

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
2. **โครงการวิจัยกิจกรรม** : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
กิจกรรม : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในหอมแดง
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development for the determination of organophosphorus pesticide residues in shallot
 รหัสการทดลอง 03-06-54-06-01-02-33-57
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**
 หัวหน้าการทดลอง นางพรศิริ สายะพันธ์
 ผู้ร่วมงาน นางสาวสุธินี สาสีลัง
 นางสาวเบญจมาศ ใจแก้ว
 นางสาววิภาพร เกียรตินิติประวัติ
5. **บทคัดย่อ**

การสกัดสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสในหอมแดงโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่พัฒนามาจาก QuEChERS ร่วมด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ มีการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS เช่น ชนิดและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นตัวสกัด, ชนิดและปริมาณสารการทำความสะอาดตัวอย่าง, และปริมาณการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างหอมแดง คือ ใช้แอสिटอนและไดคลอโรมีเทน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่ใช้สกัดสารพิษตกค้างที่ต้องการวิเคราะห์, ทำความสะอาดตัวอย่างโดยใช้ปริมาณ Primary Secondary Amine (PSA) 150 มิลลิกรัม และเติม 10% โซเดียมคลอไรด์ ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธีพบว่าช่วงการใช้งาน ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดี คือ ช่วง 0.02-2.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 ยกเว้น เมทามิโดฟอส, ไดคลอโรวอส, โอเมโทเอต, โมโนโครโทฟอส, และอะซินฟอส มีช่วงการใช้งาน 0.05-2.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ขีดจำกัดของการตรวจพบมีค่าอยู่ในช่วง 0.006-0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณมีค่าอยู่ในช่วง

0.02-0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม การหาค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 60-120%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 63-120%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 64-118% ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ประเมินค่าอยู่ในช่วง 0.2-1.8 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัว ถ้าเปรียบเทียบวิธีนี้กับวิธีการเตรียมตัวอย่างทั่วไปพบว่า วิธีที่เสนอนี้มีความได้เปรียบของการเป็นวิธีการสกัดที่รวดเร็ว และง่ายต่อการทำงานและมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อยกว่าทั่วไป

6. คำนำ

ประเทศไทยเราเป็นประเทศเกษตรกรรมในเขตร้อนที่มีศัตรูพืชชุกชุม จึงยังคงมีความจำเป็นในการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผลิตผลการเกษตรโดยเฉพาะพืชผัก สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในทางการเกษตรที่มีการจำหน่ายทางการค้ามีมากมายหลายชนิดซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการควบคุมและกำจัด คือ สารกำจัดแมลง สารป้องกันกำจัดวัชพืช สารป้องกันกำจัดเชื้อรา สารกำจัดหนูและสัตว์ เป็นต้น แต่ในการจำแนกตามสูตรเคมี แบ่งประเภทใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มสารประกอบคลอรีน เป็นกลุ่มสารที่มีการใช้มากในการเกษตรยุคแรกๆ แต่ต่อมาพบว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่สลายตัวช้า มีพิษตกค้างปนเปื้อนอยู่ในสภาวะแวดล้อมยาวนานจึงมีประกาศห้ามใช้ทางการเกษตร กลุ่มสารประกอบฟอสเฟต กลุ่มสารคาร์บาเมท มีการใช้มาก มีพิษค่อนข้างสูงแต่สลายตัวได้เร็วมากกว่ากลุ่มอื่น และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ สารในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์เร็ว ความเป็นพิษในสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำสลายตัวได้เร็ว ผู้ที่สัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยตรง เช่น เกษตรกร หรือผู้บริโภคจะได้รับพิษทางอ้อม ซึ่งเกิดจากการบริโภคผลผลิตทางการเกษตรที่มีสารเคมีปนเปื้อนหรือตกค้างอยู่ ซึ่งการได้รับสารพิษตกค้างในอาหารแม้ว่าจะได้รับในปริมาณต่ำ แต่การที่ได้รับเป็นประจำ สารพิษอาจสะสมเป็นปัญหาเรื้อรัง และส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานต่างๆ ในร่างกาย ดังนั้นเพื่อให้ผู้บริโภคได้บริโภคอาหารอย่างปลอดภัย จึงต้องมีระบบการดูแลควบคุมและตรวจสอบคุณภาพความปลอดภัยในอาหารที่ผลิตทุกขั้นตอน ทั้งนี้มาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมต้องมีความเท่าเทียมกับมาตรฐานสากล ทำให้ต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีและสร้างองค์ความรู้ที่หลากหลายเพื่อเพิ่มสมรรถนะกับการแข่งขันกับต่างประเทศ ตลอดจนกลุ่มประเทศ EU และประเทศญี่ปุ่น ได้ปรับเปลี่ยนระบบและมาตรฐานการควบคุมสารเคมีตกค้างในสินค้าเกษตรและอาหารนำเข้า โดยกำหนดค่าสูงสุดที่จำกัดให้มีในอาหาร (Maximum Residue Limits : MRLs) เป็น “Positive List System” ซึ่งครอบคลุมสารเคมีทุกชนิดทั้งที่มีการกำหนดค่า MRLs เป็นที่เรียบร้อยแล้วและที่ยังไม่ได้กำหนดค่า MRLs ให้มีค่า 0.01 ส่วนต่อล้านส่วน ส่งผลกระทบต่อส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารของไทยหลังจาก

กลุ่มประเทศ EU และญี่ปุ่น นำระบบนี้มาใช้ คือ สินค้าอาหารของไทยจะถูกตรวจสอบสารเคมีตกค้างอย่างเข้มงวดขึ้น และใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นานขึ้น เนื่องจากมีจำนวนสารเคมีที่ต้องตรวจสอบมากขึ้น

หอมแดง (*Allium ascalonicum* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Amaryllidaceae ชื่อ Shallot เป็นพืชล้มลุกที่ได้รับความนิยมในการบริโภคมาก มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าหัวสะสมอาหาร หอมแดงสามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วน และความชื้นในดินควรสูงในขณะที่เจริญเติบโต แต่เมื่อหัวเริ่มแก่ดินและอากาศต้องแห้ง ช่วงที่ปลูกได้ผลดีคือ ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน – มีนาคม แหล่งเพาะปลูกหอมแดงมากที่สุดคือ ภาคอีสาน ได้แก่ ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ นครราชสีมา รองลงมาคือภาคเหนือ ได้แก่ ลำพูน เชียงใหม่ เชียงรายและอุตรดิตถ์ พันธุ์ของหอมแดงที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีสองแบบ แบบแรกคือ พันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ เรียกว่า หอมบัว เป็นหอมแดงที่มีเปลือกนอกสีเหลืองปนส้ม ขนาดหัวปานกลาง ลักษณะกลมรี ใน 1 หัวแยกได้ 2-3 กลีบ กลิ่นไม่ฉุนจัด รสหวาน แบบที่สองเป็นพันธุ์บางช้าง หรือหอมแดงศรีสะเกษ เป็นหอมแดงที่มีเปลือกนอกสีม่วงปนแดง เปลือกหนาและเหนียว ขนาดหัวใหญ่ สม่ำเสมอ หัวมีลักษณะกลม ใน 1 หัว มี 1-2 กลีบ กลิ่นฉุนจัด มีรสหวาน หอมแดงให้ผลผลิตแตกต่างกันไปตามฤดูปลูก โดยปกติหอมแดงที่ปลูกในฤดูหนาวจะแก่จัดเมื่ออายุ 70-110 วัน ถ้าปลูกในฤดูฝนจะสามารถเก็บได้เมื่ออายุประมาณ 45 วัน แต่ผลผลิตของหอมแดงทั้ง 2 ฤดูแตกต่างกัน คือในฤดูหนาวจะให้ผลผลิตมากเป็น 2-3 เท่าของในฤดูฝน จึงเป็นเหตุให้หอมแดงในฤดูฝนมีราคาสูงกว่า หลังปลูก 15 วันและ 30 วัน เกษตรกรมีการใส่ปุ๋ยเคมีมากโดยไม่คำนึงถึงปริมาณธาตุอาหารที่อยู่ในดิน ทำให้ธาตุอาหารตกค้างสะสมอยู่ในดินขาดความสมดุลและดินมีสภาพเป็นกรดจึงทำให้พบการระบาดของโรคหอมเลื้อย หนอนกระทู้หอม เพลี้ยไฟ สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ได้แก่ เมโทมิล คลอไพริฟอส โพรพิโนฟอส อบาเม็คติน ไซเปอร์เมทริน สารเคมีป้องกันกำจัดโรค ได้แก่ โพรคลอราซ คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ และใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืชในกลุ่มออกซิฟลูออเซิน หลังจากเก็บเกี่ยวมีการปฏิบัติคล้ายกระเทียม คือ หอมแดงที่ถอนแล้วต้องนำมาฝังลงในที่ร่มให้ใบเหี่ยวแห้งจากนั้นก็มัดเป็นจุก คัดขนาดและทำความสะอาด คัดพันธุ์แล้วนำไปแขวนไว้ในที่ร่ม เช่น ใต้ถุนบ้าน ให้มีลมโกรก เพื่อระบายความชื้นจากหัวและใบหอม ไม่ให้ถูกแดด ฝนหรือน้ำค้าง หอมแดงหากเก็บไว้ในอากาศอบอ้าวจะเกิดโรคราสีดำและเน่าเสียหายเช่นเดียวกับกระเทียม

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรเป็นขั้นตอนหนึ่งที่จะต้องรวดเร็ว ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ให้อยู่ในระดับที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดได้ วิธีทั่วไปสำหรับการเตรียมตัวอย่าง เช่น Liquid Liquid Extraction, Soxhlet Extraction, Chromatography ซึ่งมีข้อเสียในเรื่องของเวลาการเตรียม ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มากและทำแบบอัตโนมัติได้ยาก ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบใหม่ ซึ่งใช้เวลาการเตรียมตัวอย่างน้อย มีประสิทธิภาพ

สูงและใช้ปริมาณตัวอย่างและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อยลง มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากมาก การเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรที่ได้รับความนิยม เช่น Solid Phase Extraction (SPE), Solid Phase Micro Extraction (SPME), Single Drop Micro Extraction (SDME), และ Hollow Fiber Based Liquid Phase Micro Extraction (HF-LPME) เป็นต้นซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดี ข้อด้อยแตกต่างกันไป เช่น SPE เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้ แต่ยังมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาณมาก มีหลายขั้นตอนในการทำ และผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญ เพราะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายและกระบวนการที่เหมาะสม เทคนิค SPME มีข้อเสียในเรื่องของไฟเบอร์ที่มีราคาแพง บอบบางแตกหักง่าย และมีข้อจำกัดของอายุการใช้งาน ส่วนเทคนิค SDME มีข้อเสียในแง่ของการทำงานที่ต้องระมัดระวังหยดของตัวทำละลายให้คงที่ในแต่ละครั้ง เป็นต้น

เนื่องจากการวิจัยเกี่ยวกับเทคนิค QuEChERS ส่วนใหญ่จะวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรในตัวอย่างที่มีเนื้อสารที่ไม่ซับซ้อน กลิ่นไม่ฉุน และในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างตัวอย่างที่มาวิเคราะห์เพื่อการรับรองระบบส่วนมากเป็นหอมแดง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค QuEChERS มาใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรในตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของน้ำน้อยและกลิ่นฉุนในหอมแดงเพื่อเพิ่มความเข้มข้นหลังการสกัดสูง ลดขั้นตอนการสกัดตัวอย่างให้ง่ายรวดเร็ว และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์น้อย

7. วิธีการดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์และเครื่องมือหลัก

- 7.1.1 เครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS) ยี่ห้อ Agilent technologies รุ่น 6890 / 5890N
- 7.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo ช่วงการใช้งาน 0.5 - 1500 กรัม
- 7.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo ช่วงการใช้งาน 10 มิลลิกรัม - 220 กรัม
- 7.1.4 เครื่องลดปริมาตรตัวทำละลายแบบ Nitrogen-Evaporator (N₂-Evaporator) ยี่ห้อ Organomation Associates Inc.
- 7.1.5 เครื่องปั่นตัวอย่าง (Food chopper) ยี่ห้อ Robot coupe รุ่น R201 Ultra
- 7.1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) ยี่ห้อ Napco millenium-2028R รุ่น 2028R
- 7.1.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ยี่ห้อ Labnet รุ่น VX 100

7.1.8 อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Solvent dispenser) ขนาด 10, 50, 100 มิลลิลิตร

7.1.9 ปิเปตดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ (Automatic pipette) ช่วงการใช้งาน 10-100 ไมโครลิตร, 200-1000 ไมโครลิตร, 1-10 มิลลิลิตร

7.1.10 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 25 มิลลิลิตร

7.1.11 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 500 มิลลิลิตร

7.1.12 หลอดเซนติฟิวพลาสติกแบบมีฝาปิด (Centrifuge tube) ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร

7.1.13 ขวดตัวอย่าง (Autosampler vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร

7.2 สารเคมีและการเตรียมสารมาตรฐาน

7.2.1 สารมาตรฐานและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ แสดงในตาราง 7.1 และ 7.2

ตาราง 7.1 รายการสารมาตรฐาน^a

Chemicals	%Purity
1) Azinphos	99.6
2) Chlorpyrifos	98.5
3) Diazinon	99.9
4) Dichlorvos	98.0
5) Dicrotophos	99.0
6) Dimethoate	98.5
7) EPN	99.0
8) Ethion	98.8
9) Fenitrothion	98.0
10) Malathion	99.0
11) Methamidophos	98.5
12) Methidathion	98.5
13) Mevinphos	90.5
14) Monocrotophos	98.5
15) Omethoate	98.0
16) Parathion	99.5

Chemicals	%Purity
17) Parathion-methyl	98.5
18) Phosalone	98.5
19) Pirimiphos	98.0
20) Pirimiphos- methyl	99.0
21) Profenofos	98.5
22) Prothiophos	94.0
23) Triazophos	76.0

^a all pesticides were supplied from Dr. Ehrenstorfer (Germany)

ตาราง 7.2 รายการสารเคมี

Chemicals	Suppliers
1) Acetone (analytical grade)	J.T.Baker (USA)
2) Dichloromethane (analytical grade)	J.T.Baker (USA)
3) Acentonitrile (analytical grade)	J.T.Baker (USA)
4) Ethylacetate (pesticide grade)	J.T.Baker (USA)
5) Acetic acide	J.T.Baker (USA)
6) Sodium chloride	Merck (Germany)
7) Magnesium sulfatе anhydrous ขนาด 12-60 mesh	J.T.Baker (Mexico)
8) Primary secondary amine (PSA) sorbent; 40µm particle size	Vertical

7.2.2 การเตรียม Stock Standard Solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง แล้วนำค่าร้อยละความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity) มาคำนวณหาน้ำหนักที่แท้จริง โดยชั่งสารมาตรฐานประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมเอทิลอะซิเตท (PR Grade) ลงในขวดวัดปริมาตรทีละน้อย แล้วเขย่า จนสารมาตรฐานละลายหมดจากนั้นเติมเอทิล อะซิเตทจนถึงขีดปริมาตร

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานคำนวณดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง (mg)} \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร (\%)} \times 10^3}{\text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times 100}$$

7.2.3 การเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้สำหรับ ด fortified ลงในตัวอย่างและใช้ในการเตรียม Working Mixed Standard Solution

เตรียมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตดูด stock standard solution 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารแต่ละชนิดในปริมาณที่คำนวณโดยการใช้อยู่สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอทิลอะซิเตท (PR Grade) ลงในขวดวัดปริมาตร ที่ละน้อยจนถึงขีดปริมาตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสลงในขวดแก้วเก็บ สารละลาย (stock bottle)

7.2.4 การเตรียม Working Mixed Standard Solution ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01 - 3 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

เตรียมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นมากกว่า 3 ระดับ (level) โดยกำหนดความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01 - 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็น calibration curve โดยใช้ปิเปตดูด intermediate mixed standard solution 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณที่คำนวณโดยการใช้อยู่สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร เติม matrix ของหอมแดงลงในขวดวัดปริมาตรที่ละน้อยจนถึงขีดปริมาตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลาย มาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสลงในขวดแก้วเก็บสารละลาย (stock bottle)

7.3 วิธีการ

7.3.1 ทาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ได้แก่ ไดคลออร์วอส (dichlorvos, DDVP), เมตามิโดฟอส (methamidophos), เมวินฟอส (mevinphos), ไดอะซินอน (diazinon), โอ เมโทเอต (omethoate), ไดโครโทฟอส (dicrotophos), โมโนโครโทฟอส (monocrotophos), ไดเมโทเอต (dimethoate), พิริมิฟอส เมทิล (pirimiphos-methyl), คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos), พาราไทออน เมทิล (parathion-methyl), พิริมิฟอส (pirimiphos), มาลาไทออน (malathion), เฟนิโตรไทออน (fenitrothion), พาราไท ออน (parathion), โพรไทโอฟอส (prothiophos), เมทิดาไทออน (methidathion), โพรฟีโนฟอส (profenofos), ไตรอะโซฟอส (triazophos), อีไทออน (ethion), อีพีเอ็น (EPN), โฟซาโลน (phosalone) และ อะซินฟอส (azinphos) ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ได้แก่ อุณหภูมิของการฉีดสารตัวอย่างและตู้อบให้ ความร้อน, อัตราการไหลของแก๊สตัวพา และเลือกแมสที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารตัวอย่างหอม

7.3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างหอมแดงและประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่

- a ชนิดและปริมาณของ extraction solvent เช่น อะซีโตนไนไตรล์, แอซีโตน, เมทิลไดคลอโร- มีเทน เป็นต้น

- b ชนิดและปริมาณสารการทำให้อ่างอย่างบริสุทธิ์ (Clean- up)
- c การเติมเกลือในช่วง 0-25% (W/V)

โดยการประเมินค่าร้อยละการคืนกลับของสารที่ต้องการวิเคราะห์และปริมาณสารรบกวนที่สกัดได้

7.3.3 ศึกษาคุณลักษณะของวิธีและระดับความเข้มข้น

7.3.3.1 ช่วงของการวัด (Working Range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ช่วงของการวัดเป็นช่วงของความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรงและให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นยำตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ความเป็นเส้นตรงเป็นความสามารถของวิธีที่ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานออร์แกโนฟอสฟอรัสระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลการวัดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานออร์แกโนฟอสฟอรัส (ppm) กับพื้นที่ใต้พีค (peak area) และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับจะต้องมากกว่า 0.995

7.3.3.2 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และ ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

Limit of Detection (LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้

Limit of Quantitation (LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง โดยมีความถูกต้องและความแม่นยำที่ยอมรับได้

LOD และ LOQ หาได้โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ มาวิเคราะห์อย่างน้อย 6 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่อ่านได้ แล้วหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการที่ 1-2 ตามลำดับ

$$\text{LOD} = 3\text{SD} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10\text{SD} \quad (2)$$

7.3.3.3 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำหรือความถูกต้อง คือ ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดค่าในสารตัวอย่างได้ออกมาตรงกันหรือใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน ต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน ประเมินความแม่นยำ

จากค่า mean % recovery (สมการที่ 3) และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ codex การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร (ตาราง 7.3)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_2 - C_1) \times 100}{C_3} \quad (3)$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ fortified ที่หาได้จาก calibration curve

C_2 = ความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่หาได้จาก calibration curve

C_3 = ความเข้มข้นจริงที่รู้แน่นอน (ความเข้มข้นที่ fortified ในตัวอย่าง)

ตาราง 7.3 การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร ของ Codex

Concentrations of analyte	Range of mean % recovery
< 1 µg/kg	50-120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	60-120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	70 -120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	70 – 110
> 1 mg/kg	70 – 110

7.3.3.4 การตรวจสอบความเที่ยง (Intermediate precision)

เป็นการหาความเที่ยงโดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันหลายๆ ครั้ง โดยวิเคราะห์คนละวัน ใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือวิเคราะห์เดียวกันและผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน ต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำ

ประเมินความเที่ยงโดยการเปรียบเทียบค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง ($\% \text{ RSD}_{\text{obs}}$) กับค่าที่ถูกคำนวณจาก Horwitz Equation ($\% \text{ RSD}_r$) ดังสมการที่ 4-6 ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับคือ ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) < 2

$$\% \text{ RSD}_{\text{obs}} = \frac{SD}{X} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ RSD}_r = 0.66 \times 2C^{(1-0.5\log C)} = 0.66 \times 2C^{-150} \quad (5)$$

$$\text{HORRAT} = \frac{RSD_{\text{obs}}}{RSD_r} \quad (6)$$

7.4 เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) :	1 ตุลาคม 2556-30 กันยายน 2557
สถานที่ทำการทดลอง :	กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี

การวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีแบบ electron impact ionization (EI) ที่ 70 eV และตรวจวัดในรูปแบบ SIM โดยใช้เครื่องยี่ห้อเอจีแลนท์ เทคโนโลยี (Hewlett-Packard, USA) รุ่น 6890/5973N คอลัมน์ที่ใช้แยกสารเป็นแบบบรรจุด้วยซิลิกา HP-5MS (30m x 0.25mm I.D x 0.25µm film thickness) โพรแกรมอุณหภูมิที่ใช้แยกสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสเริ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 0.50 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 70 °C ถึง 150 °C อัตราความเร็ว 15 °C / นาที, เพิ่มอุณหภูมิจาก 150 °C ถึง 195 °C อัตราความเร็ว 5 °C / นาที, เพิ่มอุณหภูมิจาก 195 °C ถึง 200 °C อัตราความเร็ว 0.5 °C / นาที, และเพิ่มอุณหภูมิจาก 200 °C ถึง 250 °C อัตราความเร็ว 5 °C / นาที เป็นเวลา 17 นาที โดยใช้แก๊สฮีเลียมความบริสุทธิ์ 99.9995% เป็นแก๊สพาด้วยอัตราความเร็ว 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที การฉีดสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นแบบ pulse splitless ที่อุณหภูมิ 220 °C

ตาราง 8.1 แสดงการเลือกไอออนสำหรับทำ SIM mode ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 23 ชนิด

Substances to be analyzed	MW.	R _t	SIM Ion (m/z)		
Methamidophos	141	5.442	94.10	141.10	95.10
Dichlorvos	220	5.682	109.10	185.00	
Mevinphos	224	7.659	127.10	192.10	
Omethoate	213	9.865	156.05	110.10	
Dicrotophos	237	11.094	127.10	67.10	237.15
Monocrotophos	223	11.271	127.05	97.10	164.00
Dimethoate	229	12.014	87.10	93.10	
Diazinon	304	13.300	179.20	137.10	
Parathion-methyl	263	14.798	109.10	263.00	

Substances to be analyzed	MW.	R _t	SIM Ion (m/z)	
Fenitrothion	277	15.827	277.10	109.10
Pirimiphos- methyl	305	15.969	290.10	276.10
Malathion	330	16.347	173.10	125.05
Chlorpyrifos	349	16.741	197.00	199.00 314.00
Parathion	291	16.741	291.10	109.10
Pirimiphos	333	17.890	333.20	318.15
Methidathion	302	19.564	145.10	85.10
Prothiophos	344	21.462	309.00	267.00
Profenofos	372	21.690	207.95	139.05
Ethion	384	25.908	231.00	153.10
Triazophos	313	26.886	161.10	162.10
EPN	323	31.018	157.00	169.10
Phosalone	367	32.801	182.05	121.10
Azinphos	345	34.424	132.10	160.10

8.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างหอมแดงและประสิทธิภาพการสกัด

QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method) เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั่วโลกสนใจ และได้รับยอมรับอย่างเป็นทางการจาก AOAC และ CEN (Committee of European Normalization) โดยวิธีนี้ใช้ตัวอย่าง สารละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย สามารถเตรียมตัวอย่างได้อย่างง่าย รวดเร็ว และใช้ dispersive solid-phase extraction (d-SPE) สำหรับกระบวนการทำความสะอาดตัวอย่างหรือการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ (Clean up) อีกทั้งยังให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้างดีอีกด้วย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสในหอมแดงจะพัฒนาจากเทคนิค QuEChERS โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างหอมแดงในด้านของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้การสกัด ชนิดและปริมาณสารทำความสะอาดตัวอย่างหรือการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ และการเติมเกลือ เป็นต้น

8.2.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัดสารพิษตกค้าง (Extraction solvent)

การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารพิษตกค้างให้เหมาะสมมีความสำคัญมาก ซึ่งการเลือกใช้ตัวทำละลายขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการละลายสารพิษตกค้างในแมทริกซ์ต่างๆ ความยากง่ายในการ

ระเหย ความเป็นพิษ และราคาเป็นต้น ตัวทำละลายที่นิยมนำมาใช้ในการสกัด ได้แก่ อะซีโตนไไตรล์, แอซีโตน, และไดคลอโรมีเทน ดังนั้นตัวทำละลายทั้งสามชนิดถึงถูกเลือกนำมาใช้ศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัดสารพิษตกค้าง โดยการชั่งตัวอย่างหอมแดง 10 กรัม ใส่ในหลอดเซนติฟิวพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม (fortified sample) เติม 1 กรัมของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 4 กรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) และเติมตัวทำละลายที่ศึกษา 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 1 นาที ตูดสารละลายขึ้นบน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 100 มิลลิกรัมของ primary secondary amine (PSA) และ 300 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ตูดส่วนใสขึ้นบนใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัดหอมแดง โดยการประเมินค่าร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้าง (% recovery) ตามตาราง 8.2 คือตัวทำละลายผสมระหว่างแอซีโตนกับไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:1 ให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้างที่ดีที่สุด คืออยู่ในช่วง 63-113 อะซีโตนไไตรล์ ให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้างอยู่ในช่วง 50-120 และ 1% กรดแอซีติกในอะซีโตนไไตรล์ ให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้างอยู่ในช่วง 50-120

ตาราง 8.2 แสดงค่าเฉลี่ย % recoveries ของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดหอมแดง โดยการเติมน้ำมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม

Compounds	% Recoveries		
	Acetone+Dichloromethane (1:1)	Acetonitrile	1% Acetic acid in Acetonitrile
Methamidophos	113	120	120
Dichlorvos	63	50	50
Mevinphos	90	77	73
Omethoate	90	80	80
Dicrotophos	110	100	100
Monocrotophos	80	78	76
Dimethoate	100	90	90
Diazinon	83	83	83
Parathion-methyl	94	90	90

Compounds	% Recoveries		
	Acetone+Dichloromethane (1:1)	Acetonitrile	1% Acetic acid in Acetonitrile
Fenitrothion	90	90	90
Pirimiphos- methyl	70	70	70
Malathion	100	107	107
Chlorpyrifos	73	70	70
Parathion	73	80	80
Pirimiphos	80	80	80
Methidathion	90	90	90
Prothiophos	90	90	90
Profenofos	90	100	97
Ethion	100	103	106
Triazophos	83	90	97
EPN	85	90	90
Phosalone	80	85	85
Azinphos	62	65	67

ตาราง 8.3 แสดงค่า pH ของตัวทำละลายแต่ละชนิด

Type of solvent	pH
Acetone+Dichloromethane (6:4)	5-6
Acetonitrile	5-6
1% Acetic acid in Acetonitrile	4

8.2.2 ชนิดและปริมาณสารการทำความสะอาดตัวอย่างหรือการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ (clean up)

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยใช้เครื่องมือที่มีความไวสูง มีความจำเป็นต้องทำความสะอาดตัวอย่างเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสารตกค้างในปริมาณต่ำๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เป็นการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ได้จากการสกัดไปรบกวนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

ส่วนใหญ่สารดูดซับ (adsorbent) ในเทคนิค QuEChERS จะใช้ primary secondary amine (PSA), C18, และ graphitized carbon black (GCB) เป็นต้น เนื่องจากตัวอย่างหอมแดงเป็นพืชที่มีกลิ่นฉุน แต่ไม่มีไขมันและเม็ตซีเยอะ เพราะฉะนั้นจะทำการศึกษาปริมาณสารของ PSA ในการ clean- up ตัวอย่างเท่านั้น โดยการชั่งตัวอย่างหอมแดง 10 กรัม ใส่ในหลอดเซนติฟิวลอสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม (fortified sample) เติม 1 กรัมของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 4 กรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) และเติมตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 1 นาที ดูดสารละลายขึ้นบน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวลอสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 25, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมของ primary secondary amine (PSA) และ 300 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบนใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS จากตาราง 4 พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้างดีที่สุดในปริมาณ primary secondary amine (PSA) ต่อปริมาณของสารละลายหอมแดงที่ได้จากการสกัด 5 มิลลิลิตร โดยการเติมสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ที่ให้ค่า % recoveries อยู่ในเกณฑ์ 60-120% คือ 100, 150, และ 200 มิลลิกรัมของ PSA แสดงว่าปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการ clean- up ตัวอย่างโดยใช้ PSA 150 mg

ตาราง 8.4 แสดงค่าเฉลี่ย % recoveries ของปริมาณ primary secondary amine (PSA) ต่อปริมาณของสารละลายหอมแดงที่ได้จากการสกัด 5 มิลลิลิตร โดยการเติมสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม

Compounds	% Recoveries				
	25 mg	50 mg	100 mg	150 mg	200 mg
	PSA	PSA	PSA	PSA	PSA
Methamidophos	130	120	120	118	119
Dichlorvos	49	45	62	64	64
Mevinphos	62	73	77	90	90
Omethoate	58	63	80	80	76
Dicrotophos	98	99	102	102	102
Monocrotophos	75	73	78	78	78
Dimethoate	87	87	90	106	101

Compounds	% Recoveries				
	25 mg	50 mg	100 mg	150 mg	200 mg
	PSA	PSA	PSA	PSA	PSA
Diazinon	63	67	73	73	71
Parathion-methyl	74	90	90	91	90
Fenitrothion	118	91	109	90	92
Pirimiphos- methyl	70	70	87	83	88
Malathion	56	68	107	106	100
Chlorpyrifos	124	120	107	106	106
Parathion	62	80	89	89	87
Pirimiphos	80	80	89	91	102
Methidathion	55	56	62	74	73
Prothiophos	90	90	101	101	100
Profenofos	88	87	98	100	103
Ethion	125	113	116	105	105
Triazophos	73	77	97	94	96
EPN	55	52	72	95	70
Phosalone	56	59	66	65	66
Azinphos	48	54	67	65	64

8.2.3 การเติมเกลือในช่วง 0-25% (W/V)

การเติมเกลือเพื่อเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายไฮดรอกไซด์สูงขึ้นจนกระทั่งไอออนของเกลือไปแยงโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายน้ำได้น้อยลงและแยกตัวไปอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ วิธีนี้เรียกว่า salting out เกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมคลอไรด์, แมกนีเซียมซัลเฟต, โพตัสเซียมซัลเฟต, โซเดียมซัลเฟต เปนตน

เนื่องจากห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ. 2 นิยมใช้โซเดียมคลอไรด์ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง เพราะฉะนั้นจะทำการศึกษาการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่างเท่านั้น โดยการชั่งตัวอย่างหอมแดง 10 กรัม ใส่ในหลอดเซนติฟิวพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานผสม

กลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม (fortified sample) เติม 0, 4, 8, 10, 20% W/ V ของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 4 กรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) และเติมตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 1 นาที ดูดสารละลายชั้นบน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนต์ปีทลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 100 มิลลิกรัมของ primary secondary amine (PSA) และ 300 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ผลการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ประเมินค่าจากประสิทธิภาพการสกัดจากร้อยละการคืนกลับของสารพิษตกค้าง ผลตามตาราง 8.5 พบว่าการเติมเกลือที่ 10% NaCl และ 20% NaCl ให้ % recoveries ดีที่สุดคือช่วง 67-113% และ 68-119% ตามลำดับ

ตาราง 8.5 แสดงค่าเฉลี่ย % recoveries ของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยการเติมสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม

Compounds	% Recoveries				
	0%	4%	8%	10%	20%
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
Methamidophos	140	132	120	113	119
Dichlorvos	50	45	66	68	71
Mevinphos	49	71	77	87	90
Omethoate	58	63	80	80	76
Dicrotophos	121	58	112	115	87
Monocrotophos	63	65	71	78	81
Dimethoate	78	87	92	98	101
Diazinon	43	67	73	83	114
Parathion-methyl	74	68	75	92	90
Fenitrothion	65	64	90	109	98
Pirimiphos- methyl	78	79	81	87	87
Malathion	66	68	104	107	102
Chlorpyrifos	78	80	88	107	106

Compounds	% Recoveries				
	0%	4%	8%	10%	20%
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
Parathion	62	80	80	89	87
Pirimiphos	77	80	80	89	89
Methidathion	55	56	62	78	81
Prothiophos	74	74	82	101	100
Profenofos	81	85	67	98	103
Ethion	51	113	58	91	104
Triazophos	73	76	64	97	98
EPN	69	85	90	72	70
Phosalone	56	59	85	105	114
Azinphos	50	54	67	67	68

8.3 ศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ QuEChERS (EN 15662 method) มาปรับใช้ตามแผนภาพที่ 1

Sample weight 10 g into the 50 ml of centrifuge tube

↓ 10 ml Acetone+Dichloromethane (1:1)

Shaker by hand 1 min

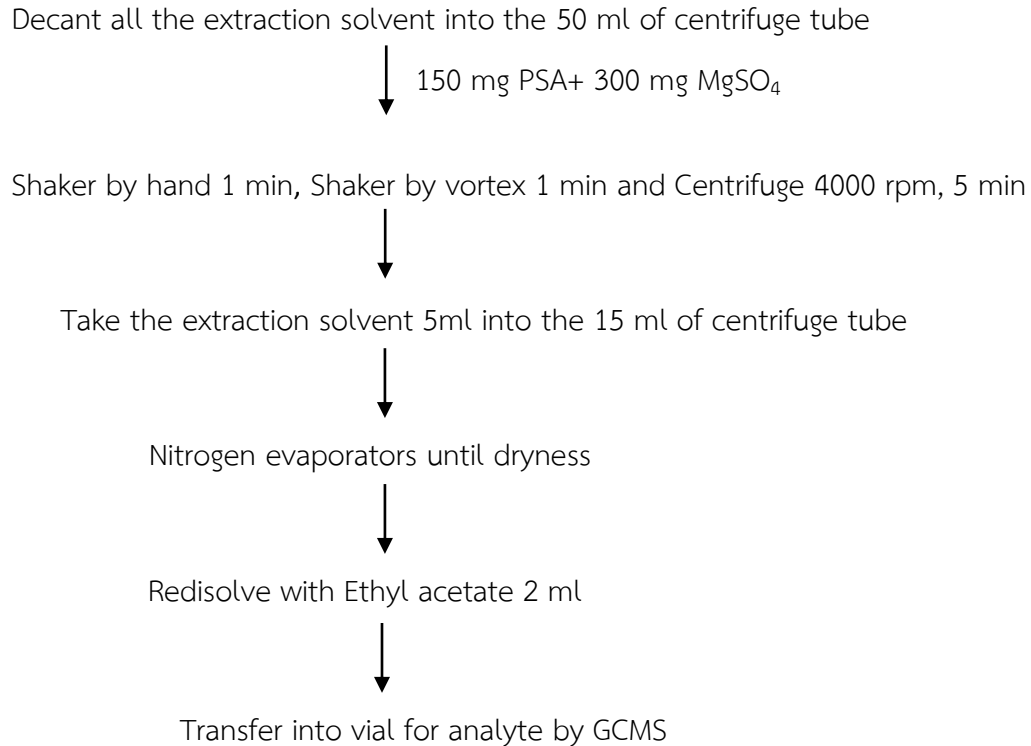
↓ 1.0 g NaCl+4.0g MgSO₄

Shaker by vortex 1 min

↓

Centrifuge 4000 rpm, 5 min

↓



แผนภาพที่ 1 แสดงวิธีการสกัดหอมแดงที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ QuEChERS (EN 15662 method)

8.3.1 วิเคราะห์หาช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (Range / Linearity) โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลการวัดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานออร์แกโนฟอสฟอรัส (ppm) กับการตอบสนองของเครื่อง (response) และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับจะต้องมากกว่า 0.995 จากการทดสอบพบว่า ค่า $r \geq 0.995$ แสดงว่าช่วงความเข้มข้น 0.02 – 2.0 ไมโครกรัมต่อกรัมของการวิเคราะห์ปริมาณออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ใช้งานในช่วงดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ยกเว้น เมทามิโดฟอส, ไดคลอร์วอส, โอเมโทเอต, โมโนโครโทฟอส, และอะซินฟอส มีช่วงความเข้มข้น 0.05-2.0 ไมโครกรัมต่อกรัม

8.3.2 วิเคราะห์หาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ) โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสระดับความเข้มข้นต่ำ 0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่อ่านค่าได้ คำนวณค่า $LOD = 3SD$ และ $LOQ = 10SD$ จากผลการศึกษาพบว่า ขีดจำกัดของการตรวจพบมีค่าอยู่ในช่วง 0.006-0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณมีค่าอยู่ในช่วง 0.02-0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามตาราง 8.6

ตาราง 8.6 แสดงค่า LOD และ LOQ

Compounds	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	
	LOD	LOQ
Methamidophos	0.02	0.05
Dichlorvos	0.02	0.05
Mevinphos	0.006	0.02
Omethoate	0.02	0.05
Dicrotophos	0.006	0.02
Monocrotophos	0.02	0.05
Dimethoate	0.006	0.02
Diazinon	0.006	0.02
Parathion-methyl	0.006	0.02
Fenitrothion	0.006	0.02
Pirimiphos- methyl	0.006	0.02
Malathion	0.006	0.02
Chlorpyrifos	0.006	0.02
Parathion	0.006	0.02
Pirimiphos	0.006	0.02
Methidathion	0.006	0.02
Prothiophos	0.006	0.02
Profenofos	0.006	0.02
Ethion	0.006	0.02
Triazophos	0.006	0.02
EPN	0.006	0.02
Phosalone	0.006	0.02
Azinphos	0.02	0.05

8.3.3 วิเคราะห์หาความแม่นยำ (accuracy) โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งานต่ำ กลาง สูง คือ 0.02, 0.10, และ 2.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน ประเมินค่าความแม่นยำ จากค่าร้อยละการนำกลับคืนมา (% recovery) และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ codex การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาศัตรูในอาหาร ผลจากตาราง 8.7 พบว่าค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 60-120%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 63-120%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 64-118%

ตาราง 8.7 แสดงค่า % recoveries ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เพื่อตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy)

Compounds	% recoveries (n=7-10)		
	0.02* µg/g	0.10 µg/g	2.00 µg/g
Methamidophos	114-120	110-120	98-118
Dichlorvos	60-84	63-87	64-91
Mevinphos	62-90	70-92	80-92
Omethoate	60-86	70-90	73-95
Dicrotophos	70-95	97-110	100-110
Monocrotophos	61-80	73-80	78-110
Dimethoate	82-120	90-111	91-110
Diazinon	83-115	80-90	82-108
Parathion-methyl	70-85	90-94	89-98
Fenitrothion	65-84	79-90	97-102
Pirimiphos- methyl	78-120	70-101	74-110
Malathion	95-102	100-107	96-100
Chlorpyrifos	60-75	72-118	87-110
Parathion	65-85	70-82	93-109
Pirimiphos	72-95	85-104	97-104
Methidathion	89-105	96-102	90-99
Prothiophos	84-96	91-105	93-101
Profenofos	66-108	95-106	102-110

Compounds	% recoveries (n=7-10)		
	0.02* µg/g	0.10 µg/g	2.00 µg/g
Ethion	80-95	94-117	100-110
Triazophos	92-113	90-100	97-107
EPN	81-92	85-90	86-106
Phosalone	78-85	80-85	82-89
Azinphos	60-79	62-75	68-88

* ความเข้มข้นสำหรับ fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับต่ำ คือ 0.02 µg/g ยกเว้น methamidophos, dichlorvos, omethoate, monocrotophos, และ azinphos ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับ 0.05 µg/g

8.4.4 วิเคราะห์หาความเที่ยง (precision) โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งานต่ำ กลาง สูง คือ 0.02, 0.10, และ 2.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำ ประเมินความเที่ยงโดยใช้ HORRAT (Horwitz's ratio) เกณฑ์การยอมรับคือค่า HORRAT < 2 ผลการศึกษาค้นหาความเที่ยง ตามตาราง 8.8 พบว่าค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.2-1.8 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัว

ตาราง 8.8 แสดงค่า % recoveries และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เพื่อตรวจสอบความเที่ยง (precision)

Compounds	Concentration (n=6-10)					
	0.02* µg/g		0.1 µg/g		2.00 µg/g	
	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT
Methamidophos	109-120	1.6	113-120	1.3	95-120	1.5
Dichlorvos	65-115	1.8	71-110	0.7	66-97	0.7
Mevinphos	60-90	0.4	72-98	0.3	74-102	0.3
Omethoate	60-89	1.7	70-101	1.2	73-100	1.1
Dicrotophos	65-95	0.9	97-112	0.5	98-110	0.3
Monocrotophos	63-85	1.2	75-103	1.2	72-110	1.0
Dimethoate	76-118	0.5	95-118	0.2	96-105	0.3

Compounds	Concentration (n=6-10)					
	0.02* µg/g		0.1 µg/g		2.00 µg/g	
	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT
Diazinon	81-120	0.6	87-102	0.4	82-110	0.5
Parathion-methyl	65-90	0.8	89-94	0.3	82-91	0.5
Fenitrothion	61-84	0.5	76-90	0.3	97-108	0.3
Pirimiphos- methyl	75-120	1.3	70-101	1.1	71-97	0.4
Malathion	95-102	0.5	92-101	0.4	90-110	0.4
Chlorpyrifos	60-78	0.3	71-119	0.2	85-110	0.1
Parathion	65-85	0.5	70-87	0.5	93-109	0.4
Pirimiphos	72-95	0.6	81-105	0.1	98-108	0.2
Methidathion	85-108	0.9	96-109	0.4	89-105	0.5
Prothiophos	80-96	0.8	90-104	0.5	83-98	0.4
Profenofos	68-118	1.3	78-99	0.5	79-110	0.5
Ethion	77-96	0.2	82-115	0.2	76-105	0.3
Triazophos	91-110	1.1	91-104	1.0	97-107	0.8
EPN	80-97	0.7	86-117	1.0	83-106	0.8
Phosalone	78-85	0.2	80-85	0.1	82-89	0.1
Azinphos	62-79	1.4	62-80	0.9	68-98	1.0

* ความเข้มข้นสำหรับ fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ระดับต่ำ คือ 0.02 µg/g ยกเว้น methamidophos, dichlorvos, omethoate, monocrotophos, และ azinphos ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับ 0.05 µg/g

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดสารพิษตกค้างในหอมแดง และศึกษาคุณลักษณะของวิธีทดสอบสำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต 23 ชนิด ได้แก่ ไดคลอรวออส, เมตามิโดฟอส, เมวินฟอส, ไดอะซินนอน, โอเมโทเอต, ไดโครโทฟอส, โมโนโครโทฟอส, ไดเมโทเอต, พิริมิฟอส เมทิล, คอร์ไพริฟอส, พาราไทออน เมทิล, พิริมิฟอส, มาลาไทออน, เพนิโตรไทออน, พาราไทออน, โพรไทโอฟอส, เมทิดาไทออน, โพรพิโนฟอส, ไตรอะโซฟอส, อีไทออน, อีพีเอ็น, โฟซาโลน, และ อะซินฟอส โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์

วิธีการสกัดหอมแดงจะดัดแปลงมาจากวิธีของ QuEChERS คือ โดยการชั่งตัวอย่างหอมแดง 10 กรัม ใส่ในหลอดเซนติพิวพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 1 กรัมของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 4 กรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) และเติมตัวทำละลายผสมแอสีโตนกับไดคลอโรมีเทน (1:1) 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนใสขึ้นบน ใส่ในหลอดเซนติพิวพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เพื่อให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ โดยการเติม 150 มิลลิกรัมของ primary secondary amine (PSA) และ 300 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ตูดส่วนใสขึ้นบน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติพิวพลาสติกแบบมีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพิ่มความเข้มข้นโดยการเป่าด้วยไนโตรเจนให้สารละลายระเหยจนเกือบแห้งและนำมาปรับปริมาตรด้วยเอทิลอะซิเตต 2 มิลลิลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

มีการศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสในหอมแดง คือ ตรวจสอบช่วงการใช้งาน ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ชัดจำกัดในการตรวจพบ ชัดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความเที่ยง ภายใต้เงื่อนไขของวิธีที่พัฒนาพบว่าช่วงการใช้งาน ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดี คือ ช่วง 0.02-2.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ให้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 ยกเว้น เมทามิโดฟอส, ไดคลอรวอส, โอมิโทเอต, โมโนโครโทฟอส, และอะซินฟอส มีช่วงการใช้งาน 0.05-2.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ชัดจำกัดของการตรวจพบมีค่าอยู่ในช่วง 0.006-0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม ชัดจำกัดของการหาเชิงปริมาณมีค่าอยู่ในช่วง 0.02-0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม การหาค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 60-120%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 63-120%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 64-118% ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ประเมินค่าอยู่ในช่วง 0.2-1.8 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัว

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสในหอมแดงโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ ข้อดีคือใช้สารเคมีน้อย มีการใช้เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยาก มีการศึกษาคุณลักษณะของวิธีทำให้เกิดความมั่นใจว่าผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลกมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือตามหลักวิชาการและสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ได้จริงในห้องปฏิบัติการ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

คณะผู้ทำงานวิจัยขอขอบคุณ คุณสมเพชร พรหมเมืองดี ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก และคุณยสิษฐ์ อินทรสถิตย์ ผู้อำนวยการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต ที่ให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณข้าราชการและพนักงานราชการในกลุ่มที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาโดยตลอด

12. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549, แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว,

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

กรมส่งเสริมการเกษตร, หอมแดง [ออนไลน์], 1 กรกฎาคม /2557. แหล่งที่มา:

<http://www.arda.or.th/kasetinfo/north/plant/shallot.html>

Zweig, G. Chromatographic techniques for pesticide residue analysis. Chromatographic Reviews 6 (1964): 110–128.

Steinwandter, H. Universal 5-min on-line method for extracting and isolating pesticide residues and industrial chemicals. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 322 (1985): 752-754.

Torres, C.M.; Pico, Y.; and Mafies, J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables: a review. Journal of Chromatography A 754 (1996): 301-331.

Kataoka, H.; Lord, H.L; and Pawliszyn, J. Application of solid-phase microextraction in food analysis. Journal of Chromatography A 880 (2000): 35–62.

Buldini, P.L.; Ricci, L.; and Sharma, J.L. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis – a review. Journal of Chromatography A 975 (2002): 47-70.

Arrebola, F.J.; J.L., Martinez Vidal, M.J.; Gonzalez-Rodriguez, A.; and Sanchez-Morito, N. Reduction of analysis time in gas chromatography application of low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of pesticide residues in vegetables. Journal of Chromatography A 1005(2003):131 - 141.

- Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. AOAC International (2007).
- Lambropoulou , D. A.; and Albanis, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389 (2007): 1663–1683.
- Beyer, A.; and Biziuk, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. Food Chemistry 108 (2008): 669–680.
- Silva, M.G.D.; Aquino, A.; Dorea, H.S.; and Navickiene, S. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. Talanta 76 (2008): 680-684.
- Menezes-Filho, A.; Santos, F.N.; and Paula-Pereira, P.A. 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.