รายงานสรุปผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัชสำหรับการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงปนเปื้อนปริมาณน้อย

Development of stir-brush solid phase microextractor for trace pesticides analysis

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงดี บูรณชัย หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา ผู้ร่วมโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร ผู้ร่วมโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI580057S

1. ชื่อโครงการเดี่ยว การพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัชสำหรับการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงปนเปื้อนปริมาณน้อย

Development of stir-brush solid phase microextractor for trace pesticides analysis

2. คณะนักวิจัยและคณะ/หน่วยงานต้นสังกัด

3.1 จงดี บูรณชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

3.2 เพริศพิชญ์ คณาธารณา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

3.3 ปณต ถาวรังกูร ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์

3. กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและการสนับสนุนนักศึกษาจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI580057S

ขอขอบคุณสถานวิจัยการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซนเซอร์ ภาควิชาเคมี ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อในส่วนการสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกสถานวิจัยการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยและไบโอเซนเซอร์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี ภาควิชาฟิสิกส์ และหน่วยวิจัยและบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามที่อำนวยความสะดวกสนับสนุนโครงการงานวิจัยนี้

4. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัช โดยใช้ขนแปรงสแตนเลส สตีล ที่เคลือบผิวด้วยซิงค์ออกไซด์และท่อนาโนคาร์บอนผนังหลายชั้นที่มีการปรับปรุงให้มีหมู่ฟังก์ชันเป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่ต่อเข้ากับมอเตอร์ขนาดเล็ก โครงสร้างของซิงค์ออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะคล้ายดอกไม้เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับขนแปรงสแตนเลส สตีลได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถเคลือบท่อนาโนคาร์บอนผนังหลายชั้นที่มีการปรับปรุงให้มีหมู่ฟังก์ชันเป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่ใช้เป็นตัวดูดซับได้ปริมาณมากขึ้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า เทคนิคที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงการตอบสนองเชิงเส้นสำหรับการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรนและคาร์บาริลที่ 25 to 500 ng mL^{-1} and 50 to 500 ng mL^{-1} และขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 17.5±2.0 ng mL^{-1} and 13.0±1.8 ng mL^{-1} ตามลำดับ โดยวิธีการเตรียมตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัชให้ค่าการทำซ้ำที่ดี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 5.6 เมื่อมีการเตรียมซ้ำ 6 ชุด) หลังจากนั้นจึงได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดที่

พัฒนาขึ้นในการสกัดและเพิ่มความเข้มข้นของคาร์โบฟ ิแรนและคาร์บาริลในผักและผลไม้ ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน พบว่า จากตัวอย่างผักและผลไม้ที่ศึกษาพบการตกค้างของคาร์โบฟูแรนที่ความเข้มข้น 9.24±0.93 ng g^{-1} และ คาร์บาริลที่ความเข้มข้น 7.05±0.61 ng g^{-1} โดยให้ร้อยละการได้กลับคืนในช่วง 73.7±10.0% ถึง 108.4±2.6% สำหรับคาร์โบฟูแรน และ 75.7±10.0% ถึง111.7±5.7% สำหรับคาร์บาริล

Abstract

A novel miniaturized “stir-brush microextractor” was prepared using a zinc oxide/hydroxylated multiwalled carbon nanotubes (ZnO/MWCNTs-OH) coated stainless steel brush connected to a small dc motor. The synthesized zinc oxide on each strand of stainless steel had a flower-like nanostructure when observed by a scanning electron microscope (SEM). This structure produced a large surface area before it was coated with the hydroxylated multiwalled carbon nanotubes sorbent. Under optimal conditions, the developed device provided a good linearity for the extraction of carbofuran and carbaryl, in the range of 25 to 500 ng mL^{-1} and 50 to 500 ng mL^{-1}, respectively, with low limits of detection of 17.5±2.0 ng mL^{-1} and 13.0±1.8 ng mL^{-1}. It also provided a good stir-brush-to-stir-brush reproducibility (% relative standard deviation < 5.6%, n=6). The device was applied for the extraction and preconcentration of carbamate pesticides in fruit and vegetable samples prior to analysis with a gas chromatograph coupled with a flame ionization detector (GC-FID). Carbofuran was found at 9.24±0.93 ng g^{-1} and carbaryl was detected at 7.05±0.61 ng g^{-1} with good recoveries in the range of 73.7±10.0% to 108.4±2.6% for carbofuran and 75.7±10.0% to 111.7±5.7% for carbaryl.

5. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) ประกอบด้วย

5.1 บทนำ

กระแสความนิยมในเรื่องการดูแลและใส่ใจในสุขภาพและการเกิดโรคอุบัติใหม่ซึ่งยังหาสาเหตุไม่ได้ ทำให้ประชาชนส่วนใหญ่หันมาบริโภคผักและผลไม้มากขึ้น คุณภาพของผักและผลไม้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเลือกซื้อของผู้บริโภค ซึ่งโดยส่วนใหญ่ผู้บริโภคมักจะเลือกซื้อจากรูปลักษณ์ภายนอกของผักและผลไม้ที่สามารถสังเกตได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการดึงดูดการซื้อของผู้บริโภค เกษตรกรจึงใช้สารเคมีประเภทยาฆ่าแมลงเพื่อป้องกันการทำลายของแมลงและศัตรูพืช โดยเฉลี่ยแล้วเกษตรกรทั่วโลกใช้ยาฆ่าแมลงปีละประมาณ 25 ตัน ถือว่าเป็นปริมาณการใช้ที่ค่อนข้างมาก (Prez-Moral and Mayes, 2006) การใช้ยาฆ่าแมลงเหล่านี้สามารถทำได้โดยพ่นไปบนผลิตผลทางการเกษตรโดยตรงหรือบนดิน ทำให้พืชจะได้รับสารเคมีเหล่านี้ได้เพียง 0.1% เท่านั้น ส่วนที่เหลือจะเข้าสู่สิ่งแวดล้อมโดยปนเปื้อนอยู่ในดิน น้ำ และอากาศ (Arias-Estevez et al., 2008) แม้ว่ายาฆ่า

แมลงบางกลุ่มจะสลายตัวได้เร็วในสิ่งแวดล้อม แต่ถ้ามนุษย์ได้รับสารพิษเหล่านี้ก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย โดยก่อให้เกิดพิษทั้งแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรังได้ (Sanchez-Barragan et al., 2007; Suwansa-ard et al., 2005) ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเฝ้าระวังและวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงที่ปริมาณน้อยที่อาจปนเปื้อนในผักและผลไม้

ความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงปนเปื้อนในผักและผลไม้อยู่ในระดับส่วนในล้านส่วน (parts per million, ppm) หรือส่วนในพันล้านส่วน (parts per billion, ppb) จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัด (extraction) เพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) และกำจัดสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ (clean-up) (Filho et al., 2010; Pico et al., 2007) เพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดได้ และมีความสะอาดเพียงพอต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งที่อาศัยเทคโนโลยีวัสดุ โดยจะสังเคราะห์หรือเคลือบตัวดูดซับดังกล่าวบนเส้นลวดโลหะที่มีลักษณะเรียงกันเป็นแถวคล้าย ๆ กับขนแปรง (brush) เพื่อเพิ่มปริมาณตัวดูดซับและพื้นที่ผิวที่ใช้ในการสกัดสาร และพัฒนาให้สามารถสกัดสารได้ง่ายขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า นำไปใช้งานในภาคสนามได้อย่างสะดวกและพกพาได้ง่าย โดยเรียกเทคนิคใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้ว่า “เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัช” โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือวิเคราะห์และเทคนิคการสกัด ได้นำเทคนิคการสกัดที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการสกัดยาฆ่าแมลง คือ คาร์โบฟูแรน และ คาร์บาร์ริล ที่ปนเปื้อนหรือตกค้างในตัวอย่างผักและผลไม้ ซึ่งยาฆ่าแมลง 2 ชนิดนี้เป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตที่เลือกเป็นโมเดลในการศึกษานี้เนื่องจากมีการใช้เพื่อกำจัดแมลงในผักและผลไม้กันอย่างแพร่หลาย

5.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัช สำหรับการสกัดและวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผักและผลไม้ ที่ใช้งานได้ง่าย มีประสิทธิภาพในการสกัดดี ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว มีความคงทนต่อการใช้งาน และมีราคาถูก เหมาะสำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทั่วไปได้

5.3 สรุป (สรุปผลการทดลองทั้งหมดของงานวิจัยทั้งชุดโครงการ ทั้งที่ตีพิมพ์แล้ว และยังไม่ตีพิมพ์)

งานวิจัยนี้แบ่งวิธีการดำเนินงานออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อทำให้เครื่องมือวิเคราะห์มีประสิทธิภาพในการใช้งานสูงสุด และ อีกส่วนหนึ่ง คือ การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัช เพื่อทำให้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างใช้งานได้ง่าย มีประสิทธิภาพในการสกัดสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดยาฆ่าแมลงในตัวอย่างจริงได้ ผลการทดลองของแต่ละส่วนโดยสรุปมีดังนี้

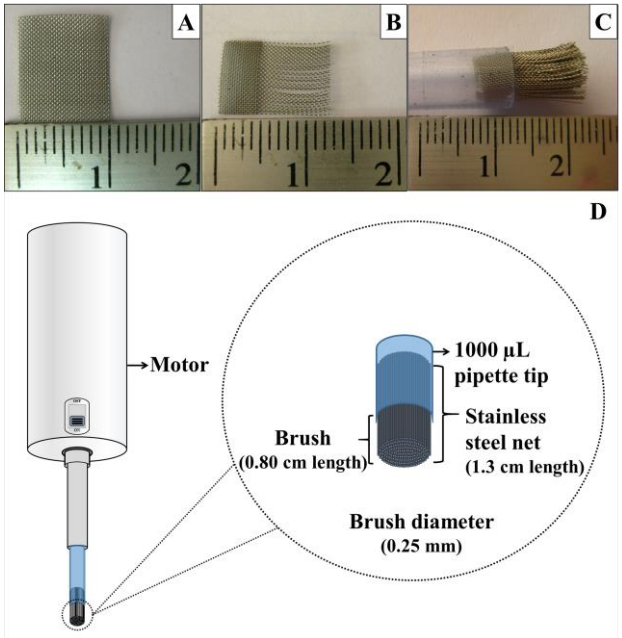
5.3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์: เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟที่มีตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี สรุปได้ดังนี้ อัตราการไหลของแก๊สพา (carrier gas) (He) ที่ 1.4 mL min^{-1} อัตราการไหลของแก๊ส make up (N_2) ที่ 30 mL min^{-1} อัตราการไหลของแก๊สเชื้อเพลิง (fuel) (H_2) 40 mL min^{-1} อัตราการไหลของแก๊สออกซิแดนท์ (oxidant) (Air) ที่ 300 mL min^{-1} อุณหภูมิของหัวฉีดที่ 290°C อุณหภูมิของตัวตรวจวัดที่ 280°C อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 70°C เวลาคงที่ที่อุณหภูมิ เริ่มต้นของคอลัมน์ที่ 30 วินาที อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิที่ 25°C ต่อ 1 นาที และอุณหภูมิสุดท้ายของคอลัมน์ ที่ 210°C

จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟสำหรับการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรนและคาร์บาริล โดยศึกษาช่วงการตอบสนองเชิงเส้น (linearity) พบว่าให้การตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้นที่ 0.50–400 µg mL^{-1} สำหรับการวิเคราะห์สารคาร์โบฟูราน และ 1.0 – 400 µg mL^{-1} สำหรับการวิเคราะห์สารคาร์บาริล และให้ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ที่ 43.6±4.9 ng mL^{-1} และ 41.3±1.1 ng mL^{-1} และขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ที่ 145.5±3.4 ng mL^{-1} และ 137.6±2.5 ng mL^{-1} สำหรับคาร์โบฟูแรนและคาร์บาริล ตามลำดับ

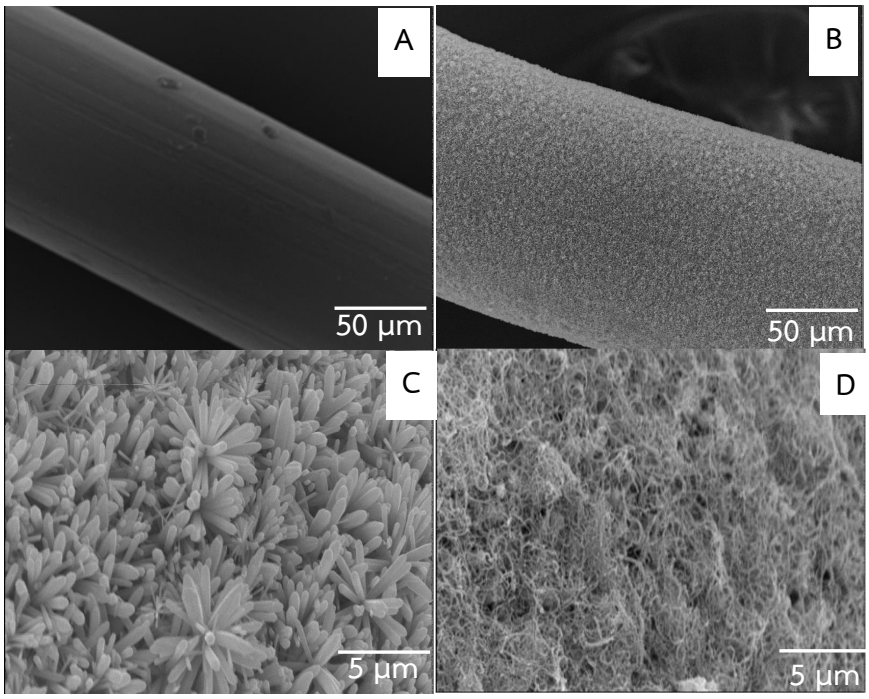
5.3.2 การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัช

อุปกรณ์การสกัดสารด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัช สำหรับการสกัดและวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดง (A) ตะแกรงสแตนเลส สตีล (B) ตะแกรงสแตนเลส สตีล หลังจากดึงเส้นลวดในแนวขวางออก (C) ขนแปรงสแตนเลส สตีลที่ได้จากการนำตะแกรงในรูป (B) จำนวน 10 แผ่น มาม้วนรวมกันแล้วสอดไว้ในปลายปิเปตทิปขนาด 1000 ไมโครลิตร และ (D) เป็นรูปวาดของอุปกรณ์การสกัดแบบสเตอร์บรัชที่พัฒนาขึ้น

และเมื่อสังเกตลักษณะพื้นผิวของขนแปรงสแตนเลส สตีล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า การเคลือบผิวของขนแปรงด้วยซิงค์ออกไซด์สามารถช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของขนแปรงได้มาก (รูปที่ 2 และ C) จากนั้นจะทำให้สามารถเคลือบท่อนาโนคาร์บอนผนังหลายชั้นได้ปริมาณมากขึ้น โดยจะสังเกตเห็นการกระจายตัวที่ดีของท่อนาโนคาร์บอนผนังหลายชั้น (รูปที่ 2D)



รูปที่ 2 ลักษณะของตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อย (A) ลวดสแตนเลส สตีล (B และ C) ลวดสแตนเลส สตีล ที่เคลือบด้วยซิงค์ออกไซด์ และ (D) ลวดสแตนเลส สตีล ที่เคลือบด้วยซิงค์ออกไซด์และท่อนาโนคาร์บอนผนังหลายชั้น

จากนั้นจึงได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้อุปกรณ์การสกัดที่พัฒนาขึ้น มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด ได้ศึกษาประสิทธิภาพโดยรวมของวิธีที่พัฒนาขึ้น นั่นคือ ทั้งในส่วนของเครื่องมือและส่วนของการเตรียมตัวอย่าง พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นให้การตอบสนองเชิงเส้นในช่วงที่กว้างสำหรับการตรวจวัดสารทั้งสองชนิด โดยให้ช่วงการตอบสนองเชิงเส้นที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025 –1.0 µg mL^{-1} ($y = [(151 \pm 18)x + (3.9 \pm 1.7)] \times 10^3$, $R^2 = 0.9992$) สำหรับสารคาร์โบฟูแรน และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.050 -1.0 µg mL^{-1} ($y = [(203 \pm 28)x + (0.284 \pm 0.036)] \times 10^3$, $R^2 = 0.9964$) สำหรับสารคาร์บาริล โดยมีขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขีดจำกัดการตรวจวัด และขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับการวิเคราะห์คาร์โบฟูแรนและคาร์บาริล

สารที่วิเคราะห์	ขีดจำกัดการตรวจวัด ($ng\ mL^{-1}$)	ขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ($ng\ mL^{-1}$)
คาร์โบฟูแรน	17.5±2.0	65.8±7.0
คาร์บาริล	13.0±1.8	43.3±6.0

และเมื่อศึกษาการเตรียมตัวดูดซับของแข็งแบบสเตอร์บรัชซ้ำ 6 ชุด โดยใช้สารเคมีที่เตรียมต่างครั้งกัน พบว่าตัวดูดซับของแข็งแบบสเตอร์บรัชที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเตรียมซ้ำได้ดี เพราะให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนไม่ต่างกันมาก โดยให้ % RSD = 5.4 สำหรับสารคาร์โบฟูแรน และ % RSD = 4.6 สำหรับสารคาร์บาริล นอกจากนี้ยังศึกษาต่อว่าตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อยแบบสเตอร์บรัชที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำมาใช้ซ้ำได้หรือไม่ พบว่าตัวดูดซับที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ไม่เกิน 8 ครั้ง

จากนั้นจึงได้ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณการตกค้างคาร์โบฟูแรนและคาร์บาริลในตัวอย่างผักและผลไม้จากตลาดคลองเรียน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา จำนวนทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบการปนเปื้อนคาร์โบฟูแรนอยู่ในช่วงที่ไม่สามารถตรวจวัดได้จนถึง 18.3±1.8 $ng\ mL^{-1}$ ในตัวอย่างแตงกวา และพบการปนเปื้อนคาร์บาริลอยู่ในช่วงที่ไม่สามารถตรวจวัดได้จนถึง 14.0±1.2 $ng\ mL^{-1}$ ในตัวอย่างถั่วฝักยาว และจากผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ค่า % recovery ในช่วง 73.7±7.8 ถึง 108.4±2.6 สำหรับคาร์โบฟูแรนและ 75.7±7.5 ถึง 111.8±5.7 สำหรับคาร์บาริล

6. ภาคผนวก

6.1 สำเนาบทความที่ตีพิมพ์แล้ว (Reprint)

Analytica Chimica Acta 917 (2016) 27–36

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

A novel miniaturized zinc oxide/hydroxylated multiwalled carbon nanotubes as a stir-brush microextractor device for carbamate pesticides analysis

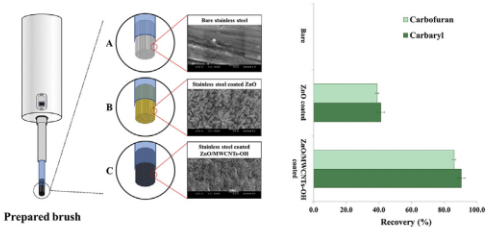
Fonthip Makkliang [a, b, c], Proespichaya Kanatharana [a, b, c], Panote Thavarungkul [a, b, d], Chongdee Thammakhet [a, b, c, *]

[a] Trace Analysis and Biosensor Research Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[b] Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[c] Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
[d] Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

HIGHLIGHTS

- A brush as the sampling tool was first introduced.
- A novel miniaturized and portable stir brush microextractor was developed for carbamate pesticides extraction.
- Large surface area of ZnO flower-like nanostructure coated with MWCNTs –OH on each brush fiber was observed.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 December 2015
Received in revised form
26 February 2016
Accepted 26 February 2016
Available online 9 March 2016

Keywords:
Trace analysis
Carbamate pesticides
Zinc oxide
Multiwalled carbon nanotubes
Miniaturized solid phase extraction

ABSTRACT

A novel miniaturized "stir-brush microextractor" was prepared using a zinc oxide/hydroxylated multiwalled carbon nanotubes (ZnO/MWCNTs–OH) coated stainless steel brush connected to a small dc motor. The synthesized zinc oxide on each strand of stainless steel had a flower-like nanostructure when observed by a scanning electron microscope (SEM). This structure produced a large surface area before it was coated with the hydroxylated multiwalled carbon nanotubes sorbent. Under optimal conditions, the developed device provided a good linearity for the extraction of carbofuran and carbaryl, in the range of 25–500 ng mL^{-1} and 50–500 ng mL^{-1}, respectively, with low limits of detection of 17.5 ± 2.0 ng mL^{-1} and 13.0 ± 1.8 ng mL^{-1}. It also provided a good stir-brush-to-stir-brush reproducibility (% relative standard deviation < 5.6%, n = 6). The device was applied for the extraction and preconcentration of carbamate pesticides in fruit and vegetable samples prior to analysis with a gas chromatograph coupled with a flame ionization detector (GC–FID). Carbofuran was found at 9.24 ± 0.93 ng g^{-1} and carbaryl was detected at 7.05 ± 0.61 ng g^{-1} with good recoveries in the range of 73.7 ± 10.0% to 108.4 ± 2.6% for carbofuran and 75.7 ± 10.0% to 111.7 ± 5.7% for carbaryl.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sample preparation is one of the most important steps in

* Corresponding author. Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.
E-mail address: chongdee.t@psu.ac.th (C. Thammakhet).

http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.040
0003-2670/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

analytical methodology. It is not only used to preconcentrate analytes until the concentration can be reliably measured by a suitable instrument but also used to clean-up and reduce interferences of the matrix in the samples. Solid phase extraction (SPE) has now become one of the most popular methods because the extraction, preconcentration and clean-up can be done simultaneously [1]. Moreover, this technique provides good reproducibility, a high enrichment factor and is easy to operate [2,3]. However, the conventional SPE techniques have several disadvantages; they still require large volume of organic solvent and sample solution [4,5], and they use large amount of adsorbents (0.50 g–100 g). All of which result in their relatively high cost. Recently, miniaturization has become an interesting trend for the development of SPE techniques to try to minimize such drawbacks and to make the sample preparation techniques to become "green analytical procedures". Some examples are pipette-tip solid phase extraction (PT-SPE) [6,7], matrix solid phase dispersion (MSPD) [8], magnetic solid phase extraction (MSPE) [9], membrane micro-solid phase extraction (membrane μ-SPE) [10,11] and micro-solid phase extraction (μ-SPE) [12–14]. However, the processes of extracting target analytes still required external equipments, such as an ultrasonic bath or a magnetic stirrer [10,15]. For this work, a novel miniaturized SPE in the form of a modified stir-brush has been developed, using a stainless steel net as the substrate for an appropriate sorbent. The stir-brush microextractor is portable since it was equipped with a small dc motor and can be used without any external power or other equipment.

To obtain good extraction efficiency, the surface area of a stainless steel brush should be maximized. Coating with a ZnO nanostructure is an interesting choice because it is simple to synthesize under mild conditions without a template and it has a high thermal stability and high surface area-to-volume ratio [16,17]. Recently, there are many reports that used ZnO nanostructure as an SPME fiber for the extraction of aldehydes [18], chlorobenzene [19] and trihalomethane [20] and ZnO nanostructure coated with various sorbent materials such as ZnO/polyaniline SPME fiber for BTEX extraction [21], ZnO/chitosan SPME fiber for chlorophenol extraction [22], ZnO/polypyrrole SPME fiber for aliphatic hydrocarbon extraction [23] and graphene/ZnO/sol–gel SPME fiber for volatile sulfur extraction [24].

As for the sorbent, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) have gained much attention due to their excellent ability to adsorb hydrophobic organic compounds, their extremely large surface area-to-volume ratio, good chemical stability and easy functionalization [25,26]. The MWCNTs have been successfully applied as adsorbents for both non-polar and polar organic compounds because they can interact with aromatic compounds of both compounds *via* a π–π interaction [27]. However in the latter case, they need to be functionalized with OH or COOH group to improve their adsorption ability by hydrogen bonding [28,29]. In this work, MWCNTs functionalized with OH groups coated on ZnO nanostructure were used as the adsorbents for an extraction of polar compounds from fruit and vegetable samples.

Herein, the development of a novel miniaturized device based on a ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor to extract trace amount of the very toxic carbamate pesticides has been reported for the first time. Carbofuran and carbaryl were selected as model polar compounds in this study. Despite the fact stated that the use of carbofuran is banned in Canada and the EU, but these carbamate pesticides are still widely used, either legally or illegally, in different parts of the world, especially in developing countries where a large quantity of world food is produced. Similar to the case of Canada and the EU, carbofuran also has been banned in Thailand by the Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Co-operatives since 2012 whereas carbaryl is still legal and continuously used today [30]. From the import data of these pesticides, in 2011 (the last year of being legal) the imported quantity of carbofuran was abnormally high. Therefore carbofuran might still be distributed in Thailand's local markets where farmers can still purchase indicated by these example publications. Wanwimolruk and co-workers, in 2015, found the contamination of these pesticides in chinese kale samples in the concentration range from 0.010 ng g^{-1} to 62.5 ng g^{-1} for carbofuran and from 1.0×10^{-3} ng g^{-1} to 1.0×10^{-2} ng g^{-1} for carbaryl [31]. Charoenpornpukdee and co-workers, 2015 reported the contamination of these two pesticides in water samples collected near an agricultural plantation at the concentration of 25.9 ng mL^{-1} for carbofuran and from 45.1 ng mL^{-1} to 191 ng mL^{-1} for carbaryl [6]. In addition, in Bangladesh, these carbamate pesticides were also detected in fruits and vegetables in the concentration range from 5.0 ng g^{-1} to 1.0×10^{3} ng g^{-1} for carbofuran and from 12 ng g^{-1} to 3.0×10^{2} ng g^{-1} for carbaryl [32]. Therefore, these two pesticides in fruits, vegetables or water samples are still worth pursuing and that is a reason why these two carbamate pesticides were selected as model compounds in this work.

The brush, connected to a small dc motor, was used to extract the two analytes, and is thus, called a "stir-brush microextractor". This microextractor is portable and can be used to extract the analytes without any requirement for external power or any other equipment. Parameters that affected the analytical performances of the developed method for the analysis of these carbamate pesticides were evaluated to obtain the highest extraction efficiency prior to applying the stir-brush microextractor for the analysis of real samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and material

Carbofuran ($C_{12}H_{15}NO_3$) (98% purity) was from Sigma–Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Carbaryl ($C_{12}H_{11}NO_2$) (96% purity) was from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA). Acetonitrile was from Merck (Darmstadt, Germany). Chloroform, sodium hydroxide (97% purity) and methanol were from Lab-Scan (Bangkok, Thailand). $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) (95% purity) was from CARLO ERBA (Rodano, Italy). 25% NH_3 in H_2O was from QReC™ (Wellington, New Zealand). Nafion was from Fluka (Buchs, Switzerland). Ultrapure water was from a maximum ultrapure water system (18.2 MΩ.cm, ELGA, England). MWCNTs (≥95% purity) with diameters of 60–100 nm and lengths of 2–5 μm were from Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd (Shenzhen, China). The stainless steel net (304 grade) with a strand diameter of 0.25 mm was from Tianjin Xingang (Hebei, China).

2.2. Instrumentation

Chromatographic analysis was performed on a gas chromatograph coupled with a flame ionization detector (GC–FID) (6890 model, Agilent Technologies, California, USA) with an HP-5MS capillary column (30 m length, 0.25 mm I.D. and 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, California, USA). To obtain the shortest analysis time, the highest response and a good separation, the conditions of the GC–FID for analysis of carbofuran and carbaryl were first optimized, *i.e.,* flow rates of the carrier (He), make up (N_2), fuel (H_2) and oxidant (air) gases, and the temperatures of the column, injector and detector.

The surface morphology of the ZnO/MWCNTs–OH stir-brushes was observed using a scanning electron microscope (JSM 5200, JEOL, Tokyo, Japan). An ultrasonic bath (37 kHz, Ultrasonic Cleaning Units, Model Elmasonic S 100H, Singen, Germany) was used to facilitate the synthesis of ZnO nanostructure onto the stainless steel brush.

2.3. Preparation of the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor

The stainless steel net was cut into a small piece (1.2 × 1.0 cm^2) (Fig. 1A) and the vertical wires were removed to form a brush (0.80 cm brush length, about 25 strands/piece) (Fig. 1B). The brush was sequentially cleaned with acetone, methanol and ultrapure water in an ultrasonic bath each for 5 min and dried in air at room temperature. Ten pieces of the brush were then rolled together and inserted into a cut 1000 μL pipette tip (0.50 cm in diameter) (Fig. 1C).

The ZnO nanostructure was coated onto the stainless steel brush using the procedure that was modified from Khorsand and co-workers [33]. Briefly, 2.75 g of Zn $(CH_3COO)_2.2H_2O$ and 2.0 g of NaOH were dissolved in 12.5 mL of 25% NH_3 solution. Ultrapure water, 12.5 mL, was added and stirred for 15 min. The stainless steel brush was immersed in this solution and sonicated for a certain period of time at 180 °C for the hydrothermal synthesis of the ZnO nanostructure. After that, the brush was rinsed with ultrapure water and dried at 100 °C for 60 min. The ZnO nanostructure coated stainless steel brush was then immersed for 2 min in a mixture of 0.5%w/v of MWCNTs–OH and 0.050% Nafion in methanol and dried at 100 °C for 15 min. This procedure was repeated five times to allow the MWCNTs–OH to be completely coated onto every strand of the brush. When used, the other end of the pipette tip was fitted to a motor to rotate the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor (Fig. 1D).

2.4. Extraction and desorption procedures of ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor

To extract carbamate pesticides, first the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor was immersed into 1.0 mL of 3.0 μg mL^{-1} of a standard solution in a glass bottle. Then it was rotated at 1000 rpm for 20 min in which the target analytes were adsorbed on the sorbent. After extraction, the adsorbed carbofuran and carbaryl were desorbed using an appropriate volume of acetonitrile for 25 min. Then, the solution was evaporated to dryness under vacuum by a rotary evaporator before being re-dissolved in 0.20 mL of acetonitrile. Finally, 1.0 μL of the target analytes was injected into the GC–FID for analysis.

To obtain the highest extraction efficiency the effect of the type and volume of the desorption solvent, extraction and desorption time, and salting out effect were tested. The initial extraction/desorption conditions were 1.0 mL of 3.0 μg mL^{-1} of standard solution, 30 min for the extraction/desorption time with a fixed rotating speed of 1000 rpm and 2.0 mL of acetonitrile as the desorption solvent. The optimization was done by varying one parameter at a time and keeping other parameters constant (three replications were performed for each test). The conditions that provided the highest peak area or recovery with the shortest analysis time was selected and used to optimize the next parameter.

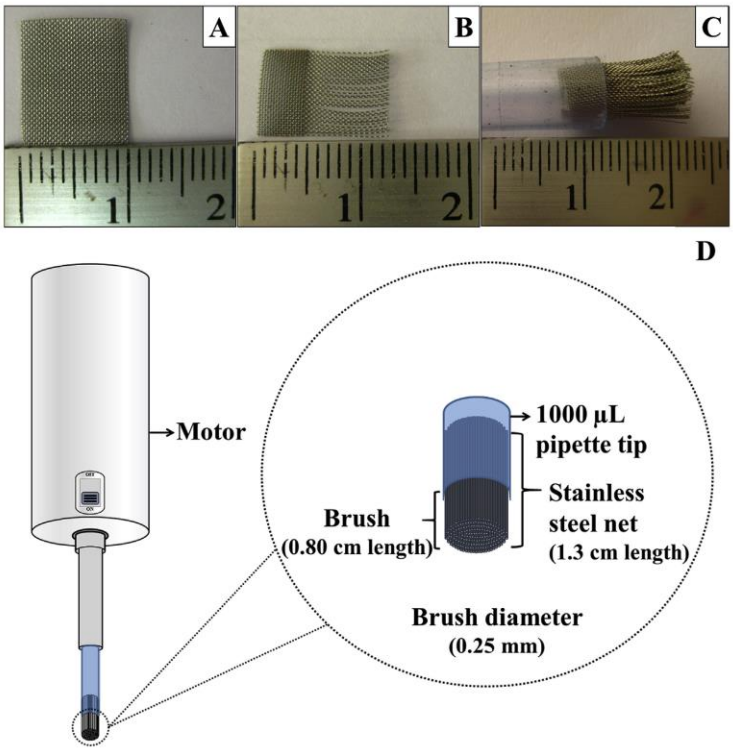


Fig. 1. Pictures showing (A) a stainless steel net, (B) a single brush after the vertical wires were removed, (C) ten pieces of the stainless steel brushes rolled together and fitted into a precut 1000 μL pipette tip to form a microextractor and (D) schematic of the microextractor connected to a rotating motor to form a ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor device.

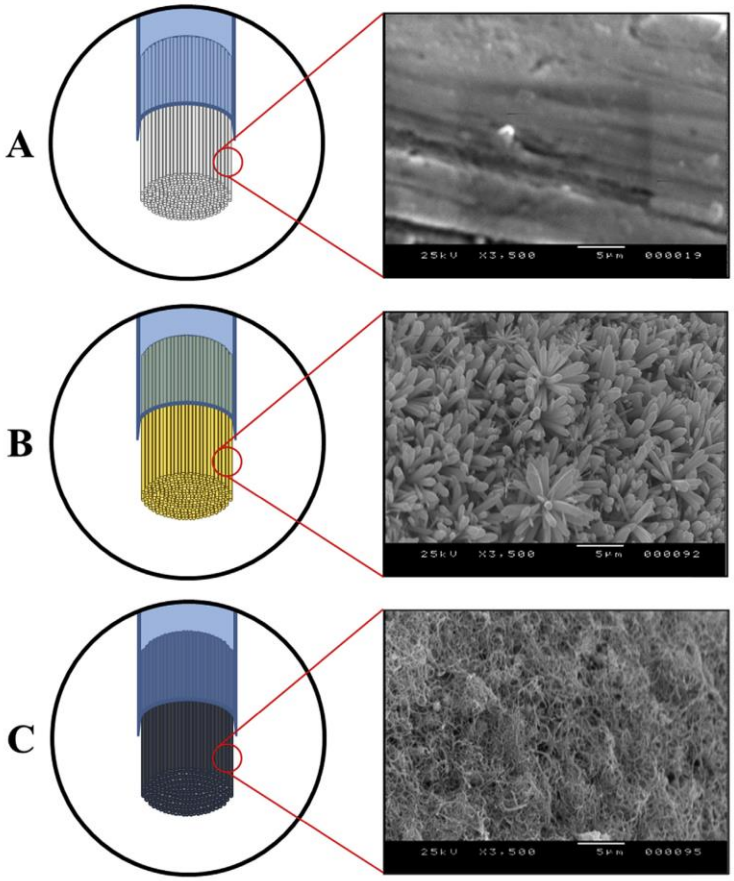


Fig. 2. SEM images from (A) a bare stainless steel brush, (B) a ZnO nanostructure coated stainless steel brush and (C) a MWCNTs–OH covered ZnO nanostructure coated stainless steel brush.

2.5. Real samples analysis

Three types of fruit (water melon, orange and apple) and six types of vegetable (tomato, cucumber, cabbage, lettuce, yard long bean and morning glory) were purchased from a wet market in Hat Yai, Songkhla, Thailand. 200 g of each cut-up sample and 200 mL of ultrapure water were mixed in a blender for 3 min, centrifuged at 2000 rpm for 15 min and then 150 mL of the clear supernatant was filtered through a Whatman GF/F filter paper (0.25 μm pore size; Maidstone, England). 1.0 mL of the filtered sample was used with the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor under optimal conditions (3 replications) followed by analysis by GC–FID.

3. Results and discussion

3.1. GC–FID conditions

Carbofuran and carbaryl selected as model compounds in this study were separated and quantified using a GC–FID. A 1.0 μL of the 3.0 μg mL^{-1} mixed carbofuran and carbaryl standard solution was injected to the GC–FID for the optimization of the operational parameters. The optimal flow rates of the carrier (He), make up (N_2), fuel (H_2) and oxidant (air) gases were 1.4, 30, 30 and 300 mL min^{-1}, respectively. The oven program temperature was set at an initial temperature of 70 °C for 0.50 min, then ramped up at 25 °C min^{-1} to 210 °C and held for 3 min. The injector and detector temperatures were 290 °C and 280 °C, respectively. The chromatogram at these optimum conditions showed that carbofuran ($t_R = 3.6$ min) and carbaryl ($t_R = 4.8$ min) were well separated with sharp peaks and good peak resolutions.

3.2. Characterization of ZnO/MWCNTs–OH on the stainless steel stir-brush microextractor

The morphology of ZnO/MWCNTs–OH on the stainless steel stir-brush microextractor was observed using a scanning electron microscope (SEM). SEM images of the three types of stainless steel stir-brush microextractor (bare, ZnO coated and ZnO/MWCNTs–OH coated) are shown in Fig. 2. In the case of the bare brush, a smooth surface was observed (Fig. 2A). The ZnO nanostructure was synthesized by a hydrothermal method in NaOH at an elevated temperature. After coating with ZnO nanostructure, homogenous

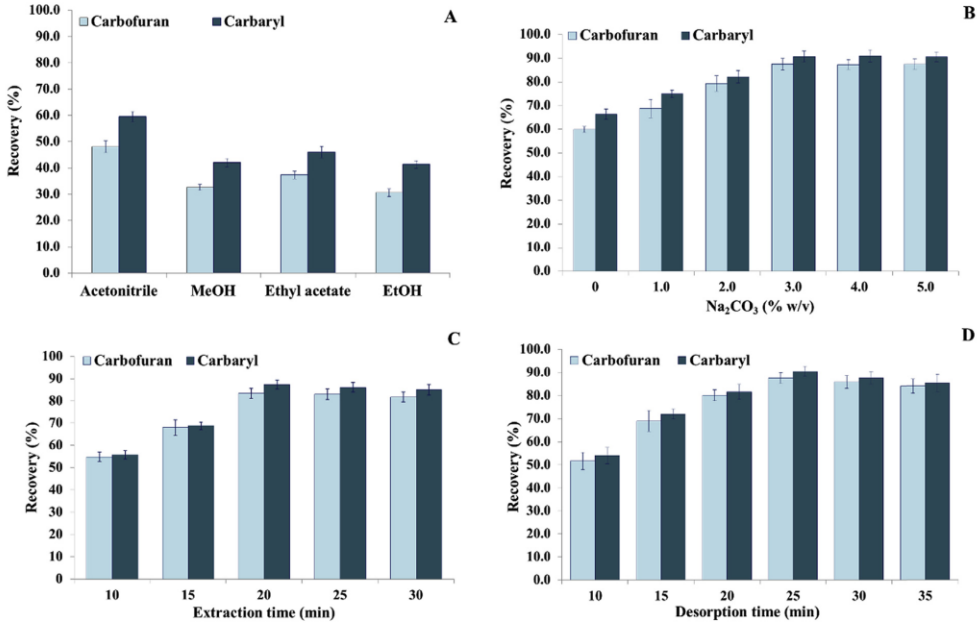


Fig. 3. The effect of (A) types of desorption solvent, (B) salting out effect, (C) the extraction time and (D) the desorption time on the extraction recoveries of 3.0 μg mL^{-1} of the carbofuran and carbaryl.

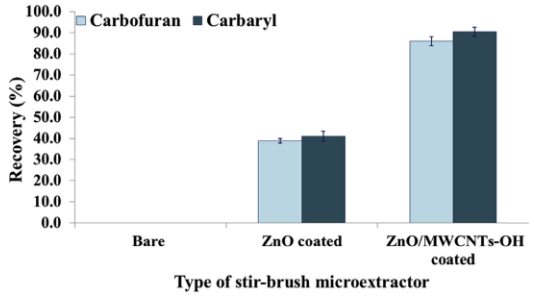


Fig. 4. Extraction recoveries of bare, ZnO coated and ZnO/MWCNTs–OH coated stainless steel stir-brushes for the extraction of a 3.0 μg mL^{-1} of carbofuran and carbaryl standard solution under optimal conditions.

distributions of flower-like nanostructures are easily observed at 1.5 M NaOH for the reaction time at 180 min (Fig. 2B). With the ZnO/MWCNTs–OH coating the wires turned black and the fiber-like structure of the MWCNTs–OH could be seen covering the ZnO (Fig. 2C). From these SEM images, the surface area of the stainless steel brushes was vastly increased after the coating with ZnO and the MWCNTs–OH. It was expected that this would help to increase the extraction efficiency.

3.3. Optimization of the microextractor conditions

3.3.1. Type of desorption solvent

An appropriate desorption solvent must be able to completely elute carbofuran and carbaryl from the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor. Acetonitrile, ethyl acetate, ethanol and methanol were tested because of their similar polarities compared with carbofuran and carbaryl. The highest recoveries were obtained from acetonitrile (48% for carbofuran and 60% for carbaryl), while methanol, ethanol and ethyl acetate provided about a 10% lower recovery (Fig. 3A). This was possibly because the MWCNTs–OH had a high affinity for carbofuran and carbaryl *via* a π–π interaction and hydrogen bonding, therefore, the analytes could not be easily desorbed using a slightly polar desorption solvent (ethanol and ethyl acetate). Although, the recoveries using acetonitrile were still low it was expected that with the optimization of the other parameters an acceptable recovery would be achieved.

3.3.2. Salting out effect

Salt was added into the sample to adjust the ionic strength of the solution and to decrease the analytes solubility in water, and thus, increase the partition of analytes into the sorbent. Na_2CO_3 was added to the sample instead of the commonly used NaCl because it has a higher ionic strength, thus, should be more effective [34,35]. The added Na_2CO_3 was tested between 0 and 5.0% w/v. Recoveries of both pesticides increased with the concentration of Na_2CO_3 from 0 to 3.0% w/v (carbofuran from 59.9 ± 1.3% to 87.5 ± 2.5% and carbaryl from 66.4 ± 2.1% to 90.7 ± 2.3% (Fig. 3B)), and then remained constant at higher concentrations. Therefore, 3.0% w/v of Na_2CO_3 was used in the next experiments.

3.3.3. Extraction time

One of the most important parameters that affects the extraction efficiency of a microextractor is the extraction time and it was studied in the range of 10–30 min at an interval of 5 min. At 20 min the recoveries reached their maximum level (82.4 ± 2.8% and 84.3 ± 1.8% for carbofuran and carbaryl, respectively (Fig. 3C)).

Table 1
% Recovery of carbofuran and carbaryl from spiked standard solution in real samples.

Sample	Carbofuran			Carbaryl		
	Detected concentration (μg mL ^{1})	Spiked concentration (μg mL ^{1})	% Recovery	Detected concentration (μg mL ^{1})	Spiked concentration (μg mL ^{1})	% Recovery
Water melon	ND[a]	0.10	99.5 ± 6.4	ND[a]	0.10	86.4 ± 4.1
		0.25	93.9 ± 6.0		0.25	101.7 ± 7.4
		0.50	104.7 ± 5.1		0.50	103.7 ± 4.4
		1.0	99.2 ± 3.1		1.0	99.1 ± 4.8
Apple	ND[a]	0.10	86.2 ± 6.6	ND[a]	0.10	98.1 ± 3.2
		0.25	99.5 ± 3.4		0.25	101.2 ± 5.9
		0.50	105.4 ± 6.3		0.50	99.9 ± 5.6
		1.0	98.8 ± 5.2		1.0	101.0 ± 4.0
Orange	ND[a]	0.10	83.3 ± 4.8	ND[a]	0.10	85.2 ± 5.4
		0.25	84.5 ± 7.8		0.25	95.7 ± 8.6
		0.50	89.7 ± 5.6		0.50	97.1 ± 9.2
		1.0	88.1 ± 5.8		1.0	98.5 ± 5.2
Tomato	ND[a]	0.10	100.7 ± 6.3	ND[a]	0.10	91.6 ± 4.0
		0.25	104.0 ± 7.3		0.25	102.3 ± 6.6
		0.50	96.6 ± 7.3		0.50	109.3 ± 5.0
		1.0	106.6 ± 6.4		1.0	99.6 ± 5.4
Cucumber	0.0183 ± 0.0018[b]	0.10	87.8 ± 5.7	ND[a]	0.10	106.5 ± 5.9
		0.25	85.4 ± 4.4		0.25	107.6 ± 5.2
		0.50	88.5 ± 6.7		0.50	90.1 ± 9.6
		1.0	83.1 ± 6.2		1.0	101.8 ± 5.2
Cabbage	ND[a]	0.10	103.0 ± 6.9	ND[a]	0.10	111.8 ± 5.7
		0.25	93.3 ± 6.6		0.25	104.3 ± 4.8
		0.50	102.7 ± 3.8		0.50	92.5 ± 4.9
		1.0	94.5 ± 3.3		1.0	101.5 ± 4.4
Lettuce	ND[a]	0.10	78.5 ± 5.3	ND[a]	0.10	83.76 ± 3.3
		0.25	73.7 ± 7.8		0.25	98.0 ± 6.0
		0.50	108.4 ± 2.6		0.50	87.4 ± 3.3
		1.0	98.2 ± 5.5		1.0	98.4 ± 4.0
Yard longbean	ND[a]	0.10	107.1 ± 3.7	0.0140 ± 0.0012[b]	0.10	90.6 ± 4.0
		0.25	94.0 ± 6.0		0.25	75.7 ± 7.5
		0.50	104.7 ± 5.1		0.50	103.7 ± 1.4
		1.0	99.2 ± 3.1		1.0	99.1 ± 4.8
Morning glory	ND[a]	0.10	86.3 ± 3.5	ND[a]	0.10	84.9 ± 5.6
		0.25	93.3 ± 6.5		0.25	93.3 ± 5.5
		0.50	107.3 ± 5.1		0.50	106.0 ± 5.7
		1.0	98.2 ± 6.1		1.0	98.7 ± 5.8

N.D.[a] is non-detectable (<LOD); [b]detectable; not determined (>LOD, <LOQ).

Hence an extraction time of 20 min was adopted.

3.3.4. Desorption time

To minimize the time of the extraction process, the desorption time was tested from 10 to 35 min. The recovery of carbofuran increased from 51.6 ± 3.7% to 87.5 ± 2.5% and carbaryl increased from 54.0 ± 3.5% to 90.4 ± 2.2% that of when the desorption time was increased from 10 to 25 min and they remained constant afterwards (Fig. 3D). The desorption time of 25 min therefore appeared to be sufficient for the desorption of both analytes.

3.3.5. Volume of desorption solvent

To use the least volume of desorption solvent, 1.00 to 2.25 of mL of acetonitrile were investigated. The extraction recoveries increased with the desorption solvent volume from 1.00 to 2.00 mL, from 51.6 ± 3.7% to 87.5 ± 2.5% for carbofuran and from 54.0 ± 3.5% to 90.4 ± 2.2% for carbaryl, and remained constant with larger volumes. Thus, 2.0 mL of acetonitrile was sufficient to elute carbofuran and carbaryl from the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor.

In summary, the optimum extraction conditions of the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor were 3.0% w/v Na_2CO_3 and an extraction time of 20 min, while the optimum desorption conditions were 2.0 mL of acetonitrile and 25 min desorption time.

3.4. Extraction efficiency of the coated and the uncoated stainless steel stir-brush

The efficiency of the ZnO/MWCNTs–OH coated microextractor, the ZnO coated and the bare stainless steel stir-brush were compared for the extraction of 3.0 μg mL ^{1} mixed standard solutions of carbofuran and carbaryl. As expected, the ZnO/MWCNTs–OH coated stainless steel brush microextractor gave high extraction recoveries of 86.0 ± 3.1% for carbofuran and 90.5 ± 3.2% for carbaryl (Fig. 4) because MWCNTS–OH can adsorb analytes by π–π interactions and hydrogen bonding. On the other hand the bare stainless steel brush did not extract either of the analytes because there was no strong interaction between the target analytes and the stainless steel. The ZnO coated brush can extract about 40% of both pesticides, possibly because ZnO interacted with the carbofuran and carbaryl by hydrogen bonding. This result indicated that the increase of the surface area using ZnO with a flower-like nanostructure coated with MWCNTs–OH as a nanomaterial sorbent in the developed microextractor certainly improved the extraction efficiency of carbofuran and carbaryl.

3.5. Analytical performances

3.5.1. The linear dynamic range (LDR), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The linear dynamic range of the method was evaluated by

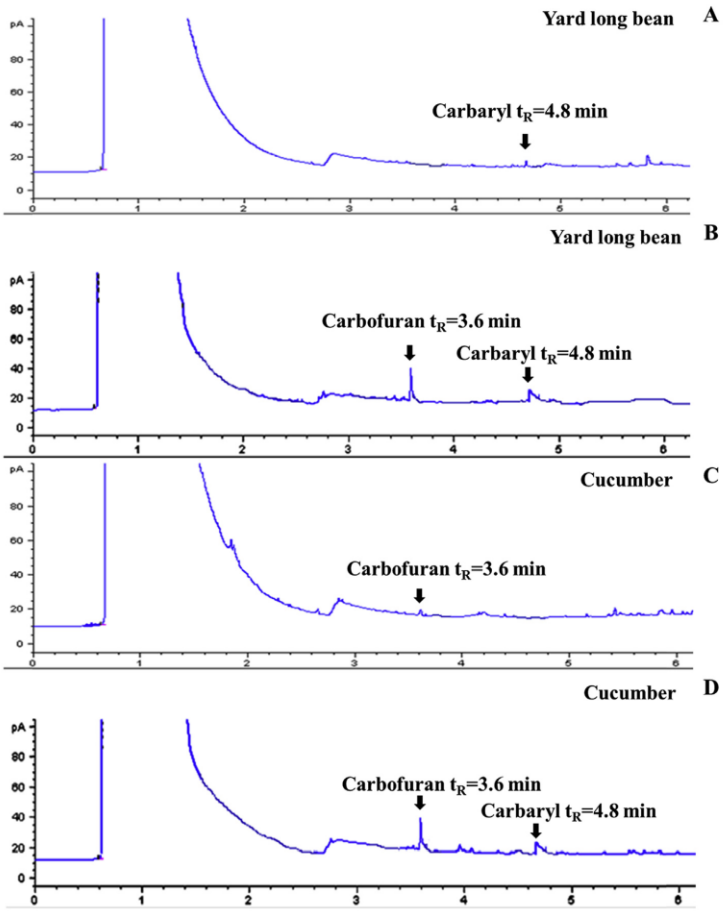


Fig. 5. Chromatograms of samples (A and C) and spiked samples with 0.25 μg $mL^{-1}$of carbofuran and carbaryl standard solution (B and D).

spiking standard solutions of the analytes in ultrapure water then extracting them using the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor. For carbofuran, a linearity was observed from 0.025 to 5.0 μg mL^{-1} with the linear equation of $y = [(151 \pm 18)x + (3.9 \pm 1.7)] \times 10^3$ ($R^2 = 0.9992$), and for carbaryl from 0.050 to 5.0 μg mL^{-1} with the linear equation of $y = [(203 \pm 28)x + (0.284 \pm 0.036)] \times 10^3$ ($R^2 = 0.9964$).

LODs and LOQs were calculated using the IUPAC recommendation of $3S_B/m$ and $10S_B/m$, respectively (where S_B was the standard deviation of 20 blank responses; m was the slope of the calibration curve). The LODs were 17.5 ± 2.0 ng mL^{-1} and 13.0 ± 1.8 ng mL^{-1}, and the LOQs were 58.3 ± 6.0 ng mL^{-1} and 43.3 ± 6.0 ng mL^{-1} for carbofuran and carbaryl, respectively. When these LODs were converted to ng g^{-1} by considering the mass of the real sample (200 g), the values of 8.75 ng g^{-1} and 6.50 ng g^{-1} were obtained and they were much lower than the MRL values of 20 ng g^{-1} and 50 ng g^{-1} for carbofuran and carbaryl, respectively [36]. Thus, these values were sufficient for the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor to be applied for the analysis of carbofuran and carbaryl in fruit and vegetable samples.

3.5.2. Reproducibility

The reproducibility of six ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractors prepared under the same procedure was investigated. The recoveries from the six stir-brush microextractors for the extraction of 3.0 μg mL^{-1} mixed standard solution of carbofuran and carbaryl were 89.0 ± 3.6% (RSD = 4.1%) and 91.5 ± 5.1% (RSD = 5.6%), respectively. Therefore the preparation of the developed microextractor can be reproduced with a better %RSDs than the acceptable value of 11% recommended by the AOAC (at the concentration of 10.0 μg mL^{-1}) [37].

3.5.3. Reusability

To evaluate the number of times the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor can be reused, the microextractors were used to sequentially extract the mixed analytes (3.0 μg mL^{-1}). A microextractor was cleaned with 2.0 mL of acetonitrile for 5 min before each extraction cycle. The obtained %response, compared to the first used, gradually decreased for all three microextractors. After 8 cycles, black precipitates of the MWCNTs–OH sorbent in the extracted solution were observed by the naked eyes and the %

Table 2
Comparison of this new method with other methods for the analysis of carbofuran and carbaryl.

No.	Method	LOD (ng mL $^{-1}$)	Extraction time (min)	Sample volume (mL)	Enrichment factor	% Recovery	Reference
I	SPME (LC–MS)	1–10	90	10	–	–	[48]
II	SPE (GC–MS)	0.0031–0.0088	164	1000	–	80–108	[49]
III	SPME (GC–MS)	2.5	30	5.0	–	77–89	[47]
IV	SPE (GC–ECD, NPD)	0.0749	173	500	–	60–120	[50]
V	MSPE (HPLC–DAD)	0.040	15	200	720	90–97	[51]
VI	μ-SPE (HPLC–UV)	0.050	90	4.0	–	72–91	[52]
VII	HF-SPME (HPLC–DAD)	0.022–0.66	60	9.0	50–114	95–113	[53]
VIII	DLLME (HPLC–DAD)	20–60	3	5.0	–	78–98	[54]
IX	LLE-SPE (GC–FID)	140–210	23	1.75	–	78–102	[55]
X	Pipette-tip (GC–FID)	6.4–9.17	17.5	1.0	–	75–119	[6]
XI	Stir-brush (GC–FID)	13.0–17.5	20	1.0	5	74–112	This work

GC = gas chromatography; HPLC = high performance liquid chromatography; FID = flame ionization detector; MS = mass spectrometry; DAD = diode array detector; LC = liquid chromatography; NPD = nitrogen phosphorus detector; SPE = solid phase extraction; SPME = solid phase microextraction; MSPE = magnetic solid phase extraction; DLLME = dispersive liquid liquid microextraction; μ-SPE = micro solid phase extraction; HF = hollow fiber.

response also decreased to be less than 90%. The average responses of the three extractors within these 8 cycles were 95.1 ± 4.9% to 98.5 ± 7.6% (RSD < 8.0%) for carbofuran and 96.0 ± 5.5% to 101.5 ± 6.4% (RSD < 9.0%) for carbaryl. Thus, one ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor can be reused up to 8 times. This would be the advantage of the developed stir-brush microextractor over the traditional SPE or μ-SPE since most of the sorbents used for these extraction techniques normally cannot be reused [38–40].

3.5.4. Precision

The precision, in terms of the relative standard deviations (RSDs), was also evaluated by performing five extraction replicates for each of the four spiked pesticides concentrations (0.10, 0.25, 0.50, and 1.0 μg mL $^{-1}$). The RSDs were 5.7–9.2% and 5.2–9.5% at all concentrations of carbofuran and carbaryl, respectively. These values are better than the ones recommended by the AOAC (7.3% RSDs at 10 μg mL $^{-1}$ and 11% RSDs at 1.0 μg mL $^{-1}$) and indicated that this preparation method was reliable for the analysis of carbofuran and carbaryl in fruit and vegetable samples.

3.5.5. Real samples analysis

Prior to the analysis of real samples, the effect of the sample matrix was first evaluated using three types of fruit and six types of vegetable (Table 1). The matrix matched calibration curves were prepared by spiking filtered samples with the standard solution of carbofuran and carbaryl to obtain the final concentrations of 0.10, 0.25, 0.50 and 1.0 μg mL $^{-1}$ (3 replications for each concentration). For the standard curve, standard solutions were prepared in ultrapure water. Both sets were extracted using the ZnO/MWCNTs–OH stir-brush microextractor. The slopes of the matrix matched calibration curve and the standard calibration curve were statistically compared by two-way ANOVA (analysis of variance). The slopes of the matrix matched and the standard calibration curves were shown to be significantly different ($P < 0.05$). This indicated that the matrix from the fruit and vegetable samples could interfere with the analysis. Therefore, the matrix matched calibration curves were used to quantify the concentration of carbofuran and carbaryl in the fruit and vegetable samples.

From the 9 samples, carbofuran was detected in the cucumber at 0.0183 ± 0.0018 μg mL $^{-1}$ and carbaryl was only found in the yard long bean at 0.0140 ± 0.0012 μg mL $^{-1}$ (Table 1). When these values were converted to ng g $^{-1}$, 9.24 ± 0.93 ng g $^{-1}$ for carbofuran and 7.05 ± 0.61 ng g $^{-1}$ for carbaryl were obtained. The contamination of the pesticides may be because carbofuran had been accumulated in the soil during its use to prevent the seeds from insect attacks and then consumed by the cucumber [41,42]. In the case of the yard long bean, the residue may be due to the spraying of carbaryl to prevent an attack by insects [43,44]. The detected concentrations in these two samples were lower than that of the works reported by others (Table S1, Supplementary data). For example, Vichapong and co-workers found the contamination in the concentration range of 10 – (5.3×10^5) ng g $^{-1}$ for carbofuran and 80 – (1.6×10^5) ng g $^{-1}$ for carbaryl in fruit and vegetables [45,46]. Menezes Filho and co-workers reported the contamination of carbofuran in mangoes at the concentration of (54.04–93.36) × 10^3 ng g $^{-1}$ [47].

The chromatograms of sample and spiked sample from yard long bean and cucumber were shown in Fig. 5A–D, respectively. The detected levels of both pesticides were still lower than the maximum residue levels (MRLs) set by the European Union (MRL of 20.0 ng g $^{-1}$ for carbofuran and 50.0 ng g $^{-1}$ for carbaryl) [36]. However, these compounds may accumulate in the human body after long-term consumption, and cause chronic effects on human health. Therefore, careful cleaning of all fruits and vegetables before consumption is strongly recommended.

Further validation of the method by the recoveries from the spiked real samples produced values in the range of 73.7 ± 7.8% to 108.4 ± 2.6% for carbofuran and 75.7 ± 10% to 111.8 ± 5.7% for carbaryl (Table 1). These values were within the acceptable range as recommended by the AOAC (70–120% recoveries at analyte concentration levels of ppb and low ppm levels) [37].

4. Conclusions

A novel miniaturized microextractor was successfully prepared using ZnO/MWCNTs–OH coated onto a stainless steel brush. This microextractor provided good-stir-brush-to-stir-brush reproducibility with a relative standard deviation less than 6.0% and can be reused for the extraction of carbamate pesticides up to 8 times. It was applied to extract carbofuran and carbaryl from the fruit and vegetable samples. The recoveries were acceptable according to the recommended levels by the AOAC and indicated good accuracy for both compounds.

Comparing to other methods (Table 2), the method presented in this work showed a similar recovery range, used the smallest volume of samples (only 1.0 mL), and required only a short extraction time (20 min). However, the LOD of the developed method was higher than that of the other methods, this is possibly due to the FID detector being less sensitive and selective than the ECD, NPD and MS (methods no. II to IV). But when compared with the method that used FID detector, the analytical performances of the developed method are almost the same with those of methods no. IX and X. In fact, the developed stir-brush microextractor even provided better LOD compared to method no. IX. In addition, the other methods used a much larger volume of sample (200–1000 mL)

(method no. II, IV, V), which resulted in a requirement for a high enrichment factor and a low limit of detection. Nevertheless, the obtained LODs of the developed method for carbofuran and carbaryl were lower than the recommended maximum residue levels (MRL) recommended by the European Union. Hence, these LODs were sufficient and the developed method can be used as a routine analytical method for detecting carbofuran and carbaryl in real samples.

Acknowledgments

This project was supported by the Government Budget (or budget revenue) of Prince of Songkla University (SCI580057S); Prince of Songkla University Ph.D. Scholarship; the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC); Trace Analysis and Biosensor Research Center (TAB-RC); Department of Chemistry, Faculty of Science and Graduate School, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand. The authors also would like to thank Dr. Brian Hodgson for his assistance with the English.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.040.

References

[1] Y. Wang, S. Gao, X. Zang, J. Li, J. Ma, Graphene-based solid-phase extraction combined with flame atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of trace amounts of lead in environmental water and vegetable samples, Anal. Chim. Acta 716 (2012) 112–118.
[2] A.M. Rodrigues, V. Ferreira, V.V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel, Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1150 (2007) 267–278.
[3] L.E. Vera-Avila, B.P. Marquez-Lira, M. Villanueva, R. Covarrubias, G. Zelada, V. Thibert, Determination of carbofuran in surface water and biological tissue by sol-gel immunoaffinity extraction and on-line preconcentration/HPLC/UV analysis, Talanta 88 (2012) 553–560.
[4] X. Wang, J. Cheng, H. Zhou, X. Wang, M. Cheng, Development of a simple combining apparatus to perform a magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and its application for the analysis of carbamate and organophosphorus pesticides in tea drinks, Anal. Chim. Acta 787 (2013) 71–77.
[5] J. Wang, L. Tuduri, M. Millet, O. Briand, M. Montury, Flexibility of solid-phase microextraction for passive sampling of atmospheric pesticides, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3031–3037.
[6] K. Charoenpornpukdee, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, Novel pipette-tip graphene/poly (vinyl alcohol) cryogel composite extractor for the analysis of carbofuran and carbaryl in water, J. Environ. Sci. Health. B 49 (2014) 713–721.
[7] N. Sun, Y. Han, H. Yan, Y. Song, A self-assembly pipette tip graphene solid-phase extraction coupled with liquid chromatography for the determination of three sulfonamides in environmental water, Anal. Chim. Acta 810 (2014) 25–31.
[8] Z. Wang, R. Sun, Y. Wang, N. Li, L. Lei, X. Yang, A. Yu, F. Qiu, H. Zhang, Determination of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by silica-supported ionic liquid-based matrix solid phase dispersion extraction high performance liquid chromatography-diode array detection, J. Chromatogr. B 969 (2014) 205–212.
[9] E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, Magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the dispersive micro solid phase extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, J. Chromatogr. A 1345 (2014) 43–49.
[10] T. Pelden, C. Thammaknet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, Tea bag filter paper as a novel protective membrane for micro-solid phase extraction of butachlor in aqueous samples, J. Environ. Sci. Health. B 49 (2014) 480–490.
[11] A. Iparraguirre, P. Navarro, R. Rodil, A. Prieto, M. Olivares, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Matrix effect during the membrane-assisted solvent extractioncoupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in wastewater, J. Chromatogr. A 1356 (2014) 163–170.
[12] F. Makkliang, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, C. Thammakhet, Development of magnetic micro-solid phase extraction for analysis of phthalate esters in packaged food, Food Chem. 166 (2015) 275–282.
[13] C. Aftafa, F.O. Pelit, E.E. Yalcinkaya, H. Turkmen, I. Kapdan, F. Nil Ertas, Ionic liquid intercalated clay sorbents for micro solid phase extraction of steroid hormones from water samples with analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1361 (2014) 43–52.
[14] L. Guo, H.K. Lee, Vortex-assisted micro-solid-phase extraction followed by low-density solvent based dispersive liquid–liquid microextraction for the fast and efficient determination of phthalate esters in river water samples, J. Chromatogr. A 1300 (2013) 24–30.
[15] J. Meng, J. Bu, C. Deng, X. Zhang, Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography–mass spectrometry analysis, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1585–1591.
[16] R. Alizadeh, N.M. Najafi, S. Kharrazi, A new solid phase micro extraction for simultaneous head space extraction of ultra traces of polar and non-polar compounds, Anal. Chim. Acta 689 (2011) 117–121.
[17] X. Gan, X. Li, X. Gao, W. Yu, Investigation on chemical etching process of ZnO nanorods toward nanotubes, J. Alloy. Compd. 481 (2009) 397–401.
[18] J. Ji, H. Liu, J. Chen, J. Zeng, J. Huang, L. Gao, Y. Wang, X. Chen, ZnO nanorod coating for solid phase microextraction and its applications for the analysis of aldehydes in instant noodle samples, J. Chromatogr. A 1246 (2012) 22–27.
[19] E. Ghasemi, M. Sillanpää, Optimization of head space solid phase microextraction based on nano-structured ZnO combined with gas chromatography–mass spectrometry for preconcentration and determination of ultra-traces of chlorobenzenes in environmental samples, Talanta 130 (2014) 322–327.
[20] A.P. Duarte, E.A. de Campos, R. Schneider, S.D. de Campos, S.M. Cottica, W.A.J. Favreto, ZnO-coated glass fibers for the analysis of trihalomethanes by headspace-solid phase microextraction-gas chromatography, Talanta 83 (2010) 549–552.
[21] J. Zeng, C. Zhao, F. Chong, Y. Cao, F. Subhan, Q. Wang, J. Yu, M. Zhang, L. Luo, W. Ren, X. Chen, Z. Yan, Oriented ZnO nanorods grown on a porous polyaniline film as a novel coating for solid-phase microextraction, J. Chromatogr. A 1319 (2013) 21–26.
[22] R. Alizadeh, Chlorophenol's ultra-trace analysis in environmental samples by chitosan–zinc oxide nano rod composite as a novel coating for solid phase micro-extraction combined with high performance liquid chromatography, Talanta 146 (2016) 831–838.
[23] H. Amanzadeh, Y. Yamini, M. Moradi, Zinc oxide/polypyrrole nanocomposite as a novel solid phase microextraction coating for extraction of aliphatic hydrocarbons from water and soil samples, Anal. Chim. Acta (2015) 52–60.
[24] S. Zhang, Z. Du, G. Li, Graphene-supported zinc oxide solid-phase microextraction coating with enhanced selectivity and sensitivity for the determination of sulfur volatiles in Allium species, J. Chromatogr. A 1260 (2012) 1–8.
[25] O. Sae-Khow, S. Mitra, Carbon nanotubes as the sorbent for integrating micro-solid phase extraction within the needle of a syringe, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2270–2274.
[26] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena, Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes, TrAC – Trends Anal. Chem. 27 (2008) 34–43.
[27] P. Yu, H. Ma, Y. Shang, J. Wu, S. Shen, Polyethylene glycol modified magnetic carbon nanotubes as nanosorbents for the determination of methylprednisolone in rat plasma by high performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1348 (2014) 27–33.
[28] H.F. Zhang, Y.P. Shi, Preparation of Fe_3O_4 nanoparticle enclosure hydroxylated multi-walled carbon nanotubes for the determination of aconitines in human serum samples, Anal. Chim. Acta 724 (2012) 54–60.
[29] X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of phenols in aqueous samples, J. Chromatogr. A 1165 (2007) 10–17.
[30] Department of Agriculture, Ministry of Agriculture, Thailiand, Statistics Hazard Detail, 2012, pp. 1–23.
[31] S. Wanwimolruk, O. Kanchanamayoon, K. Phopin, V. Prachayasittikul, Food safety in Thailand 2: pesticide residues found in Chinese kale (Brassica oleracea), a commonly consumed in Asian countries, Sci. Total Environ. 532 (2015) 447–455.
[32] M. Alamgir Zaman Chowdhury, A.N.M. Fakhruddin, Md. Nazrul Islam, Mohammed Moniruzzaman, Siew Hua Gan, Md. Khorshed Alam, Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography mass spectrometry, Food Control. 34 (2013) 457–465.
[33] A. Khorsand Zak, W.H. Majid, H.Z. Wang, R. Yousefi, A. Moradi Golsheikh, Z.F. Ren, Sonochemical synthesis of hierarchical ZnO nanostructures, Ultrason. Sonochem. 20 (2013) 395–400.
[34] S. Sungkaew, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, A new polyethylene glycol fiber prepared by coating porous zinc electrodeposited onto silver for solid-phase microextraction of styrene, Anal. Chim. Acta 664 (2010) 49–55.
[35] E.S. Emidio, M. Prata Vde, H.S. Dorea, Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 670 (2010) 63–71.
[36] E.F.S. Authority, The 2009 European union report on pesticide residues in food, EFSA J. 11 (2011) 2430–2959.
[37] AOAC, Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), 2002, pp. 1–38.
[38] J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, Considerations on ultra trace analysis of

carbamates in water samples, J. Chromatogr. A 996 (2003) 133–140.
[39] L.L. ElAtrache, R.B. Sghaie, B.B. Kefi, V. Haldys, M. Dachraoui, J. Tortajada, Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamates pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry determination, Talanta 117 (2013) 392–398.
[40] S. Lissalde, N. Mazzella, V. Fauvelle, F. Delmas, P. Mazellier, B. Legube, Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for thirty-three pesticides in natural water and comparison of performance between classical solid phase extraction and passive sampling approaches, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1492–1502.
[41] U.S. EPA, Interim Reregistration, Eligibility Decision (IRED) Document for Carbofuran, Case No. 0101, US EPA Archive Document, 2006, pp. 1–38.
[42] U.S. EPA, US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Reregistration Eligibility Decision for Carbofuran, US EPA Archive Document, 2007, pp. 1–38.
[43] U.S. EPA, US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Carbaryl Ired Facts, US EPA Archive Document, 2004, pp. 1–6.
[44] U.S. EPA, Reregistration, Eligibility Decision (RED) for Carbaryl, Case No. 0080, US EPA Archive Document, 2007, pp. 1–43.
[45] J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, K. Grudpan, Room temperature imidazolium ionic liquid: A solvent for extraction of carbamates prior to liquid chromatographic analysis, Talanta 84 (2011) 1253–1258.
[46] J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, K. Grudpan, Sequential injection-bead injection-lab-on valve coupled to high-performance liquid chromatography for online renewable microsolid-phase extraction of carbamate residues in food and environmental samples, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1574–1581.
[47] A. Menezes Filho, F.N.D. Santos, P.A.D.P. Pereira, Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME-GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes, Talanta 81 (2010) 346–354.
[48] G. Sagratini, J. Manes, D. Giardina, P. Damiani, Y. Pico, Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1147 (2007) 135–143.
[49] M.L. Hladik, K.L. Smalling, K.M. Kuivila, A multi-residue method for the analysis of pesticides and pesticide degradates in water using HLB solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80 (2008) 139–144.
[50] M. Lyytikainen, J.V. Kukkonen, M.J. Lydy, Analysis of pesticides in water and sediment under different storage conditions using gas chromatography, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44 (2003) 437–444.
[51] C. Basheer, A.A. Alnedhary, B.S. Rao, H.K. Lee, Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 211–216.
[52] W. Song, Y. Zhang, G. Li, H. Chen, H. Wang, Q. Zhao, D. He, C. Zhao, L. Ding, A fast, simple and green method for the extraction of carbamate pesticides from rice by microwave assisted steam extraction coupled with solid phase extraction, Food Chem. 143 (2014) 192–198.
[53] Q. Wu, G. Zhao, C. Feng, C. Wang, Z. Wang, Preparation of a graphene-based magnetic nanocomposite for the extraction of carbamate pesticides from environmental water samples, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7936–7942.
[54] X. Lin, X. Chen, X. Huo, Z. Yu, K. Bi, Q. Li, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of N-methyl carbamate pesticides in vegetables, J. Sep. Sci. 34 (2011) 202–209.
[55] M.J. Santos Delgado, S. Rubio Barroso, G. Toledano Fernández-Tostado, L.M. Polo-Díez, Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen–phosphorus detection, J. Chromatogr. A 921 (2001) 287–296.

6.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ –

6.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป –

6.4 บทความวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ (Proceedings) -