รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2555

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล

กิจกรรม : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

กิจกรรมย่อย : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง captan และ folpet ในผลไม้

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Method Development and Validation for Pesticide Residue Analysis in Captan and Folpet

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

ผู้ร่วมงาน : นางสมสมัย ปาลกูล กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

: นายประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

: นายวิษณุ แจ้งใบ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

5. บทคัดย่อ

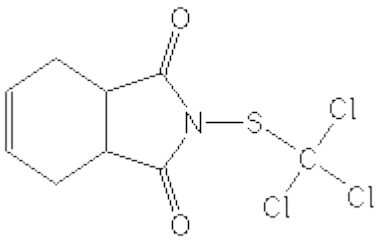
การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง captan และ folpet ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันและสลายตัวได้ง่ายที่ pH สูง (Base-Labile Compound) และอุณหภูมิสูง จำเป็นต้องทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง จากการทดลองพบว่าการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันช่วยลดการสลายตัวของสาร captan และ folpet และทำให้ตัวอย่างมีเนื้อตัวอย่างที่ละเอียดมากยิ่งขึ้นเหมาะแก่การนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี QuEChERS และเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติการใช้และไม่ใช้น้ำแข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นได้ศึกษาการเติม Analysis Protectants (APs) ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องพบว่า เมื่อใช้ APs กับตัวอย่างส่งผลให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ดีขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้นเดียวกันของ captan และ folpet พบว่าเมื่อละลายสารมาตรฐานในตัวทำละลายEtOAc ผสมAPs ส่งผลให้พื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้น 86 และ 81% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับเมื่อละลายสารมาตรฐานใน matrix โดยจากการทดลองพบว่า matrix effect มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณ captan และ folpet จึงสามารถใส่APsแทน matrixเพื่อสะดวกในการทดสอบงานที่ทำเป็นประจำ และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัด พบว่า %Recovery ของ การวิเคราะห์ปริมาณ captan และ folpet โดยวิธี Stienwandter (1985) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 81 และ 81 และวิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 83 และ 75 ตามลำดับ

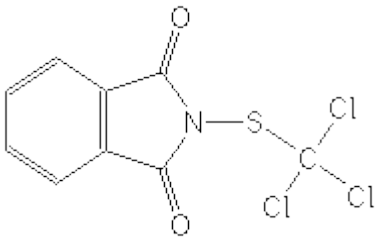
6. คำนำ

ปัจจุบันการส่งสินค้าเกษตรออกไปยังต่างประเทศโดยเฉพาะในสหภาพยุโรปจะมีการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักผลไม้ตามมาตรฐานด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช หรือ Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS) ซึ่งเป็นมาตรการที่กำหนดขึ้นเพื่อใช้ควบคุมสินค้าเกษตรและอาหาร ในกรณีถ้ากลุ่มประเทศนำเข้ามีการตรวจวัดสารชนิดนั้นๆ แต่ประเทศผู้ส่งออก ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สารชนิดนั้นได้ นำมาสู่การกีดกันทางการค้า จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างให้มีความถูกต้อง สะดวกรวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

captan เป็นสารกำจัดเชื้อรา dicarboximide ที่ให้ผลในทางป้องกัน รักษาและกำจัดโรคพืชให้หมดสิ้น พิษเฉียบพลันทางปาก (หนู) 9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางผิวหนัง มากกว่า 4,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใช้กำจัด โรคสแคป โรคเน่าดำ โรคเน่าสีน้ำตาล ในพืชพวก องุ่น แอสพารากัส ถั่วลันเตา ส่วน folpet เป็นสารกำจัดเชื้อรา phthalimide มีพิษเฉียบพลันทาปาก มากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางผิวหนัง มากกว่า 22,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ป้องกันโรคพืชประเภท โรคใบจุด โรคราแป้ง โรคสเคป โรคมีลาโนส ใช้ใน ส้ม พืชตระกูลแตง องุ่น พืชผักและไม้ผลทั่วไป (C D S Tomlin, 2006)

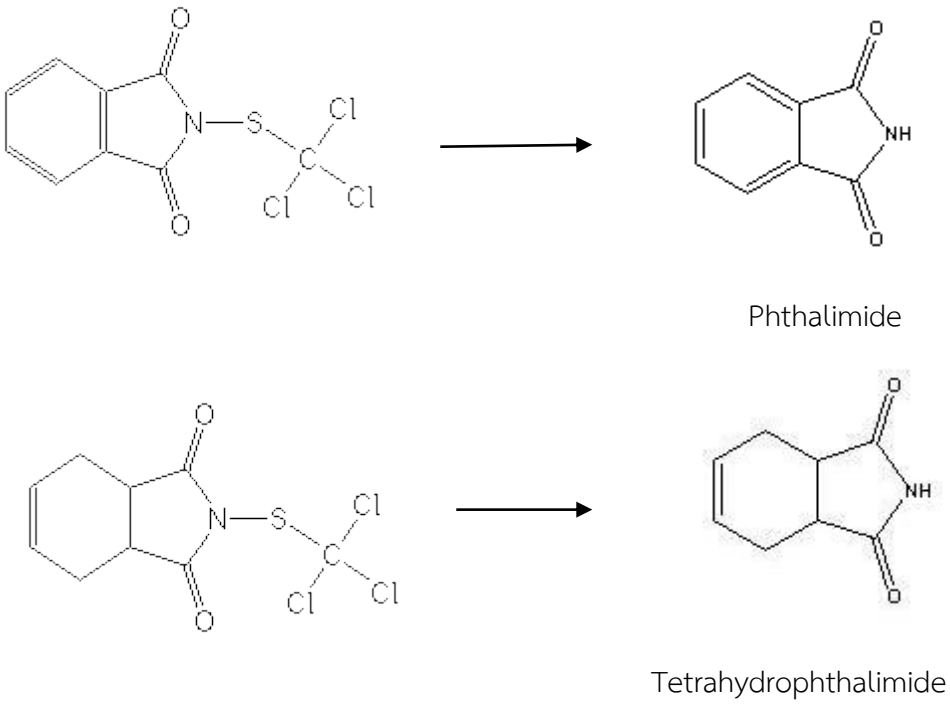
โดย captan และ folpet เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (Fungicide) เป็นสารประกอบมีโครงสร้างที่คล้ายกันและเป็นวัตถุอันตรายประเภทสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและ pH สูง (Base-labile pesticide) โดยสลายตัวให้สารชนิดอื่นดังภาพที่ 3 ซึ่งการสลายอาจเกิดในหลายขั้นตอนได้แก่ ขั้นการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนสุดท้ายของการสกัด ขั้นตอนการฉีดในlinerของGC (Anastassiades, 2003) ตัวอย่างการแก้ไข เช่น ในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดด้วยวิธี QuEChERS หลังการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA pH ของสารสกัดจะสูง แก้ไขโดยเติม Formic acid (5% in ACN) 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เพื่อปรับเป็นpH~5 จะช่วยลดการสลายตัวของสารได้ หรือใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อช่วยลดอุณหภูมิในขณะปั่นตัวอย่างให้ละเอียด (http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/basel abilecaptan.pdf)





ภาพที่ 1 captan ($C_9H_8Cl_3NO_2S$ **)**
(C D S Tomlin, 2006)

ภาพที่ 2 folpet ($C_9H_4Cl_3NO_2S$)
(C D S Tomlin, 2006)



ภาพที่ 3 การสลายตัวของ captan และ folpet

อีกวิธีที่ช่วยปรับปรุงผลการวิเคราะห์ของGC คือการเติม Analysis Protectants(APs) โดยทั่วไปการวิเคราะห์โดย GC มีปัจจัยที่ต้องพิจารณา ได้แก่ ปริมาตรที่ฉีด อุณหภูมิ การขยายตัวของสารละลาย อัตราการไหลของสาร ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะช่วยลดจำนวน active sites ในคอลัมน์ ทำให้โครมาโตรแกรมของสารมีลักษณะพีคสูงและแคบ ทำให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ส่วนผสมของ APs ที่นิยมใช้ได้แก่ sorbital (ช่วยป้องกันสารออกช้า), 3-ethoxy-1,2-propanediol (ป้องกันสารออกก่อน), D-(+) gluconic acid-δ-lactone (ป้องกันสารออกก่อนและออกเร็วเกิน), Shikimic acid (ป้องกันสารที่สลายตัวง่ายเหมาะกับ captan และ folpet) (http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/basel abilecaptan.pdf)

ผลจากการที่ captan และ folpet สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและpHสูง ทำให้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้จำเป็นต้องพัฒนาเพื่อหาวิธีที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการสลายตัว ซึ่งส่งผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ captan และ folpet โดยการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MSD ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีความถูกต้องสูง และพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ด้วยการลดการสลายตัวของสารโดยการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและใช้ Analysis Protectants(APs) ช่วยในขั้นตอนฉีดตัวอย่าง จึงทำให้สามารถวิเคราะห์captan และ folpet ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำดียิ่งขึ้น ป้องกันความผิดพลาดได้

7. วิธีดำเนินการ

7.1.สารเคมี

1.1 สารมาตรฐาน captan ความบริสุทธิ์ 98.5 %

1.2 สารมาตรฐาน folpet ความบริสุทธิ์ 98.5 %

1.3 acetone, A.R. grade

1.4 dichloromethane, A.R. grade

1.5 ethylacetate P.R. grade

1.6 acetronitrile P.R. grade

1.7 sodium sulfate anhydrous, A.R. grade เผาที่ 450 °C นาน 4 ชั่วโมงแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 130 °C ก่อนใช้งานตั้งทิ้งให้เย็นใน desiccator

1.8 sodium chloride, A.R. grade

1.9 $MgSO_4$ A.R. gradeเผาที่ 550 °C นาน 5 ชั่วโมงแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 130 °C ก่อนใช้งานตั้งทิ้งให้เย็นใน desiccator

1.10 PSA (primary secondary amine),

1.11 GCB (graphitized carbon)

1.12 trisodium citratedihydrate

1.13 disodium hydrogen citrate 1.5 hydrate

1.14 sorbital

1.15 3-ethoxy-1,2-propanediol

1.16 D-(+)gluconic acid-δ-lactone

1.17 shikimic acid

7.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 ขวดแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างพร้องฝาขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2 เครื่องชั่งชนิด 2 และ 4 ตำแหน่ง ที่ได้รับการสอบเทียบแล้ว

2.3 กรวยกรองทำด้วยแก้ว (funnel)

2.4 กระบอกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร (cylinder)

2.5 ขวดก้นแบน ขนาด 250 มิลลิลิตร (flat bottom flask)

2.6 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร (volumetric flask)

2.7 ขวดบรรจุตัวอย่างสำหรับฉีดเครื่อง GC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.8 Homogenizer, Ultra Turrax รุ่น T 25 Basic, ยี่ห้อ Ika Labortechnik

2.9 Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

2.10 Auto-pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร

2.11 เครื่องลดปริมาตร (Rotary Vacuum Evaporator), รุ่น V-800 ยี่ห้อ Buchi

2.12 เครื่อง GC/MS รุ่น 6890

2.13 Capillary column ชนิด DB 5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25ไมโครเมตร

7.3 วิธีการ การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง captan และ folpet ในตัวอย่างองุ่น

7.3.1. ศึกษาผลการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างโดยการ spike สารลงในตัวอย่างองุ่นเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนนำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง(อัตราส่วน1:1) (Richard et. Al, 2007) และไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง และวิเคราะห์ทางสถิติ Paired t-test (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2007)

7.3.2. ศึกษาผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธีคือวิธี Stienwandter(1985) และวิธี QuEChERS (Anastassiades,et al., 2003) ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทำได้โดย การ spike สารลงในตัวอย่างองุ่นเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมก่อนนำไปปั่นแล้วเปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธีคือวิธี Stienwandter(1985) และวิธี QuEChERS (Anastassiades,et al., 2003)วิธีละ 6 ซ้ำและการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) โดยการนำไปประเมิน HORRAT ใช้เกณฑ์ Horwitz’s ratio< 2 และ%RSD จากภาคผนวก 2

วิธีการที่ 1 ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Steinwandter (1985) ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในขวดแก้วสกัดด้วย acetone AR grade 50 มิลลิลิตร sodium chloride 8 กรัม และ dichloromethane AR grade 40 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วสูงนาน 1 นาที เทสารละลายลงในขวดที่มีฝาปิด และเติม sodium sulfate 1 ช้อนโต๊ะ คนให้เข้ากัน ปิดฝา ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองสารละลาย ผ่าน sodium sulfate 50 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรสารละลายโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator อุณหภูมิ water bath 40 องศาเซลเซียส ลดปริมาตรจนแห้งพอดีและปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate PR grade 5 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของวัตถุมีพิษด้วยเครื่อง GC-MS

วิธีการที่ 2 จากวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัมใส่ในcentrifuge tube เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือนาน 1 นาที และเติม tri sodium citratedihydrate 1 กรัม, di sodium hydrogen citrate 1,5 hydrate 0.5 กรัม, magnesium sulfate 4 กรัมและ sodium chloride 1 กรัม เขย่าด้วย Vortex mixture 1 นาที นำไปcentrifuge นาน 2 นาที แบ่งสารละลายส่วนใสมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในcentrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA 0.125 กรัม และ $MgSO_4$ 0.75 กรัม GCB 0.05 กรัม ปิดฝาและเขย่าทันทีด้วย Vortex mixture 1 นาที นำไป centrifuge นาน 5 นาที แบ่งสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตรใส่ขวดvial และเติม 5%Formic acid 10 ไมโครลิตรกรองผ่าน PTFE syringe Filters ขนาด 0.2 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

7.3.3. ศึกษา matrix effect และขั้นตอนการเปรียบเทียบการเติม Analysis Protectants (APs) ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่องGC-MS โดยดูความแตกต่างจาก%RPD (NATA , 2012)

% ความแตกต่าง %RPD = ((x1-x2)/((x1+x2)/2))x100

โดย%RPDมากกว่า 10 % ถือว่าแตกต่างกัน

ขั้นตอนการเตรียม Analysis Protectants (APs)

ชั่ง 3-ethoxy-1,2-propanediol 2 กรัมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม D-(+)-gluconic-acidlactone เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2มิลลิลิตร เติม Sorbitol เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม shikimic acidเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile : water (7:3 v:v) เก็บที่4°C

การใช้งาน เติมในสารสกัดหรือสารละลายก่อนฉีดเข้าเครื่องโดยใช้อัตราส่วน 30มิลลิลิตรต่อสารสกัดหรือสารละลาย 1 มิลลิลิตร

7.3.4 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่องGC-MS

เครื่องGC-MS รุ่น 6890N Hewlette-Packard (Agillent technologies) ต่อกับ5973N mass

selective detectors

- คอลัมน์ชนิด capillary DB 5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตรความหนาของฟิล์ม 0.25ไมโครเมตร ใช้ฮีเลียมเป็นCarrier gas ควบคุมความดันคงที่ โดยใช้โปรแกรม RT-Lock
- Oven อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50°C(1 นาที);25°C/min to 12; 10°C/นาที to 300 °C (1 นาที)ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ 22.5นาที
- Inlet ใช้แบบ Splitless
- ปริมาณสารที่ฉีด 1 ไมโครลิตร
- ใช้ mode SIMในการตรวจวัด

สำหรับ Folpet Rt: 9.12 Target ion: 147, Qualifier ion: 76, 104

และ Captan Rt: 9.38 Target ion: 79, Qualifier ion: 151, 80

เวลาและสถานที่ **ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)** ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการวิเคราะห์

1. เปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างองุ่นที่ผ่านการspike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและนำมาปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้น้ำแข็งแห้งและไม่ใช้น้ำแข็งแห้งให้ผลดังแสดงภาพที่ 4 พบว่าเมื่อปั่นด้วยน้ำแข็งแห้งให้เนื้อตัวอย่างมีความละเอียดมากกว่า และเมื่อเปรียบเทียบ%recovery ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อใช้น้ำแข็งแห้งก่อนทำการวิเคราะห์โดยวิธี Stienwandter (1985) ให้ผล %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 81 และ 81 และเมื่อไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง % Recoveryของ captan และ folpet เฉลี่ย75 และ 75 การวิเคราะห์โดยวิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งให้ผล Recoveryของ captan และ folpet เฉลี่ย 83 และ 75 เมื่อไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง Recoveryของ captan และ folpet เฉลี่ย 71 และ 66

เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ Paired t-test พบว่าเมื่อนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบการใช้น้ำแข็งแห้งกับไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง วิธี Stienwandter (1985) ให้ค่า t ของ captan และ folpet เท่ากับ 5.67และ 4.11 การวิเคราะห์โดยวิธี QuEChERS, Anastassiades(2003)ให้ค่า t ของ captan และ folpetเท่ากับ11.61และ6.93 เปรียบเทียบกับค่า t_{cri} (n=6 ,α=0.5)=2.45 ดังนั้นการใช้น้ำแข็งแห้งและไม่ใช้น้ำแข็งแห้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2. เปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างวิธี Stienwandter (1985) และวิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) ในตัวอย่างที่ได้จากการ spike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและนำมาปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้น้ำแข็งแห้งพบว่าวิธี Stienwandter (1985) มี %Recovery ของ

captan และ folpet เฉลี่ย 81 และ 81และวิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 83 และ 75 ตามลำดับ

การประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) โดยการนำไปประเมิน HORRAT ใช้เกณฑ์ Horwitz's ratio< 2 และ%RSD จากภาคผนวก 2

กรณีใช้น้ำแข็งแห้ง การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง captan และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985)มีค่า%RSD 6.00และ HORRAT 0.5 วิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) มีค่า%RSD 2.93 และ HORRAT 0.24 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง folpet และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985)มีค่า%RSD 4.58และ HORRAT 0.38 วิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) มีค่า%RSD 5.27และ HORRAT 0.43

กรณีไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง captan และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985)มีค่า%RSD 16.07และ HORRAT 1.33 วิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) มีค่า%RSD 3.43 และ HORRAT 0.28 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง folpet และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985)มีค่า%RSD 6.21และ HORRAT 0.51 วิธี QuEChERS, Anastassiades(2003) มีค่า%RSD 5.53และ HORRAT 0.44

3.เปรียบเทียบการเติม Analysis Protectants(APs) ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่องGC-MS พบว่า พื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้นเดียวกันของ folpet และ captan ให้ผลดังภาพที่ 5 พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลาย EtOAc ให้พีคที่ folpet และ captan มี %RPD สูงกว่า ACN 130% และ 104 % และเมื่อเติมAPsใน EtOAc พื้นที่ใต้พีคมี %RPD เพิ่มขึ้น 81% และ 86%

และเมื่อพิจารณา matrix effect ดังภาพที่ 6 โดยการเปรียบเทียบความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กราฟของ folpet พบว่า สารมาตรฐานที่ละลายในmatrix ได้สมการ y = 700056x และ สารมาตรฐานที่ละลายใน EtOAc ได้สมการ y = 230114x ได้%RPDของความชันมีค่าเท่ากับ 101 และกราฟของcaptan สารมาตรฐานที่ละลายในmatrix ได้สมการ y = 692990x และ สารมาตรฐานที่ละลายใน EtOAc ได้สมการ y = 247229x ได้%RPDของความชันมีค่าเท่ากับ 95 ดังนั้น matrix effect มีผลต่อการวิเคราะห์ folpet และ captan ในตัวอย่างองุ่น

และเมือเติมAPs พบว่า ทั้ง folpet และ captan มีพื้นที่ใต้พีคของ สารมาตรฐานที่ละลายใน solvent+AP, สารมาตรฐานที่ละลายในmatrix และ สารมาตรฐานที่ละลายใน matrix+APs มีค่าใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างจาก สารมาตรฐานที่ละลายใน solvent ซึ่งมีค่าต่ำกว่ามาก

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบการปั่นตัวอย่างองุ่นแบบใช้น้ำแข็งแห้

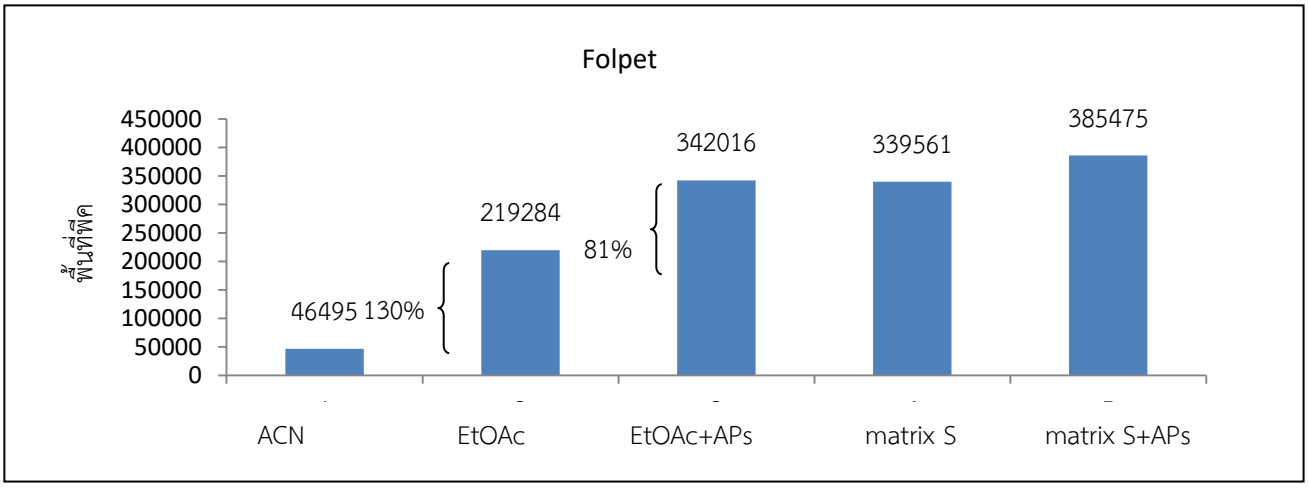
ไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง

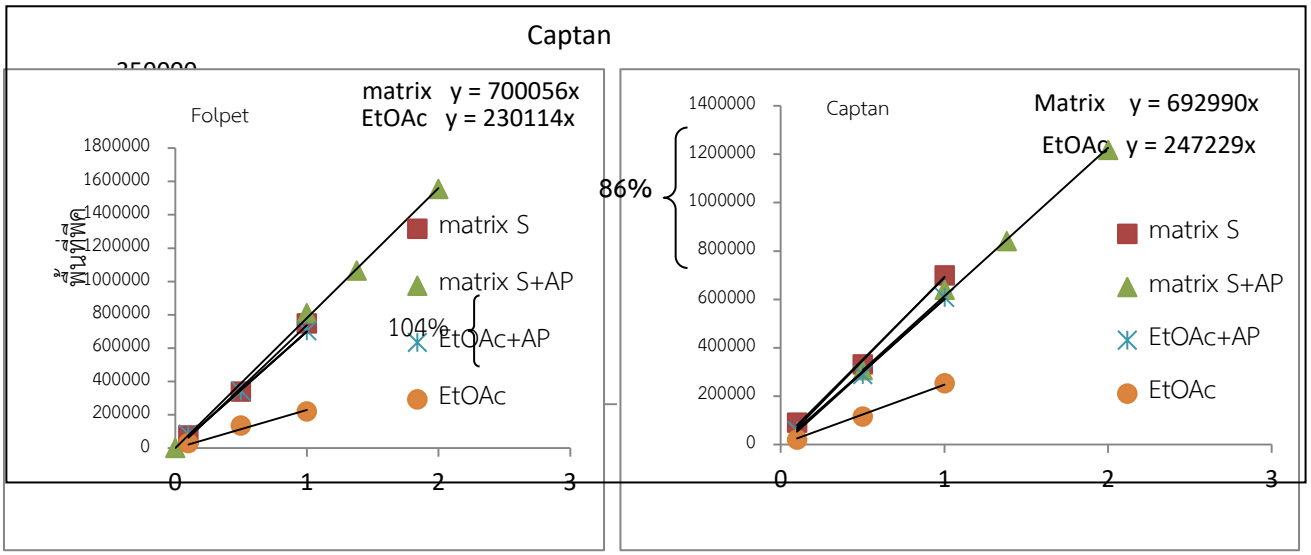
ใช้น้ำแข็งแห้ง

ตารางที่ 1 แสดงค่า%Recovery ของการวิเคราะห์

	ใช้น้ำแข็งแห้ง		ไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง	
	Stienwandter	QuEChERS	Stienwandter	QuEChERS
% Captan	74-86	80-84	62-98	66-72
Mean	81	83	75	71
%RSD	6.00	2.93	16.07	3.43
HORRAT	0.5	0.24	1.33	0.28
%Folpet	76-86	72-82	68-82	60-70
Mean	81	75	75	66
%RSD	4.58	5.27	6.21	5.53
HORRAT	0.38	0.43	0.51	0.44

ภาพที่ 5 แสดงค่าพื้นที่พีคของcaptanและ folpetความเข้มข้นเดียวกัน ในตัวทำละลายต่างชนิดกัน





ภาพที่ 6 แสดงค่าพื้นที่พีคของcaptanและ folpet ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวทำละลายต่างชนิดกัน

พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้น้ำแข็งแห้งให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่า เนื่องจากการปั่นตัวอย่างเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน อาจทำให้เกิดความร้อนทำให้ปริมาณ folpet และ captan ลดลงและเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติการใช้และไม่ใช้น้ำแข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากการทดลองการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้ผลดีกว่าการไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง และผลการเปรียบเทียบวิธีสกัดระหว่างวิธี QuEChERS (Anastassiades, *et al.,* 2003)และวิธี Stienwandter (1985) จากการ spike สารมาตรฐานลงไปตัวอย่างร่วมกับการใช้น้ำแข็งแห้งและเติม APs พบว่า ผล% Recoveryของทั้งสองวิธีผ่านเกณฑ์และใกล้เคียงกันยกเว้น Folpet ที่การสกัดโดยวิธี QuEChERS (Anastassiades, *et al.,* 2003) และจาก ผลการวิเคราะห์เมื่อประเมินความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (precision) จาก

ค่า%RSDและ HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดดังนั้นการใช้น้ำแข็งแห้งและการเติม APs ช่วยทำให้ผลการวิเคราะห์ดีขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้หาปริมาณ folpet และ captanในงานวิเคราะห์ตัวอย่างโดยทั่วไปได้
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างในพืชอื่นๆ

11. เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2007.เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรนักวิเคราะห์มืออาชีพสาขาเคมี.4-35

Anonymous, 2010. from web site: http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/baselabilecaptan.pdf (9 November 2012)

Anonymous, 2010. from web site http://www.crl.pesticides.eu /library/docs/srm/meth_ Captanfolpet_eurlsrm.pdf (10November 2011)

Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbahe D. r Schenck F.J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 86, 412-431.

Anastassiades M., Katerina M., Lehotay S. J., 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatrographic analysis of pesticide, J. Chromatography A., 1015, 163-184.

AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOACI\eCam\Single-Lab_Validation_47.doc. from web site: http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf

C D S Tomlin, 2006. The Pesticide Manual. Fourteenth Edition, BCPC, UK

NATA , 2012. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test

Methods. June 2012. National Association of Testing Authorities(NATA), AUS

Richard J. F., Michael T.H., Roy M, Dawn F., Frank S., Arpad A.,Peter J B., 2007. Measurement uncertainty associated with sample processing of oranges and tomatoes for pesticide residue analysis. J. Agric. Food Chem., 55 , 1062-1070

Steinwandter H, 1985. Universal 5 Min on – line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem., 322 , 752-754

12.ภาคผนวก

ภาคผนวก 1.เกณฑ์การยอมรับ %**RSD** ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของAOAC Peer-Verified Method, 2002

Unit	**RSD_r (%)**
100%	1
10%	1.5
1%	2
0.1%	3
100 ppm	4
10 ppm (μg/g)	6
1 ppm	8
10 ppb (μg/kg)	15

ภาคผนวก 2.เกณฑ์การยอมรับ% Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของAOAC Peer-Verified Method, 2002

Analyte (%)	**Unit**	**Mean Recovery (%)**
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0.1	0.1%	95-105
0.01	100 ppm	90-107
0.001	10 ppm	80-110

0.0001	1 ppm	80-110
0.00001	100 ppb	80-110
0.000001	10 ppb	60-115
.0000001	1 ppb	40-120

Source: AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOACI\eCam\Single-Lab_Validation_47.doc. http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf