

Pengesanan sisa baki racun perosak dalam air berdasarkan teknik suntikan terus *Ultra High-Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (UHPLC-MS/MS)

[Detection of pesticide residues in water based on direct injection technique into Ultra High-Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS)]

Ngan Chai Keong, Mohammad Shahid Shahrin dan Jamaliah Jaafar

Kata kunci: sampel air, sawah, sisa baki racun perosak, suntikan terus, UHPLC-MS/MS

Pengenalan

Penggunaan racun perosak dalam aktiviti pertanian secara amnya akan menyebabkan kewujudan sisa baki racun perosak bukan sahaja dalam hasil komoditi pertanian, malahan sisa tersebut boleh wujud dalam medium udara, air, tanah dan tisu haiwan juga. Kewujudan sisa baki racun perosak dalam pelbagai medium pada aras tertentu boleh ditafsirkan sebagai tahap penyebaran atau pencemaran sisa baki racun perosak dalam ekosistem yang berinteraksi dengan kawasan pertanian. Ujian pengesanan sisa baki racun perosak dalam medium tersebut sangat penting untuk menentukan jenis dan aras sisa baki racun perosak supaya risiko kemudahan dapat ditentukan akibat daripada pendedahan manusia kepada sisa baki perosak tersebut.

Penentuan kehadiran sisa baki racun perosak dalam medium sampel melibatkan beberapa teknik pengesanan. Secara konvensional, sisa baki racun perosak dikesan menggunakan peralatan makmal seperti Kromatografi Gas [*Gas Chromatography* (GC)] dan Kromatografi Cecair Bertekanan Tinggi [*High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC)]. Alat pengesanan ini melibatkan kos yang tinggi dan memerlukan pengendali yang berkepakaran dan terlatih. Secara umum, antara proses penentuan yang terlibat adalah sampel perlu dicerakin dengan reagen kimia terlebih dahulu untuk mengekstrak sisa baki racun perosak daripada sampel ke medium cecair pengekstrak. Namun begitu, terdapat kelemahan dalam proses ini di mana sebatian organik lain dalam medium sampel turut dicerakin oleh reagen kimia ke dalam ekstrak sampel. Kehadiran sebatian-sebatian organik ini dalam ekstrak sampel berpotensi menjejaskan penentuan sisa baki racun perosak semasa proses pengesanan menggunakan alat dijalankan. Oleh itu, ekstrak sampel dalam bentuk cecair perlu ditulenkan dengan beberapa teknik penulenan (contoh *liquid-liquid extraction*, *solid phase extraction*, *solid phase microextraction* dan sebagainya) supaya kandungan sebatian-sebatian organik yang lain dalam ekstrak sampel dapat disingkirkan atau dikurangkan.

Teknik suntikan terus secara umum

Teknik suntikan terus adalah salah satu kaedah pengesanan analit (sebatian yang ingin dikesan) yang tidak memerlukan proses pencerakinan dan/atau penulenan sampel ekstrak. Teknik ini sesuai untuk sampel air yang mempunyai kandungan sebatian-sebatian organik dalam medium air. Secara umum, teknik ini memerlukan langkah pemprosesan sampel yang sangat minimum iaitu hanya melibatkan penapisan sampel air dan seterusnya suntikan sampel air ke dalam alat pengesan. Teknik suntikan terus ke dalam alat pengesan bagi pengesanan sisa baki racun perosak telah dijalankan oleh penyelidik-penyelidik lepas terutamanya bagi analisis *glyphosate* dan metabolitnya dalam air. Selain itu, teknik ini juga digunakan untuk mengesan multi residu pestisid untuk analisis lebih daripada 200 sebatian racun dan produk degradasinya dalam air tanpa pencerakinan tambahan selain daripada penapisan.

Kebaikan dan kekurangan teknik suntikan terus

Kebaikan kaedah suntikan terus adalah keputusan analisis yang lebih singkat diperoleh kerana proses pencerakinan dan penulenan ekstrak sampel tidak perlu dijalankan lagi. Oleh itu, teknik ini membantu mengurangkan masa analisis per sampel dan juga mengurangkan keperluan sumber untuk melaksanakan pengesanan sisa baki racun perosak. Dengan ketiadaan proses pencerakinan dan penulenan ekstrak sampel, tiada reagen atau bahan kimia digunakan untuk kedua-dua proses tersebut dan ini mengurangkan sisa bahan kimia dan kos pelupusan sisa kimia. Secara tidak langsung teknik suntikan terus ini dianggap lebih mesra alam dalam aspek penghasilan sisa kimia. Namun begitu, teknik suntikan terus ini terhad kepada beberapa faktor, yang hanya berkesan untuk:

- 1) Matriks sampel yang kurang kompleks
- 2) Tahap sensitiviti alat pengesan yang tinggi
- 3) Jenis racun perosak yang mempunyai respons yang tinggi dalam alat pengesan

Teknik suntikan terus ke dalam sistem alat pengesan adalah sesuai untuk matriks sampel yang kurang kompleks iaitu kandungan sebatian organik yang rendah dalam medium sampel tersebut. Sampel air pada kebiasaannya mempunyai kandungan sebatian organik yang rendah berbanding dengan sampel tanah, tumbuhan dan haiwan. Sebatian-sebatian organik ini (selain sebatian racun perosak) apabila melebihi aras tertentu dalam medium sampel, berpotensi menjejaskan pengesanan sisa baki racun perosak secara kualitatif dan kuantitatif.

Alat pengesan seperti GC, HPLC adalah kurang sesuai untuk teknik suntikan terus sampel air dalam pengesanan sisa baki racun perosak kerana suntikan terus medium air dalam GC mungkin mendatangkan masalah pemisahan puncak analit. Dengan alat HPLC pula, teknik suntikan terus biasanya memerlukan *injector* spesifik yang membolehkan isi padu suntikan yang besar (1 mL) dimasukkan dalam sistem HPLC.

Kaedah suntikan terus yang dijalankan di MARDI untuk penentuan sisa baki racun perosak

Pensampelan air

Sebanyak 11 sampel air diambil dari parit buang bersebelahan sawah di Kampung Selarong, Alor Setar, Kedah. Sampel air diambil dari parit buang dengan menggunakan kaedah sedutan air berkuasa pam elektrik. Sebanyak 250 mL air diambil untuk setiap sampel air. Sampel air disimpan dalam peti beku ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) selepas pensampelan air.

Penyediaan sampel untuk kaedah suntikan terus

Sampel air daripada simpanan peti beku dibiarkan cair pada suhu bilik. Sampel air sebanyak 100 – 150 mL ditapis dengan kertas penapis mikro serat (*microfibre filter paper*) berdiameter 47 mm dan saiz liang 1.2 mikron dalam radas kaca penapis air (*Gambar 1*). Seterusnya sejumlah 10 mL sampel air tersebut ditapis untuk kali kedua menggunakan penapis picagari (*syringe filter*) yang dipasang dengan penapis PTFE (*Polytetrafluoroethylene*) berdiameter 22 mm dan berliang 0.22 mikron (*Gambar 2*). Sampel air yang telah ditapis kali kedua dimasukkan ke dalam vial 2 mL yang akan dimasukkan ke dalam dulang sampel (*sample tray*) dalam sistem UHPLC-MS/MS.



Gambar 1. Radas kaca untuk penapisan sampel air peringkat pertama



Gambar 2. Picagari penapis untuk penapisan sampel air peringkat kedua

Penyediaan piawai kalibrasi racun perosak dan analisis UHPLC-MS/MS

Pengesahan kaedah pengesanan sisa baki racun perosak secara umumnya melibatkan aspek kualitatif dan kuantitatif. Aspek kualitatif melibatkan pengesanan identiti sisa baki racun perosak. Dalam UHPLC-MS/MS, parameter retensi masa dan pengesanan nisbah ion untuk dua transisi ion diperlukan untuk pengesanan identiti sisa baki racun perosak yang ingin dikesan. Dalam aspek kuantitatif, memandangkan tiada langkah pencerakinan dalam teknik ini, maka penentuan parameter perolehan-semula adalah tidak diperlukan. Namun begitu, kelinearan respons alat pengesanan terhadap kepekatan piawai racun perosak ditentukan supaya keluk kalibrasi dapat ditentukan. Sebanyak

27 sampel piawai racun perosak disediakan supaya racun yang dikesan dapat dikuantifikasi. Senarai racun tersebut adalah seperti dalam *Jadual 1*. Penyediaan piawai kalibrasi racun perosak perlu dijalankan untuk penerbitan keluk kalibrasi racun perosak dalam sistem UHPLC-MS/MS. Piawai racun perosak disediakan dalam air suling (air jenis 1 atau *type 1 water*). Beberapa piawai racun perosak pada kepekatan 1, 2, 5, 10, 20 dan 50 ng/mL disuntik ke dalam UHPLC-MS/MS untuk mendapatkan keluk kalibrasi racun perosak yang dapat memberikan maklumat kelinearan julat kepekatan racun perosak dalam UHPLC-MS/MS. Parameter UHPLC-MS/MS yang digunakan dalam analisis sisa baki racun perosak ditunjukkan seperti dalam *Jadual 2*.

Jadual 1. Senarai piawai racun perosak (dalam analisis sisa baki racun perosak), kumpulan dan kegunaan racun perosak

Racun perosak	Kumpulan racun perosak	Kegunaan
<i>Abamectin</i>	<i>Avermectin (macrocyclic lactone)</i>	Insektisid, mitisid
<i>Azoxystrobin</i>	<i>Strobilurin (QoI inhibitors)</i>	Fungisid
<i>Buprofezin</i>	<i>Insect growth regulator (IGR), Thiadiazinone</i>	Insektisid
<i>Carbaryl</i>	<i>Carbamate</i>	Insektisid
<i>Carbendazim</i>	<i>Benzimidazole</i>	Fungisid
<i>Carbofuran</i>	<i>Carbamate</i>	Insektisid, nematisid
<i>Chlorantraniliprole</i>	<i>Anthranilic diamide</i>	Insektisid
<i>Cyromazine</i>	<i>Triazine derivative</i>	Pengawal pertumbuhan serangga
<i>Diafenthiuron</i>	<i>Thiourea derivative</i>	Insektisid, acarisid
<i>Diazinon</i>	<i>Organophosphorus</i>	Insektisid
<i>Difenoconazole</i>	<i>Triazole (DMI - demethylation inhibitor)</i>	Fungisid
<i>Diflubenzuron</i>	<i>Benzoylurea (chitin synthesis inhibitor)</i>	Insektisid
<i>Dimethoate</i>	<i>Organophosphorus</i>	Insektisid
<i>Dimethomorph</i>	<i>Morpholine</i>	Fungisid
<i>Diuron</i>	<i>Substituted urea (Phenylurea)</i>	Herbisid
<i>Fenthion</i>	<i>Organophosphorus</i>	Insektisid
<i>Fenvalerate</i>	<i>Synthetic pyrethroid</i>	Insektisid
<i>Florpyrauxifen-benzyl</i>	<i>Arylpicolinate</i>	Herbisid
<i>Imidacloprid</i>	<i>Neonicotinoid</i>	Insektisid
<i>Isoprothiolane</i>	<i>Dithiolane compound</i>	Fungisid
<i>Methomyl</i>	<i>Carbamate</i>	Insektisid
<i>Myclobutanil</i>	<i>Triazole (DMI)</i>	Fungisid
<i>Pretilachlor</i>	<i>Chloroacetamide</i>	Herbisid
<i>Pymetrozine</i>	<i>Pyridine azomethine derivative</i>	Insektisid
<i>Tebuconazole</i>	<i>Triazole (DMI)</i>	Fungisid
<i>Thiamethoxam</i>	<i>Neonicotinoid</i>	Insektisid
<i>Triclopyr</i>	<i>Pyridine carboxylic acid</i>	Herbisid

Jadual 2. Parameter-parameter dalam sistem UHPLC-MS/MS

Jenis kolum	Phenomenex Synergy RP C18, 100A			
Dimensi kolum	3 μm saiz pore, 100 mm panjang, 2.0 mm diameter luar			
Suhu kolum	40 °C			
Isi padu suntikan	20 μL			
Tetapan parameter				
	Masa (min)	%A	%B	Kadar aliran (mL/min)
	0.0	75	25	250
	0.5	75	25	250
	10.1	20	80	400
	12.0	20	80	400
	12.1	25	75	250
	15.0	25	75	250
A: 0.1% asid formik dalam air B: 0.1% asid formik dalam (asetonitril gred-HPLC)				
Jenis saringan: Pemonitoran pelbagai reaksi [<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM)]				
Punca ion: Semburan turbo (<i>Turbo spray</i>)				
Polariti: Positif				
Voltan punca ion (<i>Ion source voltage</i>): 5,500 (mod positif)				
Gas perlanggaran (<i>Collision gas</i>) (CAD): Tinggi				
Gas jendela (<i>Curtain gas</i>) (CUR): 10.00				
Gas nebulisasi (<i>Nebulizer gas</i>) (GS1): 50.00				
Pemanas gas (<i>Gas heater</i>) (GS2): 40.00				
Punca pemanas (<i>Source heater</i>): 400 °C				
Resolusi Q1: unit				
Resolusi Q3: unit				
Kadar aliran dalam sistem MS (<i>Mass Spectrometer</i>): ~400 μL/min				

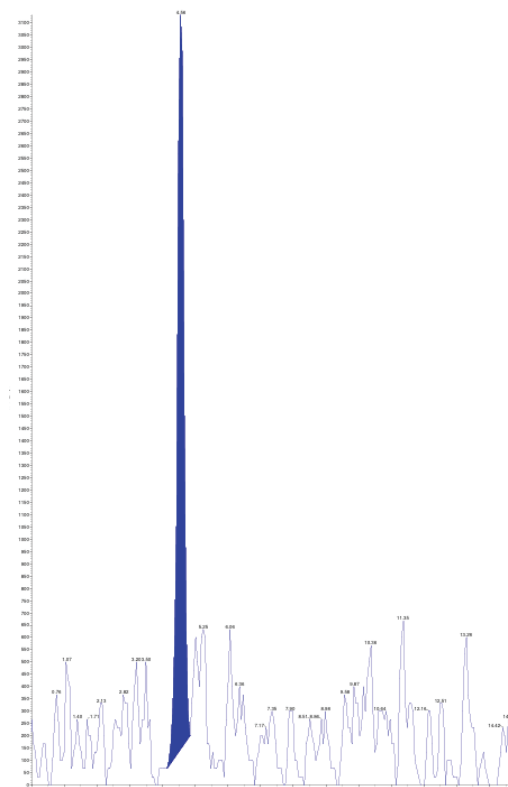
Dapatan daripada teknik suntikan terus yang dijalankan oleh MARDI

Jadual 3 menunjukkan jenis dan aras sisa baki racun perosak yang dikesan terhadap 11 sampel air melalui teknik suntikan terus sampel air ke dalam sistem UHPLC-MS/MS. Daripada 11 sampel air yang dianalisis, hanya satu sampel air tidak menunjukkan sebarang sisa baki racun perosak yang dikesan. Sebanyak lima jenis sisa baki racun perosak dikesan iaitu racun kulat (*azoxystrobin* dan *tebuconazole*), racun serangga (*imidacloprid* dan *isoprothiolane*) dan racun rumpai (*triclopyr*). Secara keseluruhannya kepekatan sisa baki racun perosak yang dikesan adalah kurang daripada 100 ng/mL atau ppb, iaitu had maksimum kepekatan sisa baki racun perosak dalam ekosistem air yang dibenarkan oleh pihak berkuasa Kesatuan Eropah (*European Union*). Rajah 1 menunjukkan contoh kromatogram sisa baki racun perosak yang dikesan.

Jadual 3. Sisa baki racun perosak yang dikesan dalam sampel air

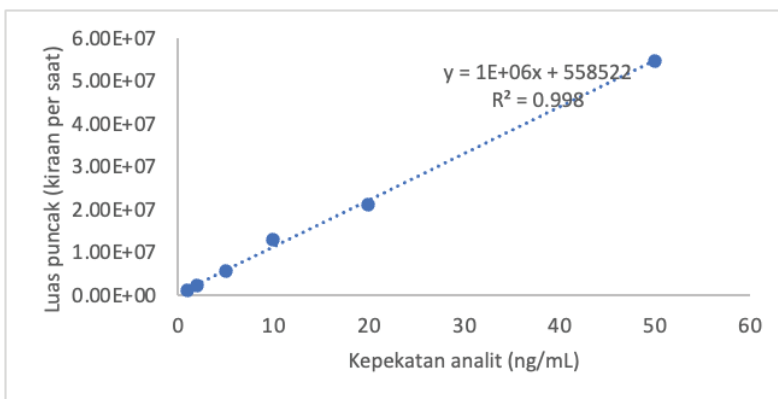
No. sampel	Racun yang dikesan	Kepekatan* (ng/mL atau ppb)
1	<i>Isoprothiolane</i>	13
2	<i>Imidacloprid</i>	78
	<i>Tebuconazole</i>	10
3	<i>Azoxystrobin</i>	11
4	<i>Isoprothiolane</i>	21
5	<i>Imidacloprid</i>	47
6	<i>Tiada racun perosak dikesan</i>	Tidak berkenaan
7	<i>Imidacloprid</i>	17
8	<i>Triclopyr</i>	39
9	<i>Isoprothiolane</i>	73
	<i>Tebuconazole</i>	23
10	<i>Isoprothiolane</i>	29
11	<i>Isoprothiolane</i>	15
	<i>Tebuconazole</i>	11

*Kepekatan diperoleh berdasarkan keluk kalibrasi berasaskan air

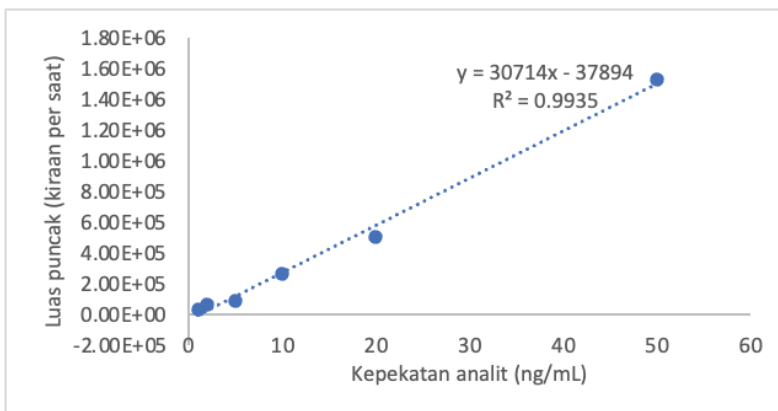


Rajah 1. Puncak azoxystrobin (puncak tertinggi yang gelap) dalam sampel air no. 3

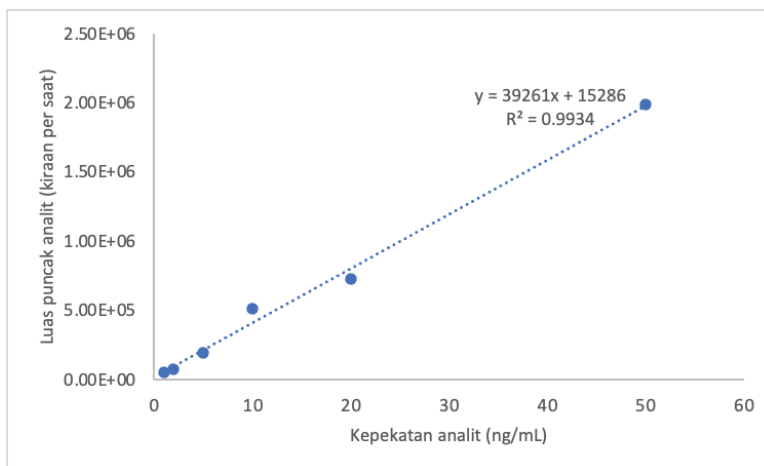
Semua had pengesanan [*Limit of Detection* (LOD)] dan kuantifikasi [*Limit of Quantification* (LOQ)] bagi kaedah ini masing-masing ialah 3 ng/mL dan 10 ng/mL. Julat kepekatan 1 – 50 ng/mL menunjukkan kelinearan yang baik berdasarkan enam tahap suntikan piawai racun perosak. Nilai *r-square* yang diperoleh adalah sama atau melebihi 0.99, membuktikan kelinearan yang tinggi dalam julat tersebut. *Rajah 2* hingga *Rajah 6* menunjukkan keluk kalibrasi piawai racun perosak dalam matriks air suling, manakala *Jadual 4* menunjukkan persamaan keluk kalibrasi berasaskan asetonitril dan air suling, berserta dengan kesan matriks untuk lima racun perosak yang ditemui. Kelinearan keluk kalibrasi piawai racun perosak dalam matriks air suling untuk lima sisa baki racun perosak yang dikesan dalam kajian ini ditunjukkan seperti dalam *Rajah 2 – 6*. Berdasarkan analisis kesan matriks, didapati *triclopyr* mengalami kesan peningkatan matriks yang paling ketara. Oleh itu kuantifikasi *triclopyr* lebih tepat dilakukan menggunakan keluk kalibrasi berasaskan air. Kajian terdahulu juga menunjukkan bahawa dalam teknik suntikan terus, beberapa sebatian boleh mengalami penindasan (*suppression*) atau peningkatan (*enhancement*) ionisasi yang signifikan sekiranya tidak dikompensasikan menggunakan piawai matriks atau *isotopic internal standard*.



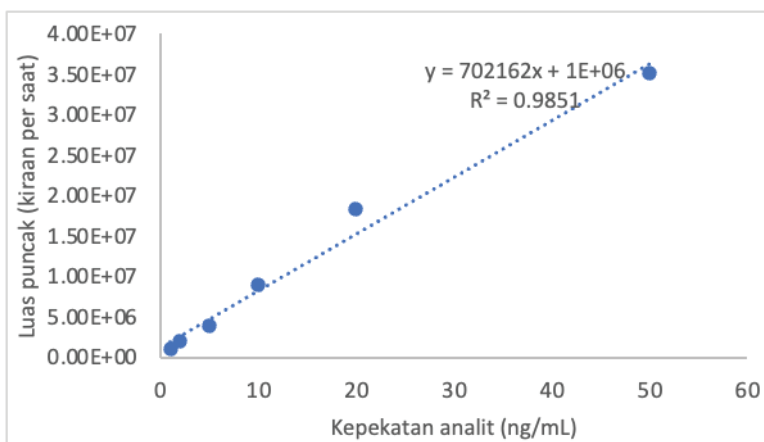
Rajah 2. Keluk kalibrasi azoxystrobin dalam UHPLC-MS/MS



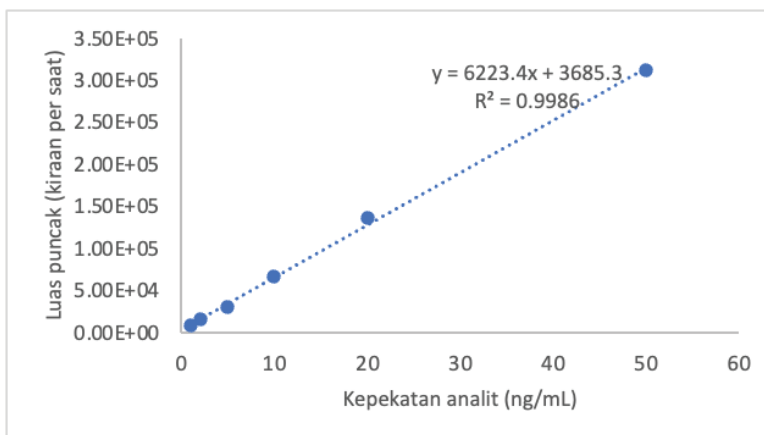
Rajah 3. Keluk kalibrasi imidacloprid dalam UHPLC-MS/MS



Rajah 4. Keluk kalibrasi isoprothiolane dalam UHPLC-MS/MS



Rajah 5. Keluk kalibrasi tebuconazole dalam UHPLC-MS/MS



Rajah 6. Keluk kalibrasi triclopyr dalam UHPLC-MS/MS

Jadual 4. Sisa baki racun perosak yang dikesan dalam sampel air

Racun perosak	Persamaan keluk kalibrasi		Kesan matriks (%)
	Asetonitril	Matriks	
Azoxystrobin	$y = 986683x + 1E + 06$	$y = 1E+06x + 558522$	101.3
Imidacloprid	$y = 25738x + 30278$	$y = 30714x - 37894$	119.3
Isoprothiolane	$y = 42753x + 30177$	$y = 39261x + 15286$	91.8
Tebuconazole	$y = 759323x + 536589$	$y = 702162x + 1E+06$	92.5
Triclopyr	$y = 5001.1x + 1568.7$	$y = 6223.4x + 3685.3$	124.4

Kesimpulan

Kaedah pengesanan sisa baki racun perosak pada sampel air berdasarkan teknik suntikan terus ke dalam sistem UHPLC-MS/MS telah berjaya dijalankan dengan efektif. Sebanyak lima racun perosak berjaya dikesan dalam sampel air iaitu *azoxystrobin*, *imidacloprid*, *isoprothiolane*, *tebuconazole* dan *triclopyr* melalui penggunaan kaedah ini. Teknik suntikan terus mempunyai banyak kelebihanannya dalam aspek penjimatan sumber makmal seperti masa, tenaga pekerja, bahan kimia dan kos operasi. Selain itu, teknik ini juga kurang menghasilkan sisa kimia yang mana secara tidak langsung dapat mengurangkan sumber pengurusan sisa kimia makmal. Namun, teknik ini memerlukan alat pengesan yang bersensitiviti tinggi yang juga amat berkos tinggi dan memerlukan kos penyelenggaraan yang tinggi. Walau bagaimanapun, makmal-makmal yang terlibat dalam pemantauan sampel secara rutin yang melibatkan ribuan analisis sampel setahun disyorkan menggunakan teknik suntikan terus ini untuk analisis sisa baki racun perosak kerana banyak kebaikannya berbanding dengan kaedah analisis konvensional.

Bibliografi

Canlı, O., Oktem Olgun, E., Güzel, B., & Kaplan, M. (2024). Sensitive and accurate determination of 168 micropollutants including pharmaceuticals and pesticides in surface water and wastewater samples with direct injection using jet stream ESI LC-MS/MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 104(8), 1778–1804.

Greulich, K., & Alder, L. (2008). Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 183–197.

Islam, M. A., Amin, S. M., Aziz, D., Ismail, M. F. S., Brown, C. L., Juraimi, A. S., & Arshad, A. (2025). Multicompartmental monitoring and associated health risks estimation of some selected pesticides in the aquatic ecosystems of Sungai Besar, Sekinchan, Malaysia. *Environmental Science and Pollution Research*, 32(35), 21198–21216.

Keršňáková, Z., Lemak, I., Bajtoš, P., Vabcová, J., & Hrouzková, S. (2024). Occurrence and consequences of matrix effects in simultaneous multi-class LC-MS/MS determination of pesticides, pharmaceuticals and Perfluoroalkylsubstances in different types of groundwater. *Water, Air, and Soil Pollution*, 235(6), 396.

- Sandstrom, M. W., Kanagy, L. K., Anderson, C. A., & Kanagy, C. J. (2016). Determination of pesticides and pesticide degradates in filtered water by direct aqueous-injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry (No. 5-B11). US Geological Survey.
- Ulrich, J. C., & Ferguson, P. L. (2021). Development of a sensitive direct injection LC-MS/MS method for the detection of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in hard waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(14), 3763–3774.
- Yusà, V., Sanchís, Y., Dualde, P., Carbonell, E., & Coscollà, C. (2021). Quick determination of Glyphosate and AMPA at sub µg/L in drinking water by direct injection into LC-MS/MS. *Talanta Open* (4), 100061.

Ringkasan

Satu teknik suntikan terus sampel air ke dalam UHPLC-MS/MS untuk pengesanan sisa baki racun perosak telah dibangunkan dan diaplikasikan terhadap sampel air lapangan yang diambil dari parit buang di kawasan sawah di Kampung Selarong, Alor Setar, Kedah. Sisa baki racun kulat (*azoxystrobin* dan *tebuconazole*), racun serangga (*imidacloprid* dan *isoprothiolane*) dan racun rumpai (*triclopyr*) telah dikesan dalam julat 10 – 78 ng/mL atau ppb (*part per billion*). Kaedah ini yang tiada fasa pencerakinan adalah mudah, cepat dan menjimatkan sumber-sumber makmal dan telah menjadi kaedah pilihan makmal dalam analisis rutin sisa baki racun perosak dalam air.

Summary

A direct injection technique of water samples into UHPLC-MS/MS for the detection of pesticide residues has been developed and applied to field water samples collected from drainage ditches in paddy fields at Kampung Selarong, Alor Setar, Kedah. Residues of fungicides (*azoxystrobin* and *tebuconazole*), insecticides (*imidacloprid* and *isoprothiolane*) and herbicides (*triclopyr*) were detected in the range of 10 – 78 ng/mL or ppb (parts per billion). This method, which does not involve an extraction phase, makes it simple, fast, and conserves laboratory resources, making it the preferred method for routine analysis of pesticide residues in water.

Pengarang

Ngan Chai Keong (ChM. Dr.)
Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor
E-mel: ckngan@mardi.gov.my

Mohammad Shahid Shahrin (ChM.) dan Jamaliah Jaafar (ChM.)
Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor