl acetate และเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น methanol ก่อนฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS พบว่าช่วงการใช้งานอยู่ที่ 5 – 200 mg/kg

Sannino, et al (2005) ตรวจสอบสารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลฟีนิลยูเรีย 7 ชนิด ได้แก่ diflubenzuron, triflumuron, lufenuron, flufenoxuron, teflubenzuron, chlorfuzuron และ hexaflumuron ในผลไม้แปรรูปและผักโดยสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย acetone จากนั้น partition ด้วย ethyl acetate/cyclohexane และตรวจวิเคราะห์ด้วย เทคนิค HPLC-MS/MS โดยใช้คอลัมน์ C18 พบว่า % Recovery อยู่ในช่วง 77 – 102 % และ % RSD อยู่ในช่วง 2 – 10 %

Martínez, et al (2007) ตรวจวัดสารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลฟีนิลยูเรีย 5 ชนิด ได้แก่ diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, lufenuron และ flufenoxuron ในตัวอย่างพืชผัก ได้แก่ แตงกวา ถั่วเขียว มะเขือเทศ และมะเขือโดยเทคนิค LC-ESI-MS ที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01 และ 0.03 mg/kg สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยไม่มีการ Clean-up ตัวอย่าง พบว่าช่วงการใช้งานของวิธี อยู่ในช่วง 1.0 – 3.2 ng/mL และ % Recovery อยู่ในช่วง 79 – 114 %

สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ diflubenzuron, triflumuron, teflubenzuron, lufenuron และ flufenoxuron ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ตามปัจจัยต่างๆเพื่อยืนยันถึงความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งข้อมูลที่ได้นำไปใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างและขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1) เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ปีกเกอร์ (Beaker) กระบอกตวง (Cylinder) ชุดกรองสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (LC-mobile phase filtration) หลอดปั่นเหวี่ยง (Screw-capped polypropylene centrifuge tubes) ขนาด 50 และ 15 mL และกระบอกฉีดยาที่มีตัวกรองเมมเบรน (Syringe with membrane filter) ขนาด 0.20 μ m

2) อุปกรณ์ดูด - จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto pipette) ขนาดต่างๆ เช่น 2 - 20, 10 - 100, 20 - 200, 100 - 1,000, 500 - 5,000 μ L และ 1 - 10mL

3) เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electrical balances) ชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่งเครื่องบดตัวอย่าง (Food processor) เครื่องผสมตัวอย่าง (Vortex mixer) และเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

4) เครื่องตรวจวิเคราะห์ปริมาตรสารพิษตกค้างชนิด Liquid chromatography ยี่ห้อ Agilent technologies รุ่น 1290 infinity ที่ต่อกับ Mass spectrometry (LC-MS/MS) รุ่น 6410 Triple quad

7.2 สารเคมี

1) สารมาตรฐานอ้างอิง (Reference standards) กลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ได้แก่ diflubenzuron, triflumuron, teflubenzuron, lufenuron และ flufenoxuron จาก Dr. EhrenstorferTM ประเทศเยอรมนี

2) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง เช่น acetonitrile (ACN), sodium chloride (NaCl), primary secondary amine (PSA), magnesium sulfate (MgSO₄), disodium hydrogencitrate sesquihydrate (Na₂C₃H₅O(CO₂)₃·1.5H₂O), trisodium citrate dehydrate (Na₃C₃H₅O(CO₂)₃·2H₂O), graphite carbon black (GCB), ammonium formate (NH₄HCO₂), formic acid (HCO₂H), sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) และ sodium sulphate (Na₂SO₄)

7.3 วิธีการ

1) การเตรียม Stock standard solution

ชั่งสารมาตรฐานอ้างอิงกลุ่มเบนโซอิลยูเรียด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง น้ำหนักสารประมาณ 10 ± 0.01 mg ใส่ในขวดวัดปริมาตร (Class A) ขนาด 10 mL เติมตัวทำละลาย acetonitrile (PR grade) ประมาณสามส่วนสี่ของปริมาตรขวดวัดปริมาตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Ultrasonic bath นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยตัวทำละลายข้างต้น ถ่ายใส่ขวดสีชา ติดป้ายระบุชื่อและรายละเอียดที่สำคัญ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ - 20 ± 5°C รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock standard solution กลุ่มเบนโซอิลยูเรีย

No.	Pesticide name	Purity (%)	EXP	Weight (g)	Conc. (ug/mL)
1.	diflubenzuron	99.5	5/2564	0.01081	1,077.60
2.	triflumuron	99.0	8/2566	0.01077	1,066.23
3.	teflubenzuron	98.0	5/2563	0.01032	1,011.36
4.	lufenuron	98.7	3/2564	0.01030	1,016.61
5.	flufenoxuron	99.5	3/2565	0.01096	1,090.52

2) Intermediate standard solution

เจือจางสารละลายมาตรฐาน Stock standard solution ที่ได้ด้วยตัวทำละลาย acetonitrile (PR grade) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 µg/mL จากนั้นถ่ายใส่ขวดสีชา ติดป้ายระบุชื่อและรายละเอียดที่สำคัญ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ - 20 ± 5°C

3) Working standard solution

เจือจางสารละลาย Intermediate standard solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 µg/mL จากนั้นนำมาเตรียม calibration standard solution ในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.20 µg/mL โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการใช้งาน

7.4 เวลาและสถานที่ : ปี พ.ศ. 2561 – 2562

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตการเกษตรกรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1) สภาพของเครื่อง LC-MS/MS

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution) ของกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) A และ B และปรับ Mass spectrometer เพื่อให้สามารถตรวจวัดสัญญาณสารได้ สภาพที่เหมาะสมของเครื่องมือวิเคราะห์มีรายละเอียดดังตารางที่ 3 – 4

ตารางที่ 3 LC Conditions

Column	Kinetex XB-C18, 100 mm × 2.1 mm of Internal diameter (particle size 2.6 μm)				
Mobile phase: A	5 mM (NH ₄)HCO ₂ — 0.01% HCO ₂ H in water				
Mobile phase: B	acetonitrile				
LC program					
	Time (min)	Mobile phase ratio		Flow (mL/min)	Injection
		A (%)	B (%)		Volume (μL)
	0	50	50	0.4	5
	9	2	98	0.4	5
	11	50	50	0.4	5
	12	50	50	0.4	5

ตารางที่ 4 MRM precursor/product ion transition

Pesticide name	RT (min)	Ion transition (primary)	Dwell time	Frag (V)	CE (V)	Ion transition (secondary)	Dwell time	Frag (V)	CE (V)
diflubenzuron	2.52	311 > 158	50	99	8	311 > 141	50	99	35
triflubenzuron	3.29	359 > 156	50	120	20	359 > 139	50	120	20
teflubenzuron	3.98	381 > 158	50	100	10	381 > 141	50	100	45
lufenuron	4.93	511 > 158	50	138	16	511 > 141	50	138	16
flufenoxuron	5.35	489 > 158	50	120	16	489 > 141	50	138	45

2) ช่วงการวัด (Range) ของเครื่อง LC-MS/MS

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของเบนโซอีลยูเรีย 5 ชนิด ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 μg/mL ความเข้มข้นละ 1 ขั้ว พิจารณาช่วงการวัดจากการประเมินด้วยสายตา (visual evaluation) พบว่ามีเพียง 4 ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.01 - 0.2 μg/mL ที่ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสูงสุด จึงเลือกช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยแกน X เป็นความเข้มข้นสารมาตรฐาน (μg/mL) และแกน y เป็นสัญญาณการตรวจวัด พบว่ากราฟที่ได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ($R^2 \geq 0.990$)

3) เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารกลุ่มเบนโซอีลยูเรียในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง

ทดสอบวิธีการสกัด 2 วิธี ได้แก่ วิธี QuEChERS: EN 15662 (Anastassiades, et al) และวิธี SweEt method (EURL-FV) โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.02 mg/kg จำนวน 10 ขั้ว พิจารณาประสิทธิภาพการสกัดจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมาของสาร (% Recovery) ที่ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ 70 – 120 % วิธีสกัดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

QuEChERS: EN 15662: ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.1 g ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 mL เติม acetonitrile 10 mL เขย่าด้วยมือนาน 1 นาที เติมสารสกัดที่ประกอบด้วย Na₂C₃H₅O(CO₂)₃·1.5H₂O 0.5 g, Na₃C₃H₅O(CO₂)₃·2H₂O 1 g, NaCl 1 g และ MgSO₄ 4 g เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

รอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 5 mL ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 mL ที่บรรจุด้วยสารทำความสะอาด (MgSO₄ 750 mg, PSA 125 mg และ GCB 50 mg) จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง Vertex ต่ออีก 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 3000 rpm นาน 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสใน LC-Vial ให้ได้ปริมาตร 1 mL โดยใช้ PTFE syringe filter ขนาด 0.2 µm พร้อมทั้งเติม 5 % formic acid (HCO₂H) 10 µL นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

SweEt method: ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.1g ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 mL เติม ethyl acetate 20 mL เขย่าด้วยมือ นาน 1 นาที เติมสารสกัดที่ประกอบด้วย NaHCO₃ 3 g และ Na₂SO₄ 10 g เขย่าต่ออีกเป็นเวลา 1 นาที นำไปใส่ ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 35° C นาน 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสใน LC-Vial ให้ได้ปริมาตร 1 mL นำไประเหยแห้งแล้วเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น acetonitrile นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

จากผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 86 – 97 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ขณะที่การสกัดด้วยวิธี SweEt method มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 28 – 50 % ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 5) จึงเลือกวิธี QuEChERS: EN 15662 ในการศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ 5 % recovery ของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในหน่อไม้ฝรั่ง ที่ความเข้มข้น 0.02 mg/kg

Pesticide name	Recovery (%), n = 10	
	QuEChERS: EN 15662	SweEt method
diflubenzuron	97	35
triflumuron	95	44
teflubenzuron	93	28
lufenuron	93	50
flufenoxuron	86	52

4) ศึกษาปริมาณ GCB ในการ clean up

ทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ Graphite carbon black (GCB) ที่อยู่ในขั้นตอนการ clean up ตัวอย่างของวิธี QuEChERS: EN 15662 เติมใช้ปริมาณ 50 mg ทำการทดสอบการใช้ GCB ที่ปริมาณ 50, 25, 15 และ 5 mg เปรียบเทียบ % recovery ที่ความเข้มข้น fortified sample 0.1 mg/kg จำนวน 2 ซ้ำ พบว่า GCB ปริมาณ 15 mg ให้ค่า % recovery สูงสุดและอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ 70 - 120 % ดังนั้นจึงเลือกใช้ GCB 15 mg สำหรับใช้ในขั้นตอนการ clean up ของวิธีวิเคราะห์นี้ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 % recovery ของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียจากการใช้ GCB ปริมาณต่างๆ
ทดสอบ fortified sample ที่ 0.1 mg/kg

ปริมาณ GCB (mg)	% Recovery ของกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย (n = 2)				
	diflubenzuron	triflumuron	teflubenzuron	lufenuron	flufenoxuron
50	76	81	49	59	77
25	82	88	74	79	84
15	94	94	94	93	91
5	92	91	87	88	89

5) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในหน่อไม้ฝรั่ง

สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 ซึ่งมีการปรับการใช้ GCB เป็น 15 mg และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีดังนี้

5.1) การทดสอบ Matrix effect

โดยเปรียบเทียบ Slope ของกราฟมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย acetonitrile (ACN) และเตรียมใน Matrix solution ของหน่อไม้ฝรั่ง (Mtrx) ที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 ที่ความเข้มข้น 0.01 – 0.20 µg/mL จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 และ 0.2 µg/mL ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS จากผลการทดลองพบว่าสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียทั้ง 5 ชนิดให้ค่า % Matrix effect (% ME = (slope Mtrx/slope ACN)*100) น้อยกว่า ± 20 % ซึ่งแสดงว่าสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน จึงชี้บ่งได้ว่าสิ่งเจือปนที่อยู่ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งไม่รบกวนผลการวิเคราะห์แต่อย่างใด สามารถใช้ calibration curve ที่เตรียมในตัวทำละลาย acetonitrile ในการตรวจวิเคราะห์ได้ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 matrix effect ของสารมาตรฐานกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในหน่อไม้ฝรั่ง

Pesticide name	Equation		Slope		%ME
	In Mtrx	In ACN	Mtrx	ACN	
Diflubenzuron	y = 180,236.1x + 23.6	y = 201,252.1x - 447.8	180,236.11	201,252.08	-10
Triflumuron	y = 180,236.1x + 23.6	y = 201,252.1x - 447.8	180,236.11	201,252.08	-10
Teflubenzuron	y = 47,731.7x - 77.9	y = 49,745.1x - 133.0	47,731.65	49,745.07	-4
Lufenuron	y = 129,284.0x + 255.0	y = 140,414.8x + 59.4	129,284.01	140,414.81	-8
Flufenoxuron	y = 318,526.4x + 577.2	y = 349,218.3x - 129.7	318,526.37	349,218.31	-9

5.2) ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ (range/linearity)

ทดสอบ fortified samples โดยเติมสารละลายมาตรฐานผสม 5 ชนิดลงในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง (sample blank) 6 ระดับความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ โดยทดสอบที่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 mg/kg สร้างกราฟโดยนำ respond จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่ความเข้มข้นต่างๆมาพล็อตเป็นแกน y และความเข้มข้นของ fortified samples เป็นแกน x โดยพิจารณาความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบจากค่า R^2 ผลการทดลองพบว่าในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.2 mg/kg ให้ค่า $R^2 \geq 0.990$ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นช่วงดังกล่าวเป็นช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบและใช้สำหรับใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดลองช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.02 - 0.2 mg/kg

Pesticide name	fortified samples ที่ความเข้มข้น 0.02 - 0.2 mg/kg (n = 3)	
	สมการเส้นตรง	R ²
diflubenzuron	$y = 257,606.6x + 219.6$	0.9996
triflumuron	$y = 184,180.3x + 583.5$	0.9990
teflubenzuron	$y = 66,295.5x + 124.1$	0.9994
lufenuron	$y = 75,305.3x + 13.7$	0.9996
flufenoxuron	$y = 202,064.9x - 1,074.6$	0.9951

5.3) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงคุณภาพ (Limit of detection: LOD)

ทดสอบ fortified sample ของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำเพื่อประเมินและยืนยันค่า LOD ซึ่งค่าดังกล่าวคำนวณได้จากสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (LOD = 3 × SD) จากการทดลองที่ความเข้มข้น 0.02 mg/kg พบว่าค่า LOD ที่คำนวณได้มีค่า 0.03 mg/kg ซึ่งพบว่ามีสัญญาณการตรวจวัดด้วยเครื่องต่ำมากจึงปรับค่าเป็น 0.01 mg/kg และจากการทำ 10 ซ้ำพบว่าที่ความเข้มข้นจุดนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สัญญาณของตัวอย่างสารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 5 ชนิดได้ ดังนั้นจึงกำหนดให้ LOD ของวิธีวิเคราะห์นี้คือ 0.01 mg/kg ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงคุณภาพ (LOD)

Pesticide name	0.02 mg/kg		Average concentration ที่ 0.01 mg/kg (n = 10)
	SD	3 SD	
diflubenzuron	0.001	0.003	0.0092
triflumuron	0.001	0.003	0.0096
teflubenzuron	0.001	0.003	0.0093
lufenuron	0.001	0.003	0.0092
flufenoxuron	0.001	0.003	0.0091

5.4) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation: LOQ)

ทำการประเมินขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณโดยคำนวณจากสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น 0.02 mg/kg (LOQ = 10 × SD) พบว่ามีความเข้มข้น 0.01 mg/kg แต่ได้กำหนดให้เป็นค่า LOD จึงกำหนดให้ความเข้มข้นที่ 0.02 mg/kg เป็นค่า LOQ ซึ่งจากการ fortified สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.02 mg/kg ลงในตัวอย่าง จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างทดสอบทุกตัวให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 70 -

120 % และมี % RSD อยู่ในช่วง 4.27 – 7.33 ซึ่งยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์กำหนด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11

5.5) ความแม่นยำ (Accuracy)

5.5.1) Trueness ของวิธีการทดสอบ

ทดสอบ fortified sample สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ลงในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับๆละ 10 ซ้ำ คือ 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 mg/kg ซึ่งประเมินค่า % recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ 70 - 120 % จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างทดสอบทุกตัวให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 83 - 105 % ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์การยอมรับแสดงให้เห็นว่าการทำซ้ำทุกครั้งของวิธีทดสอบนี้ให้ค่าผลการทดลองใกล้เคียงกันและเข้าใกล้ค่าที่แท้จริงแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 % Recovery และค่า HORRAT ของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 - 0.20 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ (n = 10)

Pesticide name	Conc. levels	% Recovery	RSD _r	Predicted RSD _r	HORRAT
diflubenzuron	0.02	97	4.84	28.94	0.17
	0.05	105	4.06	24.92	0.16
	0.10	105	3.73	22.45	0.17
	0.15	103	5.25	21.19	0.25
	0.20	102	3.29	20.31	0.16
triflumuron	0.02	95	4.27	29.03	0.15
	0.05	99	2.04	25.15	0.08
	0.10	98	3.94	22.70	0.17
	0.15	95	4.91	21.45	0.23
	0.20	93	3.54	20.62	0.17
teflubenzuron	0.02	93	7.04	29.17	0.24
	0.05	90	4.70	25.50	0.18
	0.10	91	2.84	22.95	0.12
	0.15	91	4.59	21.60	0.21
	0.20	88	4.18	20.78	0.20
lufenuron	0.02	93	5.55	29.17	0.19
	0.05	92	3.49	25.44	0.14
	0.10	88	4.21	23.06	0.18
	0.15	89	6.22	21.66	0.29
	0.20	90	4.26	20.70	0.21
flufenoxuron	0.02	86	7.33	29.48	0.25
	0.05	87	4.67	25.67	0.18
	0.10	83	4.50	23.26	0.19

0.15	88	8.52	21.70	0.39
0.20	94	7.42	20.57	0.36

5.5.2) Precision ของวิธีทดสอบ

สามารถพิจารณาได้ทั้ง 2 แบบ คือ การทำซ้ำในเวลาเดียวกัน (repeatability) และการทำซ้ำต่างเวลา (reproducibility) สูตรคำนวณดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งการทดสอบแบบ repeatability ที่ 5 ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า % RSD อยู่ในช่วง 2.04 – 8.52 และมีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.12 – 0.60 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ HORRAT < 2 แสดงไว้ก่อนหน้านี้แล้วในตารางที่ 10

ตารางที่ 11 การหาค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบโดยประเมินจากค่า HORRAT และ % RSD แบบต่างๆ

Precision of method	
Repeatability	Reproducibility
$HORRAT = \frac{\%RSD_r}{Predicted - RSD_r}$	$HORRAT = \frac{\%RSD_i}{Predicted - RSD_i}$
$Predicted - RSD_r = 0.66 \times 2^{1.0-0.5 \log C}$	$Predicted - RSD_i = 2^{1.0-0.5 \log C}$
$\%RSD_r = \frac{SD}{X} \times 100$	$\%RSD_i = \frac{SD}{X} \times 100$
จำนวนตัวอย่าง (n) = 10 ซ้ำ	จำนวนตัวอย่าง (n) = 20 ซ้ำ
HORRAT < 2	HORRAT < 2

ทำการศึกษาความทวนซ้ำแบบ Intra-laboratory reproducibility โดยการทดสอบ fortified sample สารมาตรฐานกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิดในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งอีกครั้ง ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาร่วมกับการทำ repeatability ก่อนหน้านี้รวมเป็น 20 ซ้ำ พบว่ามีค่า % RSD_i อยู่ในช่วง 3.0 - 11.4 ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 Precision ของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในหน่อไม้ฝรั่ง

Pesticide name	Concentration level (mg/kg) เมื่อ n = 20				
	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20
diflubenzuron					
Average conc.	0.0197	0.0484	0.0981	0.1430	0.1928
% RSD _i	4.34	10.64	8.27	9.60	6.92
HORRAT	0.15	0.42	0.36	0.45	0.34
triflumuron					
Average conc.	0.0190	0.0451	0.0913	0.1322	0.1778
% RSD _i	4.42	11.28	8.19	9.03	5.23
HORRAT	0.15	0.44	0.36	0.42	0.25
teflubenzuron					

Average conc.	0.0190	0.0440	0.0912	0.1350	0.1753
% RSD _i	8.55	5.48	3.02	3.94	4.02
HORRAT	0.29	0.21	0.13	0.18	0.19
flufenoxuron					
Average conc.	0.0181	0.0423	0.0849	0.1285	0.1833
% RSD _i	7.57	5.28	4.06	7.11	6.22
HORRAT	0.26	0.21	0.17	0.33	0.30
lufenuron					
Average conc.	0.0193	0.0444	0.0886	0.1318	0.1824
% RSD _i	6.58	5.94	3.42	5.33	3.66
HORRAT	0.23	0.23	0.15	0.25	0.18

5.6) ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Instrument detection limit: IDL)

ตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/mL ที่เตรียมในตัวทำสารละลาย acetronitrile ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ทำการประเมินโดยใช้สูตรแสดงในสมการที่ 1 พบว่าค่า IDL ของสาร diflubenzuron, flufenoxuron, lufenuron, teflubenzuron และ triflumuron เท่ากับ 0.17, 0.05, 0.09, 0.10 และ 0.07 ng ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

$$IDL = \frac{t_{\alpha} \times RSD \times C}{100} \dots\dots\dots (1)$$

ตารางที่ 13 ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่เครื่อง LC-MS/MS (Instrument detection limit: IDL)
สามารถตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด

List	diflubenzuro	flufenoxuro	lufenuro	teflubenzuro	triflumuro
Injection Volume (uL)	5	5	5	5	5
Injection conc. (ug/mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Concentration Ratio; C (ng)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
No. of sample (n)	10	10	10	10	10
t _α (one-tail), where; df = n -	2.8214	2.8214	2.8214	2.8214	2.8214
Respond (average)	185385.02	121040.34	50397.25	44614.77	135739.57
SD	4372.59	848.50	612.97	640.75	1286.13
RSD (%)	2.36	0.70	1.22	1.44	0.95

IDL (ng)	0.17	0.05	0.09	0.10	0.07
----------	------	------	------	------	------

5.8) ความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

โดยเปลี่ยนแปลงปริมาตรการฉีดสาร (injection volume) ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS จากเดิม 5 μ L เปลี่ยนเป็น 3 และ 7 μ L ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง คือ 0.02, 0.10 และ 0.20 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า % recovery ต้องไม่เกิน 70 – 120 % จากผลการทดลองพบว่าวิธีดังกล่าวมีความทนสูง เนื่องจากให้ค่า % recovery และ % RSD อยู่ในเกณฑ์กำหนดถึงแม้จะมีการเปลี่ยนแปลง injection volume ก็ตาม (ดังตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ค่า % Recovery และ % RSD ของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย 5 ชนิด ที่เปลี่ยนแปลง Injection volume ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น

Pesticide name	Conc.(mg/kg)	Injection volume (μ L), n = 10					
		3		5		7	
		% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD
diflubenzuron	0.02	111	2	99	4	102	5
	0.10	104	2	91	2	105	2
	0.20	101	5	90	2	109	5
triflumuron	0.02	114	3	94	5	101	4
	0.10	107	2	85	2	104	2
	0.20	103	2	85	2	109	3
teflubenzuron	0.02	101	7	98	9	106	4
	0.10	103	2	91	3	103	3
	0.20	98	3	87	4	105	2
lufenuron	0.02	99	6	101	5	108	5
	0.10	100	3	89	3	103	2
	0.20	99	1	92	3	105	3
flufenoxuron	0.02	103	4	95	4	105	4
	0.10	103	3	87	2	105	2
	0.20	100	3	89	2	107	2

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียในหน่อไม้ฝรั่งด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธี QuEChERS: EN 15662 ที่ใช้ GCB 15 mg ในขั้นตอนการ clean-up มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารดังกล่าว วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีช่วงการทดสอบอยู่ในช่วง 0.02-0.2 mg/kg สำหรับ accuracy ที่ระดับความเข้มข้นใน

ตัวอย่าง 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.2 mg/kg มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 83 – 105 %, % RSD อยู่ในช่วง 2.04 – 8.52 ส่วนการศึกษาค่าปริมาณสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียต่ำสุด 5 ชนิด ที่เครื่อง LC-MS/MS สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (IDL) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.05 - 0.17 ng ส่วนค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบมีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.02 mg/kg ตามลำดับ จากการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์โดยปรับเปลี่ยนปริมาตรการฉีดสารตั้งแต่ 5, 3 และ 7 μ L ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.10 และ 0.20 mg/kg ให้ % recovery และ % RSD อยู่ในเกณฑ์กำหนด ซึ่งการปรับเปลี่ยนปริมาตรการฉีดสารไม่มีผลต่อความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำวิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ ไปตรวจวัดหาปริมาณสารพิษตกค้างของสารกลุ่มเบนโซอิลยูเรียทั้ง 5 ชนิด คือ diflubenzuron, triflumuron, teflubenzuron, lufenuron และ flufenoxuron ในหน่อไม้ฝรั่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและนำไปขอการรับรองมาตรฐาน ISO 17025 ของห้องปฏิบัติการต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

- Anastassiades, M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J.. 2003. Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86: 412-431.
- Contreras M. and Mocholí F. Analysis of Non-Volatile Pesticide Residue in Vegetables by Positive/Negative ESI LC/MS/MS. LC/MS Application note, Agilent technology, 2003.
- EURL-FV. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1. European union reference laboratories for residues of pesticides.1 – 33.
- FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides. www.fao.org. Sited on 1 February 2020)
- MartínezD. B., GaleraM. M., VázquezP. P., GarcíaM. D. G.Simple and Rapid Determinationof Benzoylphenylurea Pesticides in RiverWater and Vegetables by LC–ESI-MS. Chromatographia. 2007, 66, October (No. 7/8).
- Sannino A. and BandiniM. Determination of seven benzoylphenylurea insecticidesin processed fruit and vegetables using high-performanceliquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry. 2005; 19: 2729–2733.