

ผลการปฏิบัติงาน
ประจำปีงบประมาณ 2554

เล่ม 2

ส.ป.ผ.
2554

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร

ผลการปฏิบัติงาน
ประจำปีงบประมาณ 2554

เล่ม 2

ISBN : 978-974-436-829-4

ส.ป.ผ.
2554

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร

ผลการปฏิบัติงาน
ประจำปีงบประมาณ 2554

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ISBN : 978-974-436-829-4

เล่ม 2

คณะผู้จัดทำ

ที่ปรึกษา :

ณัญจณา	ลือตระกูล	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ยศพร	จันทชุม	ผู้อำนวยการกลุ่มบริหารโครงการวิจัย

รวบรวมข้อมูล :

ให้พร	กิตติกูล	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ณัฐธิดา	ทองนาค	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย

จัดทำรูปเล่ม :

ให้พร	กิตติกูล	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ณัฐธิดา	ทองนาค	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ผกาสินี	คล้ายมาลา	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
ปัญจพร	เลิศรัตน์	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สุปรานี	มั่นหมาย	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา

จำนวนพิมพ์ : 250 เล่ม

พิมพ์เมื่อ : สิงหาคม 2555

สถานที่ติดต่อ : กลุ่มบริหารโครงการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0-2579-1577-8 ต่อ 2101-5
โทรสาร 0-2579-1577

พิมพ์ที่ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด สันสวย อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี
โทรศัพท์ 0-2584-7202

คำนำ

เอกสาร “ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2554 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร” ได้จัดทำขึ้นโดยกลุ่มบริหารโครงการวิจัยร่วมกับ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร และศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร วัตถุประสงค์ของการจัดทำเอกสารครั้งนี้เพื่อเป็นการเผยแพร่ผลการปฏิบัติงานที่ได้ดำเนินการในรอบปีงบประมาณ 2554 ของสำนักฯ

เอกสารผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2554 ของสำนักฯ มีทั้งหมด 2 เล่ม โดยเอกสารเล่มนี้เป็นเล่มที่ 2 ประกอบด้วยผลงานวิจัยและพัฒนาของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร จำนวน 21 เรื่อง กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี จำนวน 3 เรื่อง และศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จำนวน 1 เรื่องตามลำดับ

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ขอขอบคุณกลุ่มบริหารโครงการวิจัยและนักวิชาการจากกลุ่มวิจัยและศูนย์ฯ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือด้านการประสานงาน รวบรวมและส่งข้อมูลผลการปฏิบัติงานให้กลุ่มบริหารโครงการวิจัยตลอดจนร่วมจัดทำรูปเล่มจนสำเร็จ ในการนี้สำนักฯ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเกิดประโยชน์แก่ผู้บริหาร นักวิชาการ อาจารย์ นักศึกษา และตลอดจนผู้ที่สนใจในการนำความรู้ไปปรับใช้และต่อยอดงานวิจัยในอนาคตหรือใช้ในธุรกิจและชีวิตส่วนตัวของท่านนอกจากนี้ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพ ประสิทธิผล ของการใช้จ่ายงบประมาณแผ่นดินอันจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติเป็นส่วนรวมด้วย

(นางณัญจณา ลือตระกูล)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
สิงหาคม 2555

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร	
1. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตรกลุ่มสารกำจัดแมลง Dimethoate *โดย : พิเชษฐ์ ทองละเอียด และคณะ*	1
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Cypermethrin *โดย : จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม และคณะ*	18
3. วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบพิษตกค้างของอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอท ในผักผลไม้ *โดย : อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ และคณะ*	30
4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphorus pyrethroid และ endosulfan ในมะม่วง โดยวิธี QuEChERS ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-ECD/FPD) *โดย : ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล และคณะ*	42
5. การสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรม : แม่น้ำท่าจีน *โดย : มลิสา เวชยานนท์ และคณะ*	51
6. ศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชในนาข้าว : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน *โดย : ปรีชา ฉัตรสันติประภา และคณะ*	64
7. ศึกษาการสลายตัวและการสะสมของสารกำจัดวัชพืชในผลผลิตของข้าว : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน *โดย : ปรีชา ฉัตรสันติประภา และคณะ*	73
8. ศึกษาการสลายตัวและสะสมของสารกำจัดวัชพืช กลุ่ม chlorinated phenoxy compound ในดิน น้ำ และตะกอนในแหล่งปลูกข้าวและพืชไร่ : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน *โดย : ภิญญา จุลินทร และคณะ*	80
9. ศึกษาผลกระทบจากการใช้สารกำจัดวัชพืช กลุ่ม chlorinated phenoxy compound ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งปลูกข้าวและพืชไร่ : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน *โดย : ภิญญา จุลินทร และคณะ*	88

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
10. ศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่น สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม triazines ในพืชสวนและพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อยศึกษาการสลายตัวและสะสมของสารกำจัดวัชพืช กลุ่ม triazines ในผลิตผล พืชสวนและพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อย *โดย : วิภา ตั้งนิพนธ์ และคณะ*	94
11. ศึกษาการสลายตัวและสะสมสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ในดิน น้ำ และตะกอนในแหล่งปลูกพืชสวนและพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อย *โดย : ผกาสินี คล้ายมาลา และคณะ*	115
12. ศึกษาผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งปลูกพืชสวนและพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อย *โดย : ผกาสินี คล้ายมาลา และคณะ*	127
13. การสะสมและการแพร่กระจายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมแหล่งปลูกส้มพื้นที่สูงภาคเหนือ *โดย : ภิญญา จุลินทร และคณะ*	137
14. ผลกระทบของสารพิษกลุ่ม Organophosphorus และCarbamate ต่อ Biotransformation enzymes ในสัตว์น้ำ และChlorophyll content ในพืชน้ำ : กลุ่ม Organophosphorus ชนิด Chlorpyrifos *โดย : สิริพร เหลืองสุชนกุล และคณะ*	154
15. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ในน้ำ *โดย : ผกาสินี คล้ายมาลา และคณะ*	175
16. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงและสารกำจัดวัชพืชในดินและน้ำโดยใช้ Gas chromatography/Mass Spectrometry: พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน *โดย : มลิสา เวชยานนท์ และคณะ*	187
17. การวิเคราะห์คาร์เบนดาซิม / เบนโนมิล / ไธอะเบนดาโซลตกค้างในหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีอิมมิวโนเอสเส (Immunoassay) *โดย : อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ และคณะ*	196
18. การวิเคราะห์ไซเปอร์เมทรินตกค้างในพริกโดยวิธีอิมมิวโนเอสเส (Immunoassay) *โดย : อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ และคณะ*	204

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
19. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในชะอมโดยใช้เทคนิค chromatography: พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphorus *โดย : จินตนา ภู่มงกุฎชัย และคณะ*	213
20. การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า *โดย : สิบเอกอิสริยะ สืบพันธุ์ดี และคณะ*	224
21. การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Pyrethroids ในน้ำ โดยใช้ Gas Liquid Chromatograph *โดย : มลิสา เวชยานนท์ และคณะ*	232
กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี	
1. พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี *โดย : ทองจันทร์ พิมพ์เพชร และคณะ*	243
2. พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี *โดย : ทองจันทร์ พิมพ์เพชร และคณะ*	255
3. การให้บริการวิเคราะห์ตรวจสอบคุณสมบัติดินและน้ำ *โดย : กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ*	266
ศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร	
1. ระบบการไถพรวนดินและการปลูกพืชอายุสั้นตามด้วยการปลูกสับปะรด โดยไม่มีการไถพรวน *โดย : อรัญญ์ ขันติยวิชย์*	268

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มสารกำจัดแมลง Dimethoate

Method Validation of Dimethoate in Insecticide Formulation

พิเชษฐ์ ทองละเอียด ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

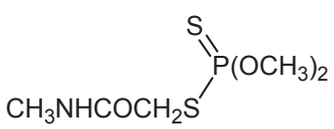
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดแมลง Dimethoate ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายการเกษตรด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เนื่องจาก วิธีการนี้ให้ค่า Range ในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.6-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 มีความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงสูตร EC ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) และการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) เป็น 0.249 และ 0.268 ตามลำดับ ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 0.589 และ 0.268 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex และตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการ จากค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ได้ร้อยละ 99.6 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC วิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายการเกษตร Dimethoate ที่เป็นงานประจำและต้องการผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

คำนำ



Dimethoaate มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC *O,O*-dimethyl *S*-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate; 2-dimethoxyphosphinothioylthio-*N*-methylacetamide มีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น *O,O*-dimethyl*S*-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] phosphorodithioate จัดอยู่ในกลุ่ม acylalinine มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_{12}NO_3PS_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 229.3 มีจุดหลอมเหลว 50.0-51.5 องศาเซลเซียส เป็นผลึกสีขาว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ 25 กรัมต่อลิตร ละลาย Methanol ได้มากกว่า 300 กรัมต่อลิตร ละลาย Dichlorometane ได้มากกว่า 300 กรัมต่อลิตร ละลาย Carbon tetrachloride ได้มากกว่า 50 กรัมต่อลิตร มีความคงทน (stable) คงต่อสภาวะที่เป็นกรด

(pH 2-7) จะเกิดขบวนการ hydrolysis ในสภาวะที่เป็นด่าง pH 9 มีค่าครึ่งชีวิต 12 วัน ในด้านสิ่งแวดล้อม โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่า Dimethoate มีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมน้อยถ้ามีการใช้อย่างถูกวิธี โดยในอากาศมีครึ่งชีวิตอยู่ที่ 2-4.1 วัน บนผิวดินอยู่ที่ 7-16 วัน และมีการลงสู่น้ำใต้ดินได้น้อยเนื่องจากมีการย่อยสลายได้รวดเร็วในดิน

ในด้านวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีอ้างอิงใน CIPAC Handbook H (Dobrat and Martijn, 1998) ซึ่งระบุใช้สารมาตรฐานในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อการเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1 ซ้ำ ดังนั้น เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่น (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล จึงจำเป็นต้องศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้น พร้อมตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร Dimethoate จากวิธีมาตรฐานที่กำหนด CIPAC Handbook เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และเหมาะต่อการใช้งาน

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Dimethoate ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง และแม่นยำยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือแก่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบวัตถุมีพิษการเกษตร

อุปกรณ์ และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง GLC ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5)
3. หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
4. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 100% dimethylpolysiloxane (DB-1) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
5. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. Ultrasonic bath
7. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. ปิเปตชนิด type A ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
9. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
10. กรวยแก้วก้านยาว
11. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Dimethoate 98.5%
2. สารเข้มข้น Dimethoate (Technical grade, TC) 90%AI
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สูตร Emulsifiable concentrates (EC) 40%AI
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Dimethoate

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ด้วย HP-5 capillary column ดังนี้

อุณหภูมิ Oven	:	210	องศาเซลเซียส		
Injector	:	280	องศาเซลเซียส		
Detector	:	280	องศาเซลเซียส		
สภาวะ Injector	:	split ratio 50 :1			
ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H_2	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
		Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N_2	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Dimethoate หนัก 10 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) 2 ซ้ำ (C_A, C_B) ใส่ขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสาร Technical grade

ชั่งสาร Technical grade ที่คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วหนัก 25 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) 15 ซ้ำ (T_1 - T_{15}) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสภาวะการใช้งาน และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1% แล้วฉีดสารละลายเพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ดังนี้

C_A, T_{1-1}, T_{1-2}, C_B, T_{2-1}, T_{2-2}, C_A, ...

2.4 การคำนวณ

2.4.1 ค่า response factor

$$f = W \times P / A$$

W = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็น มิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของ Dimethoate ในสารมาตรฐาน หน่วยเป็น เปอร์เซนต์

A = peak area ของ Dimethoate ในสารละลายมาตรฐาน

2.4.2 ปริมาณ Dimethoate ในสาร Technical grade

$$M = As \times f / Ws$$

As = peak area ของ Dimethoate ในสารละลาย Technical grade

Ws = น้ำหนักสาร Technical grade หน่วยเป็น มิลลิกรัม

M = ปริมาณ Dimethoate ในสาร Technical grade หน่วยเป็น เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range / Linear) ของวิธีการ

3.1 หาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Dimethoate ครอบคลุมช่วงการใช้งาน รวม 6 ความเข้มข้น หนัก 5.5, 27.5, 55.5, 82.5, 110.0 และ 137.5 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Dimethoate (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.1.4 พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Dimethoat 5 ความเข้มข้น หนัก 33, 44, 55, 66, และ 77 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Dimethoate (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.2.5 พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

4. ตรวจสอบความแม่น (Precision) ของวิธีการ

4.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (Repeatability)

ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 52, 65 และ 78 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ที่เตรียม (ข้อ 4.1.1) เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินค่า HORRAT โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

4.1.2 การคำนวณ

$$HORRAT = \%RSD_{exp.} / \%RSD_{Horwitz}$$

$$\%RSD_{Horwitz} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{intra-lab.}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

4.2 ตรวจสอบความทำซ้ำ (Intermediat reproducibility)

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ขึ้นใหม่ตามข้อ 4.1.1 (ต่างวันกัน) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และประเมินค่า HORRAT ของปริมาณ Dimethoate จากข้อ 4.1.2 และ 4.2 ดังนี้

$$HORRAT = \%RSD_{exp.} / \%RSD_{Horwitz}$$

$$\%RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{inter-lab.}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

5. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการ

5.1 ตรวจสอบ Robustness

5.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะการใช้งาน ใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 (5% phenyl methyl siloxane)

5.1.1.1 เตรียมสารละลายของสาร Techniical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน หนัก 33, 44, 55, 66, และ 77 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องเพื่อสร้างกราฟ

5.1.1.2 ชั่งสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC คลุกเคล้าแล้ว หนัก 52, 65 และ 78 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.1 ปรับเปลี่ยนสภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.2 ฉีดสารละลายของสาร Techniical grade (ข้อ 5.1.1.1) เพื่อสร้างกราฟ

5.1.2.3 ฉีดสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC (ข้อ 5.1.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.3 การประเมินค่า HORRAT

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 5.1.1.2 และ 5.1.2.3 มาคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HORRAT ตามข้อ 4.2

5.2 ตรวจสอบ Ruggedness

5.2.1 เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ตามข้อ 4.1.1 และเตรียม Technical grade (ข้อ 3.2.2) เพื่อสร้างกราฟ โดยมีการวิเคราะห์ต่างวันกันแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4)

5.2.2 นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ของผลิตภัณฑ์สูตร EC จากข้อ 5.2.1 นำมาร่วมคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HORRAT ตามข้อ 4.2

6. ตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech (5 mg AI / ml)

ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว หนัก 1,395 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 2, 5 และ 8 มิลลิลิตรใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของสาร Technical grade ที่มีความเข้มข้นของ Dimethoate เป็น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้น

6.3 เตรียมสารละลาย Stock Sample (1 mg AI / ml)

ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 2,777 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ตามลำดับใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร

เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.4 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) มา 10 มิลลิลิตร 10 ซ้ำใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร รวม 10 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.5 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) อยู่ 10 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ รวม 30 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4-6.5) มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = (A_{spike} - A_{origin}) \times 100 / A_{add}$$

A_{spike} = ปริมาณ Dimethoate ในสารละลาย Spike

A_{origin} = ปริมาณ Dimethoate ในสารละลาย Origin

A_{add} = ปริมาณ Dimethoate ที่เติมลงในสารละลาย Spike

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด) ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุมีพิษ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง และวิจารณ์

ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง เมื่อตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้ผลการคำนวณค่า response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกินร้อยละ 1 (ตารางที่ 1) และตรวจหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เทียบกับสารละลายมาตรฐาน (รูปที่ 1) ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 89.5 (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.1 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2) จึงตรวจสอบค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.6 - 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 3)

ในด้านความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC พบว่า การทวนซ้ำ (Repeatability) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.137 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.406 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.249 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วนการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.224 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.661 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.286 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า Robustness มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.489 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 1.453 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.589 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และพบว่า Ruggedness มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.224 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.661 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.268 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

กรณีความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC มีค่าเป็นร้อยละ 99.6 (ตารางที่ 9)

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ตามที่ระบุใน CIPAC Handbook H (Dobrat and Martijn, 1998) เป็นการใช้ Pac column ในการแยกสาร และ การศึกษาทดลองนี้ได้พัฒนาใช้ Capillary column ซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสารสูงกว่าแทน และปรับเปลี่ยนปริมาณการใช้สารมาตรฐาน เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการ โดยหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นสูงก่อน เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารมาตรฐานซึ่งมีราคาแพงมาก ในขั้นตอนต่างๆ โดยเฉพาะการตรวจสอบความถูกของวิธีการ ที่ต้องมีการใช้สารมาตรฐานเติมลงในสารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 30 ซ้ำ และผลของการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆ สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล วิธีการนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ Dimethoate ของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. วิธีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดโรคพืช โดยใช้เทคนิควิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ที่มีตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย HP-5 capillary column ซึ่งมีสภาวะการใช้งาน ดังนี้

อุณหภูมิ	Oven	:	210	องศาเซลเซียส	
	Injector	:	280	องศาเซลเซียส	
	Detector	:	280	องศาเซลเซียส	
สภาวะ	Injector	:	split ratio 50 :1		
ก๊าซตัวพา		:	He	อัตราการไหล	2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H_2	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
		Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N_2	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การเตรียมสารละลายเพื่อการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Dimethoate ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ Dimethoate 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่างให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

3. วิธีการนี้มีค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.6-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998

4. ความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC เมื่อทดสอบค่าการทวนซ้ำ (Repeatability) และการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) นำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.661 และ 0.27 ตามลำดับ ซึ่งยอมรับได้ เนื่องจากไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

5. การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า ยอมรับได้ เนื่องจากเมื่อนำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ของ Robustness และ Ruggedness ได้เป็น 0.589 และ 0.268 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

6. ความถูก (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoete ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงสูตร EC มีค่าร้อยละ 99.6 อยู่ในช่วง 95-105% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 0.1% ของ AOAC

เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. **การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชาลีธุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.

Dobrat, W. and A. Martijn. 1998. **CIPAC Handbook-Vol. H. : Analysis of Technical and Formulated Pesticides**. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limiited, Black Bear Press Ltd., England.

Kidd, H. and D.R. James (Eds). 1993. **The Agrochemicals Handbook**. 3rd. ed. MethodsRoyal Society of Chemistry, England.

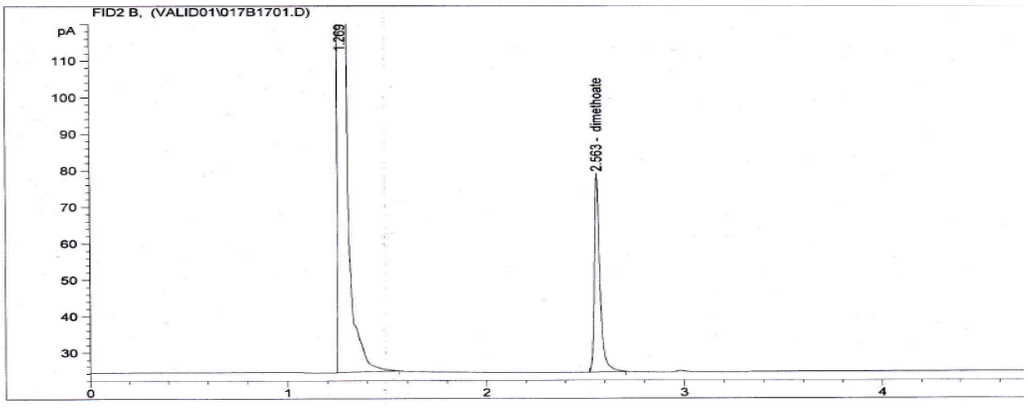
Gunter Zweig. and Joseph Sherma. 1972. **Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators. Vol.6**

ตารางที่ 1. การปรับตั้งเครื่องก่อนการวิเคราะห์ (Std. Purity 98.5 %, in 10 ml.)

Std. Soln.	Mg	Area	f = Ws * P / Vs * As	% diff.
A	10.3	107.70036	0.9420	0.3190
C_B	11.1	114.90313	0.9515	-0.6893
C_A	10.3	108.23396	0.9374	0.8104
C_B	11.1	115.49756	0.9466	-0.1711
C_A	10.3	107.56045	0.9432	0.1894
C_B	11.1	115.167245	0.9494	-0.4584
		Mean	0.9450	

หมายเหตุ : f = Response factor

% diff. = ร้อยละของการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย



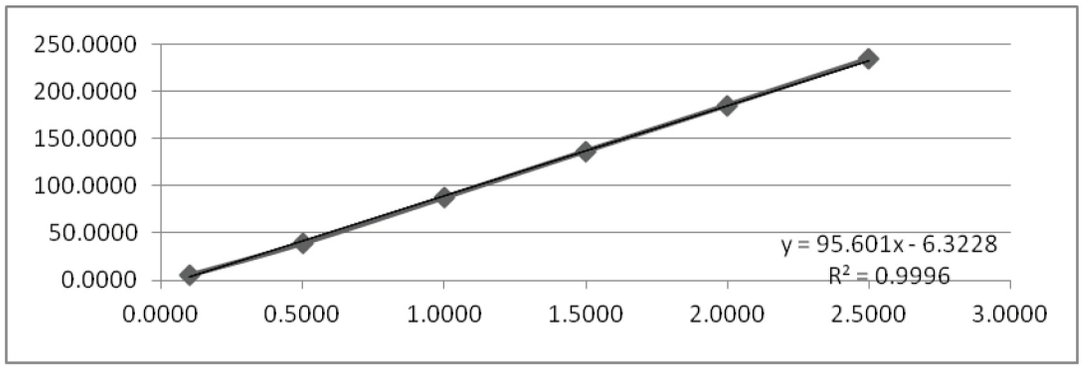
รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Dimethoate

ตารางที่ 2. การหาปริมาณ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์สูตร Tech.

mg. Tech	%w/w
24.4	89.37
27.8	90.54
27.4	91.37
24.0	90.56
27.9	90.14
25.5	88.70
25.4	88.67
25.1	89.44
22.6	88.03
26.8	89.98
25.6	88.61
27.4	90.37
23.5	88.99
24.5	89.85
23.0	89.14
Mean	**89.58**

ตารางที่ 3. การหาช่วงของการวัด (Range)

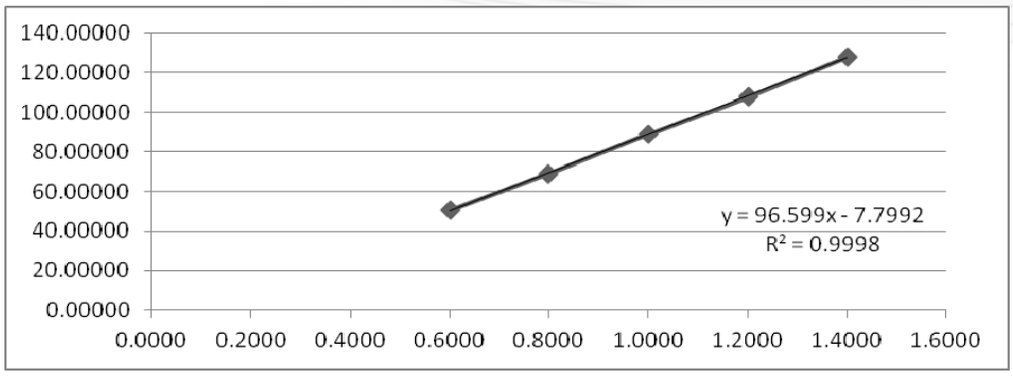
mg AI, Tech / ml	Area
0.1000	5.9428
0.4999	39.5514
0.9997	87.7548
1.4996	136.5815
1.9994	184.9095
2.4993	233.6935



รูปที่ 2 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

ตารางที่ 4. การหาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวัด (Linearlity)

mg AI, Tech / ml	Area
0.6005	50.50050
0.7983	69.0509
1.0008	88.9681
1.2011	107.6753
1.4012	127.989
corr.coef. (r)	0.9998



รูปที่ 3 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตารางที่ 5. ตรวจสอบ Repeatability ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w
51.8	33.72
51.5	34.10
51.1	33.86
50.8	33.90
50.7	33.81
49.8	33.98
51.3	33.79
51.6	33.94
50.2	33.98
49.5	33.67
64.7	33.78
63.9	33.69
64.6	33.81
63.4	33.74
64.3	34.03
62.9	33.83
64.7	33.98

mg. Sample	%w/w
64.0	33.90
63.0	33.96
63.8	33.89
78.5	33.86
78.9	33.56
77.2	33.78
76.7	34.05
78.8	33.84
77.6	33.98
78.4	33.98
76.3	33.76
76.9	33.56
78.1	34.00
Mean	33.858
SD	0.137
%RSD	0.406

$\%RSD_{HOR} = 0.66x2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66x2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 0.66x2^{1.301}$

$= 1.626$

$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 0.406 / 1.626$

$= 0.249$

ตารางที่ 6. ตรวจสอบ Intermediat reproducibility ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w
51.8	33.72
51.5	34.10
51.1	33.86
50.8	33.90
50.7	33.81
49.8	33.98
51.3	33.79
51.6	33.94
50.2	33.98
49.5	33.67
64.7	33.78
63.9	33.69
64.6	33.81
63.4	33.74
64.3	34.03
62.9	33.83
64.7	33.98
64.0	33.90
63.0	33.96
63.8	33.89
78.5	33.86
78.9	33.56
77.2	33.78
76.7	34.05
78.8	33.84
77.6	33.98
78.4	33.98
76.3	33.76
76.9	33.56
78.1	34.00

mg. Sample	%w/w
55.1	33.26
55.0	33.05
55.2	33.22
55.0	33.57
55.1	33.78
55.5	33.89
55.3	33.80
55.6	34.15
55.0	34.08
55.9	34.23
66.2	33.50
66.1	33.79
66.0	33.82
66.3	34.04
66.1	34.05
66.2	33.96
66.1	33.93
66.2	34.10
66.2	34.19
66.2	34.06
77.2	33.96
77.3	33.84
77.1	34.12
77.2	34.04
77.2	34.05
77.1	33.87
77.1	33.74
77.1	33.88
77.2	33.98
77.2	33.98
Mean	33.861
SD	0.224
%RSD	0.661

$\%RSD_{HOR} = 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{1.301}$

$= 2.464$

$= 0.268$

$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 0.661 / 2.464$

ตารางที่ 7. ตรวจสอบ Robustness ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w
51.8	33.06
	34.24
51.5	32.36
	32.6
51.1	33.23
	32.76
50.8	34.06
	34.82
50.7	33.69
	33.54
49.8	33.67
	33.73
51.3	33.18
	33.32
51.6	32.8
	33.82
50.2	33.77
	34
49.5	34.01
	34.3
64.7	33.85
	34.18
64.6	33.83
	33.83
64.3	34.25
	33.56
63.4	34.19
	33.77
62.9	33.84
	35.27

mg. Sample	%w/w
64.7	34.22
	33.52
66.3	33.89
	33.61
65.5	33.65
	32.68
63.8	33.79
	32.99
66.1	33.35
	33.16
78.5	33.41
	33.41
78.9	33.83
	33.82
77.2	33.64
	33.61
76.7	33.81
	33.73
78.8	33.83
	33.83
77.6	33.54
	33.54
76.3	33.93
	33.83
78.4	33.61
	33.6
76.9	33.93
	33.88
78.1	33.8
	33.81
mean	33.679
SD	0.4896
%RSD	1.453

$\%RSD_{HOR} = 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{1.301}$

$= 2.464$

$= 0.589$

$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 1.453 / 2.464$

ตารางที่ 8. ตรวจสอบ Ruggdness ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w
51.8	33.72
51.5	34.10
51.1	33.86
50.8	33.90
50.7	33.81
49.8	33.98
51.3	33.79
51.6	33.94
50.2	33.98
49.5	33.67
64.7	33.78
63.9	33.69
64.6	33.81
63.4	33.74
64.3	34.03
62.9	33.83
64.7	33.98
64.0	33.90
63.0	33.96
63.8	33.89
78.5	33.86
78.9	33.56
77.2	33.78
76.7	34.05
78.8	33.84
77.6	33.98
78.4	33.98
76.3	33.76
76.9	33.56
78.1	34.00

mg. Sample	%w/w
55.1	33.26
55.0	33.05
55.2	33.22
55.0	33.57
55.1	33.78
55.5	33.89
55.3	33.80
55.6	34.15
55.0	34.08
55.9	34.23
66.2	33.50
66.1	33.79
66.0	33.82
66.3	34.04
66.1	34.05
66.2	33.96
66.1	33.93
66.2	34.10
66.2	34.19
66.2	34.06
77.2	33.96
77.3	33.84
77.1	34.12
77.2	34.04
77.2	34.05
77.1	33.87
77.1	33.74
77.1	33.88
77.2	33.98
77.2	33.98
Mean	33.861
SD	0.224
%RSD	0.661

$\%RSD_{HOR} = 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{1.301}$

Horrat $= \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 0.661 / 2.464$

$= 0.268$

N	Al content (mg / 25 ml)								
	Concn. (0.4 mg / ml)			Concn. (0.6 mg / ml)			Concn. (0.8 mg / ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	8.23	18.10	10.00	8.04	23.18	15.00	8.23	28.56	20.00
2	8.25	18.03	10.00	8.16	23.04	15.00	8.29	28.52	20.00
3	8.39	18.17	10.00	8.09	23.21	15.00	8.24	28.70	20.00
4	8.22	17.88	10.00	8.19	23.11	15.00	8.12	28.84	20.00
5	8.38	17.96	10.00	8.26	23.01	15.00	8.15	28.91	20.00
6	8.37	17.85	10.00	8.14	23.07	15.00	8.18	28.65	20.00
7	8.44	18.33	10.00	8.16	23.02	15.00	8.32	28.79	20.00
8	8.39	18.18	10.00	8.18	23.21	15.00	8.28	28.79	20.00
9	8.37	18.14	10.00	8.20	23.20	15.00	8.30	28.24	20.00
10	8.21	18.09	10.00	8.28	23.13	15.00	8.29	28.24	20.00
mean	8.33	18.07	10.00	8.17	23.12	15.00	8.24	28.62	20.00
SD	0.09	0.15		0.07	0.08		0.07	0.24	
%RSD	1.04	0.81		0.88	0.35		0.84	0.82	
%Recov			97.48			99.65			101.92

%Recovery = 99.683

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Cypermethrin

Method Validation of Cypermethrin in Pesticide Formulations

จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม ยุพดี จิตรไพศาล จิราพรรณ ทองหยอด

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง สูตรผสมชนิด EC ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยมีตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) ด้วยแคพิลลารี่คอลัมน์ HP-5 (30 m × 0.32 mm (id.) 0.25 µm film thickness) ใช้ He เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 220°C นาน 3 นาที อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 20°C/min จนถึง 240°C นาน 14 นาที อุณหภูมิการฉีด 270°C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270°C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µl วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 3.0 mg/ml ให้ค่าช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.4 – 2.0 mg/ml ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) พิจารณาจาก % Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 mg/ml ได้ค่าเฉลี่ย % Recovery เท่ากับ 98.6 เกณฑ์ยอมรับ AOAC % Recovery เท่ากับ 98 – 102 ความเที่ยง (Precision) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.755 ตรวจสอบค่า Robustness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.685 ตรวจสอบค่า Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.818 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≥ 2 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ได้ที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

คำนำ

สารป้องกันและกำจัดแมลง cypermethrin เป็นสารกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (pyrethriods) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตาย ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น (*RS*)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1*RS*,3*RS;* 1*RS*,3*SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol.1C โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในสภาวะ Normal Phase ด้วยคอลัมน์ Spherisorb S 5W สารละลายตัวพา 0.05% (v/v) ของเอทิลอะซิเตต ในไอโซออกเทน ตัวตรวจจับที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร ใช้เมทิลเบนโซเอท เป็นสารมาตรฐานภายใน และเทคนิค GC-FID เป็นเทคนิคที่ดีและรวดเร็ว โดยตาม CIPAC ใช้ Packed column ชนิด

Chromosorb W-HP silicone เคลือบบน OV-101 คอลัมน์แก้วขนาด 1m x 4 mm i.d. อุณหภูมิคอลัมน์ 235 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการฉีดสาร 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจจับ 250 องศาเซลเซียส ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาอัตรา 0.05 ลิตรต่อนาที ใช้ di-(2-ethylhexyl) phthalate เป็นสารมาตรฐานภายใน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะ Normal Phase ได้ค่า repeatability (r) เท่ากับ 1.1 ในผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์ระหว่าง 20 – 40 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิค GC-FID ด้วย packed column ได้ค่า repeatability (r) เท่ากับ 0.5 ในผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์ระหว่าง 20 – 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเทคนิค GC-FID ให้ค่าการวิเคราะห์ซ้ำของข้อมูลภายในห้องปฏิบัติการ น้อยกว่าเทคนิค HPLC แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค GC-FID ที่ใช้คอลัมน์ประเภท Capillary column ที่มีขนาดเล็กลง แต่ให้ประสิทธิภาพการแยกสารดียิ่งขึ้นกว่า Packed column

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin สูตร 35% (w/v) EC (Emulsifiable concntrate) โดยใช้เทคนิค GC-FID ที่ใช้ Capillary column ที่ทันสมัยในการแยกสาร สามารถให้ผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ซึ่งเป็นข้อกำหนด ข้อที่ 5.4.2 ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50, 100, 500 ,1000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน cypermethrin ความบริสุทธิ์ 99.0%
2. สารเข้มข้น (Technical material) ของ cypermethrin สูตร 92% min. Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ cypermethrin สูตร 35% (w/v) EC
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. **การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์** cypermethrin **สูตร** 92% min Tech.

เพื่อใช้สารเข้มข้นนี้แทนสารมาตรฐานที่มีราคาแพง และมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งกระบวนการตรวจสอบต้องเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง จึงใช้สารปริมาณมาก โดยวิธีวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง GC-FID

Capillary column	: HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm)
Oven temperature	: 220 ºC (3 min), 20 ºC/min – 240 ºC (14 min)
Injector temperature	: 270 ºC
Detector temperature	: 270 ºC
Split injection	: Split ratio 50 : 1
Carrier gas	: Helium 2.0 ml/min
Injection volume	: 1 µl
Run time	: 17 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน cypermethrin

ชั่งสารมาตรฐาน cypermethrin ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม (± 1.0 มิลลิกรัม) จำนวน 2 ซ้ำ (C_A,C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น cypermethrin

ชั่งสารเข้มข้น cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน 92% min Tech ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 100 มิลลิกรัม (±1.0 มิลลิกรัม) จำนวน 10 ซ้ำ (TC_1-TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID

เมื่อปรับตั้งสภาวะของเครื่อง GC-FID เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น cypermethrin ตามลำดับดังนี้

C_A, TC_1, TC_2, C_B, TC_3, TC_4, C_A,.....

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสูตรสารเข้มข้นสูง

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

$$f = \frac{S \times P}{H_S}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน cypermethrin หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน cypermethrin

จากนั้นคำนวณค่า % RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า % RPD แตกต่างกันไม่เกิน 3 % จากสูตร

$$\% \text{ RPD} = \frac{(\text{f of maximum} - \text{f of minimum})}{\text{F of average}}$$

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin (\% w/w)} = \frac{\text{Fave. X HW}}{\text{W}}$$

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin หน่วยเป็นมิลลิกรัม

$f_{avr.}$ = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin 35% (W/V) EC

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 ชั่งสารเข้มข้น cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีสารออกฤทธิ์ cypermethrin ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 2.4 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ที่เตรียมสภาวะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 3 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ ความเข้มข้น 0.4 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารเข้มข้น cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 1359.9 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone จนหลายๆ ครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.3943 0.9856 และ 1.9713 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC ปริมาณ 1457.2 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID ได้ค่า O

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น cypermethrin จากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 3, 5 และ 8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า F

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{F\text{-}0 \times 100}{C}$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร cypermethrin ในสารละลาย fortified sample, มก./25มล.

O คือ ปริมาณสาร cypermethrin ในสารละลาย original sample, มก./25มล.

C คือ ปริมาณ added sample, มก.

ค่าความแม่น ต้องได้ % Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารเข้มข้น cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 598.0 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 7 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.4334, 1.0836 และ 1.5170 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC

เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35% w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 30, 60 และ 100 มิลลิกรัม (± 5.0 มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

2.3.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{Horrat (Horwitz's ratio} = \frac{\%\ \text{RSD ที่ได้จากการสังเคราะห์}}{\text{Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี}}$$

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deriation} = \frac{SD \times 100}{X}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความแข็ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่ง ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันอีกอันหนึ่ง และภายใต้สภาวะเงื่อนไขอีกสภาวะหนึ่ง ดังนี้

Capillary column : HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.32 µm)

Oven temperature : 240 ºC, post run 250 ºC (1 min)

Injector temperature : 270 ºC

Detector temperature : 270 ºC

Split injection : Split ratio 50 : 1

Carrier gas : Helium 2.0 ml/min

Injection volume : 1 µl

Run time : 10 min

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 30, 60 และ 100 มิลลิกรัม (±5.0 มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC-FID เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{Horrat (Horwitz's ratio} = \frac{\text{\% RSD ที่ได้จากการสังเคราะห์}}{\text{Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี}}$$

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deriation} = \frac{SD \times 100}{X}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2553 ถึงเดือน กันยายน 2554

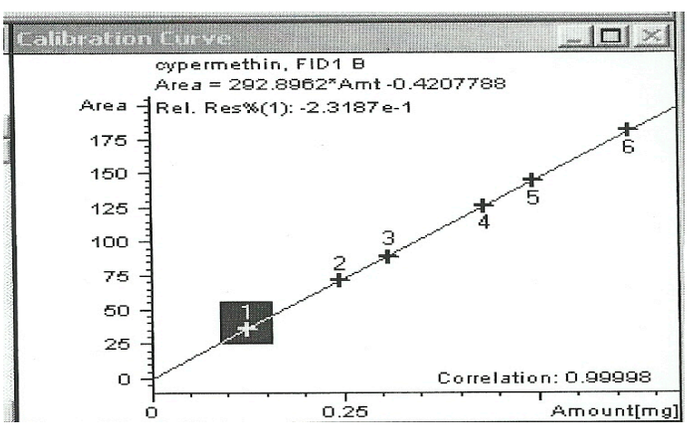
สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูตร 92 %w/w Tech เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 90.6

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้น 0.2 - 3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.4 – 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่ามีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 (ภาพที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$



ภาพที่ 1 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การตรวจสอบค่าความแม่น (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin 35 % w/v EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ คำนวณค่า % Recovery เท่ากับ 97.3 98.0 และ 100.43 ตามลำดับ ได้ค่าเฉลี่ย 98.6 (ตารางที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง % Recovery เท่ากับ 98-102 พิจารณาตามเกณฑ์ที่มีปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10% ค่าความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถครอบคลุมช่วงที่ใช้งานการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นหมายความว่า ถ้าผู้วิเคราะห์เตรียมสารละลายตัวอย่างสูงกว่าหรือต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้งานจริง สามารถให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องเช่นกัน

ตารางที่ 1. การตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC

Number	Active ingredient content (mg/25 ml)								
	Concn.(0.5 mg/ml)			Concn.(1.0 mg/ml)			Concn.(1.5 mg/ml)		
	Origin	Spilke	Added	Origin	Spilke	Added	Origin	Spilke	Added
1	10.061	24.482	14.785	10.061	34.320	24.641	10.061	48.281	39.426
2	10.061	24.436	14.785	10.061	34.351	24.641	10.061	49.925	39.426
3	10.061	24.447	14.785	10.061	34.141	24.641	10.061	49.817	39.426
4	10.061	24.408	14.785	10.061	34.084	24.641	10.061	48.545	39.426
5	10.061	24.497	14.785	10.061	34.386	24.641	10.061	50.357	39.426
6	10.061	24.513	14.785	10.061	34.298	24.641	10.061	50.085	39.426
7	10.061	24.368	14.785	10.061	34.161	24.641	10.061	48.849	39.426
8	10.061	24.504	14.785	10.061	34.448	24.641	10.061	50.021	39.426
9	10.061	24.464	14.785	10.061	34.276	24.641	10.061	49.969	39.426
10	10.061	24.396	14.785	10.061	33.704	24.641	10.061	50.465	39.426
% Recovery	97.3			98.0			100.4		

ค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 35.6 35.4 และ 35.4 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% $RSD_{exp.}$) เท่ากับ 1.382 0.645 และ 1.476 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จากทฤษฎี (% $RSD_{Horwitz.}$) เท่ากับ 1.546 และคำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.894, 0.417 และ 0.955 ได้ค่าเฉลี่ย 0.755 (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 2. การตรวจสอบ Precision ในผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)
1	36.4	35.695	67.8	35.895	119.3	35.493
2	31.5	36.246	67.4	35.357	111.5	35.084
3	31.3	36.605	60.2	35.164	103.0	36.581
4	38.4	35.109	64.7	35.335	102.8	35.103
5	28.1	35.229	64.5	35.307	104.8	36.158
6	39.2	35.846	69.4	35.160	101.8	35.264
7	32.6	35.255	69.8	35.710	105.8	35.188
8	32.8	35.277	67.4	35.400	104.7	35.289
9	35.7	35.417	74.9	35.368	102.2	35.120
10	34.8	35.393	73.7	35.440	104.2	35.015
Mean	-	35.61	-	35.41	-	35.43
SD		0.492		0.229		0.523
% $RSD_{exp.}$		1.382		0.645		1.476
Horwitz		1.546		1.546		1.546
HORRAT		0.894		0.417		0.955

สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness/Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 35.725 และ 35.23 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) สำหรับ Robustness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.851 0.849 0.354 ได้ค่าเฉลี่ย 0.685 Ruggedness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.426 1.034 0.993 ได้ค่าเฉลี่ย 0.818 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับโดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2 แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)	
	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness
1	36.689	35.786	35.139	35.369	35.391	35.046
2	35.468	35.429	36.266	35.849	35.369	34.499
3	36.113	35.742	36.475	35.189	35.211	34.296
4	35.336	35.243	36.217	35.411	35.685	34.941
5	35.656	35.453	35.756	35.167	35.604	34.475
6	36.176	35.536	35.922	35.824	35.538	35.561
7	35.442	35.563	35.584	34.308	35.316	35.096
8	35.858	35.657	35.387	34.838	35.542	35.626
9	36.438	35.127	35.280	34.472	35.851	35.916
10	35.442	35.856	36.260	34.412	35.343	35.296
Mean	35.86	35.54	35.83	35.08	35.48	35.08
SD	0.472	0.2343	0.470	0.5605	0.194	0.5389
% $RSD_{exp.}$	1.316	0.659	1.312	1.598	0.547	1.536
Horwitz	1.546	1.546	1.546	1.546	1.546	1.546
HORRAT	0.851	0.426	0.849	1.034	0.354	0.993

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลงโดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) มีตัวตรวจจับ (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย Capillary column ชนิด HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm) มีสภาวะเครื่องการใช้งาน ดังนี้

Oven temperature : 220 ºC (3 min), 20 ºC/min – 240 ºC (14 min)

Injector temperature : 270 ºC

Detector temperature : 270 ºC

Split injection : Split ratio 50 : 1

Carrier gas : Helium 2.0 ml/min

Injection volume : 1 µl

Run time : 17 min

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.4 – 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง พบว่า ได้ค่าเฉลี่ย % recovery เท่ากับ 98.6 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98 – 102% สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10%

สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.755 การตรวจสอบค่าความแข็ง Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน เวลา (reproducibility) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.685 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.818 เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT ≤ 2

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ cypermethrin ตามแหล่งจำหน่าย
2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธีตามมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (อัดสำเนา)

สถาบันอาหาร. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี เอกสารประกอบการอบรม สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. (อัดสำเนา)

Anonymous. 1993. **The Agrochemicals Handbook 3rd. ed.** The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.

Henriet J., A Martijn and H Povlsen. 1985. **CIPAC Handbook Vol. 1C : Analysis of Technical and Formulated Pesticides.** Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Heffers Printers Ltd, Cambride, England.

วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบพิษตกค้างของอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอท ในผักผลไม้

Research and Development of Ethion, Chlorpyrifos and Omethoate Residue Test Kits

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ[1] *ณัฏฐ์ชยธร ขัตติยะพุฒิเมธ*[2] *ยงยุทธ ไผ่แก้ว*[1]

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอทในผักผลไม้โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี่ (Thin layer chromatography, TLC) โดยนำแผ่นตรวจสอบของชุดตรวจสอบโพรเฟนโนฟอสมาประยุกต์ใช้ แต่มาปรับเปลี่ยนระบบแยกสารใหม่ โดยใช้ของเหลวที่เป็นตัวแยก 100 ระบบ คือ hexane : acetone อัตราส่วน 1-20:1, 1-20:2, 1-20:3, 1-20:4, 1-20:5 พบว่าระบบที่สามารถตรวจสารพิษตกค้างของอีไธออนในผักผลไม้ได้ คือ 4 : 1 โดยให้จุดสีเหลืองบนพื้นสีส้ม แล้วนำวิธีการนี้มาสกัดหาเปอร์เซนต์ การคืนกลับของสารพิษของวิธีตรวจสอบ (%Recovery) ในผักคะน้า ได้ 80-88% อีไธออนมีค่า Rf 0.47 สารอีไธออนมี Limit of determination 0.04 ppm. ตรวจสารพิษตกค้างของคลอไพริฟอสในผักผลไม้ได้ คือ 17:3 โดยให้จุดสีเหลืองบนพื้นสีส้ม แล้วนำวิธีการนี้มาสกัดหาเปอร์เซนต์ การคืนกลับของสารพิษของวิธีตรวจสอบ (%Recovery) ในผักคะน้า ได้ 82-88% คลอไพริฟอสมีค่า Rf 0.60 สารคลอไพริฟอสมีค่า มี Limit of determination 0.03 ppm. ตรวจสารพิษตกค้างของโอเมทโธเอทในผักผลไม้ได้ คือ 3 :1 โดยให้จุดสีเหลืองบนพื้นสีส้ม แล้วนำวิธีการนี้มาสกัดหาเปอร์เซนต์ การคืนกลับของสารพิษของวิธีตรวจสอบ (% Recovery) ในผักคะน้า ได้ 80-88% โอเมทโธเอท Rf 0.07, 0.22, 0.28 สารโอเมทโธเอทมีค่ามี Limit of determination 0.20 ppm. เมื่อนำตัวอย่างที่ตรวจไม่พบด้วย test Kit ทั้ง 3 ชุดไปตรวจด้วย GC พบว่าพบสารคลอไพริฟอส 0.01 ppm พบสารอีไธออน 0.01 ppm และพบโอเมทโธเอท 0.17 ppm นำผล test Kit ที่ได้ทั้ง 3 สารพิษนี้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างอีไธออน ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างคลอไพริฟอส และชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างโอเมทโธเอททั้งหมด 3 ชุด แต่ละชุดบรรจุในกล่องกระดาษหนัก 1 กิโลกรัม (คิดน้ำหนักหลังบรรจุขวดสกัดตัวอย่าง ขวดแยกสาร แผ่น Plate ที่ใช้แยก พร้อมเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจ) เมื่อนำไปทดสอบภาคสนามที่แปลงเกษตรกรปลูกพริกที่จังหวัดขอนแก่น แล้วนำผลมาเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีปรากฏว่าได้ผลเป็นที่ยอมรับได้ ชุดตรวจสอบนี้สะดวกในการนำไปตรวจในแปลง GAP เพื่อการรับรองเบื้องต้นของกรมวิชาการเกษตร 1 ชุดสามารถตรวจได้ 24 ตัวอย่าง

รหัสโครงการ 03 06 54 07 01 00 01 54

[1] กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ตั้งแต่ปี 2546-2553 ได้มีการตรวจพบสารพิษตกค้างของอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอท ในผักและผลไม้มากที่สุดในสารพิษกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (OSS, 2546-2553) และสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอท มีความเป็นพิษสูงทั้งในสัตว์เลือดอุ่นและระบบนิเวศ ทำให้เป็นปัญหาในการส่งออก การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอทในผักและผลไม้มีความจำเป็นมาก เนื่องจากเวลาตัวอย่างมีปริมาณมาก ไม่สามารถตรวจสอบในห้องปฏิบัติการได้ทันกับระยะเวลาที่ต้องการทราบผลเร่งด่วน ชุดตรวจสอบสามารถแก้ไขปัญหาได้ เพราะใช้เวลาในการตรวจเพียง 15 นาที / 12 ตัวอย่าง ถ้าตรวจในห้องปฏิบัติการใช้เวลา 3 วัน และในการตรวจใช้หลักของ TLC ซึ่งโมเลกุลของสารพิษขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่เดินทางในตัวแยกสารได้ช้ากว่าโมเลกุลของสารพิษขนาดเล็ก อาศัยหลักการนี้ทำให้สามารถแยกสารพิษที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลหลักที่คล้ายกันแต่แตกต่างกันเฉพาะ functional group ที่มาเกาะ โดยการหยดตัวอย่างเพียงครั้งเดียวสามารถแยกสารพิษได้หลายๆ ตัว โดยระยะทางของจุดที่ปรากฏบนแผ่นตรวจสอบจะแตกต่างกันขึ้นกับขนาดของโมเลกุลสาร จะมีสีเดียวกันเพราะใช้ระบบเดียวกันในการแยกขึ้นอยู่กับการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวเคลือบแผ่นตรวจสอบและอัตราส่วนของตัวที่ใช้แยกสารพิษ ชุดตรวจสอบสารพิษเหล่านี้จะดำเนินการให้สามารถตรวจสอบสารพิษให้มีระดับต่ำสุดที่ตรวจได้มีค่าไม่เกินค่า Codex MRL จึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบผลผลิตจากแปลงก่อนออกสู่แหล่งจำหน่าย ถ้าตรวจพบแสดงว่าเกินค่า Codex MRL ไม่ต้องเข้าห้องปฏิบัติการ สามารถลดค่าใช้จ่าย เวลาและแรงงานในการตรวจสอบ และพกพาไปตรวจที่ใดก็

จากการที่เกษตรกรเปลี่ยนมาใช้สารอีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอทนี้เอง ทำให้สารพิษทั้ง 3 ตัว ถูกตรวจพบในผักส่งออกปี 2552 อีไธออนถูกตรวจพบสูงสุดถึง 0.95 ppm ในพริก และอีไธออนถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในพริก 14 ตัวอย่าง ในกระเพรา 1 ตัวอย่าง ในกระเจี๊ยบเขียว 3 ตัวอย่าง คลอไพริฟอสถูกตรวจพบสูงสุดถึง 1.78 ppm ในพริก และคลอไพริฟอสถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในพริก 57 ตัวอย่าง ในหน่อไม้ฝรั่ง 5 ตัวอย่าง ในกระเพรา 4 ตัวอย่าง ในกระเจี๊ยบเขียว 8 ตัวอย่าง ในโหระพา 4 ตัวอย่าง โอเมทโธเอทถูกตรวจพบสูงสุดถึง 1.34 ppm ในพริก และโอเมทโธเอทถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในพริก 18 ตัวอย่าง ในหน่อไม้ฝรั่ง 3 ตัวอย่าง (OSS, 2552; Codex MRLs, 2009)

ส่วนในผลไม้ส่งออกปี 2552 อีไธออนถูกตรวจพบ สูงสุด 3.45 ppm ในลิ้นจี่ และอีไธออนถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในลิ้นจี่ 6 ตัวอย่าง ในลำไย 1 ตัวอย่าง ในมะม่วง 17 ตัวอย่าง ในมังคุด 3 ตัวอย่าง และในส้มโอ 1 ตัวอย่าง คลอไพริฟอสถูกตรวจพบสูงสุดถึง 1.28 ppm ในมะม่วง และคลอไพริฟอสถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในทุเรียน 1 ตัวอย่าง ในลิ้นจี่ 30 ตัวอย่าง ในลำไย 7 ตัวอย่าง ในมะม่วง 52 ตัวอย่าง ในมังคุด 14 ตัวอย่าง โอเมทโธเอทถูกตรวจพบสูงสุดถึง 0.3 ppm ในมะม่วง และโอเมทโธเอทถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในทุเรียน 7 ตัวอย่าง ในมะม่วง 21 ตัวอย่าง (OSS, 2552; Codex MRLs, 2009)

ในผักส่งออกปี 2553 อีไธออนถูกตรวจพบสูงสุดถึง 3.40 ppm ในผักชี และอีไธออนถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในพริก 9 ตัวอย่าง ในผักชี 4 ตัวอย่าง ในมะเขือกลม 1 ตัวอย่าง ในถั่วฝักยาว 5 ตัวอย่าง คลอไพริฟอสถูกตรวจพบสูงสุดถึง 13.67 ppm ในผักชี และคลอไพริฟอสถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในพริก 21 ตัวอย่าง ในคะน้า 3 ตัวอย่าง ในผักชี 41 ตัวอย่าง ในผักชีลาว 5 ตัวอย่าง ในโหระพา 1 ตัวอย่าง ในถั่วฝักยาว 7 ตัวอย่าง โอเมทโธเอท ถูกตรวจพบ

สูงสุดถึง 19.93 ppm ในถั่วฝักยาว และโอเมทโธเอทถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในพริก 3 ตัวอย่าง ในคะน้า 1 ตัวอย่าง ในผักชี 5 ตัวอย่าง ในมะเขือเปราะ 1 ตัวอย่าง ในมะเขือกลม 16 ตัวอย่าง ในถั่วฝักยาว 25 ตัวอย่าง (OSS, 2553 ; Codex MRLs, 2009)

ส่วนในผลไม้ส่งออกปี 2553 อีไธออนถูกตรวจพบ สูงสุด 0.28 ppm ในมะม่วง และอีไธออนถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในมะม่วง 2 ตัวอย่าง ในมังคุด 1 ตัวอย่าง ในส้มโอ 1 ตัวอย่าง คลอไพริฟอสถูกตรวจพบสูงสุดถึง 0.65 ppm ในมะม่วง และคลอไพริฟอสถูกตรวจพบเกินค่า MRLs ในมะม่วง 6 ตัวอย่าง ในมังคุด 6 ตัวอย่าง ในทุเรียน 1 ตัวอย่าง ในลิ้นจี่ 2 ตัวอย่าง ในลำไย 3 ตัวอย่าง (OSS, 2553 ; Codex MRLs, 2009)

อีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอทเป็นสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในคน เมื่อได้รับสารกลุ่มนี้เข้าไปในร่างกาย ทำให้เกิดอาการคลื่นเหียนอาเจียน กล้ามเนื้อเกร็ง ท้องร่วง น้ำลายฟูมปาก ตาพร่ามัว ปวดหัว อ่อนล้า แน่นหน้าอก แต่ละชนิดแสดงอาการความเป็นพิษแตกต่างกัน เช่น อีไธออน มีค่า LD_{50} oral (rats) 208 mg/kg, LD_{50} dermal (rats) 62 mg/kg มีความเป็นพิษสูงกับนกร้องเพลง LD_{50} red-wing blackbirds 45 mg/kg, นกกระทา LD_{50} bobwhite quail 128.8 mg/kg มีความเป็นพิษกับปลาและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำจืด ปลา rainbow trout, LC_{50} (96 ชั่วโมง) 0.5 mg/l ปลา Atlantic silversides, LC_{50} (96 ชั่วโมง) 0.049 mg/l ปลา bluegill sunfish, LC_{50} (96 ชั่วโมง) 0.21 mg/l ปลา fathead minnows, LC_{50} (96 ชั่วโมง) 0.72 mg/l สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำจืด LC_{50} (96 ชั่วโมง) 0.0077-0.056 mg/l สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำทะเล LC_{50} (96 ชั่วโมง) 0.049-0.05 mg/l อีไธออน สามารถสะสมได้ในเนื้อเยื่อปลา
(Extoxnet : ethion, 2011)

คลอไพริฟอส มีค่า LD_{50} oral (rats) 95-270 mg/kg, LD_{50} oral (mice) 60 mg/kg, LD_{50} oral (rabbits) 1,000 mg/kg, LD_{50} oral (chickens) 32 mg/kg, LD_{50} dermal (rats) >2,000 mg/kg มีความเป็นพิษสูงกับสัตว์ปีก LD_{50} oral (pheasants) 8.41 mg/kg, LD_{50} oral (mallards duck) 112 mg/kg, LD_{50} oral (sparrows) 21 mg/kg, LD_{50} oral (chickens) 32 mg/kg มีความเป็นพิษสูงกับปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม มีการสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ (Extoxnet : chlorpyrifos, 2011)

โอเมทโธเอท มีค่า LD_{50} oral (rats) 25 mg/kg, LD_{50} dermal (rats) 200 mg/kg มีความเป็นพิษสูงกับลูกอ๊อด (tadpole: *Rana llmnocharis*) LC_{50} (48 ชั่วโมง) 244.24 mg/l, LC_{50} กับปลา Tooth carp *(Aphanlus tasclatus*) 96 ชั่วโมง) 1.51 mg/l, LC_{50} ปลา Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) 72 ชั่วโมง 9.4 mg/l, LC_{50} ปลา Medaka high-eyes *(Oryzias tlpes*) 96 ชั่วโมง 139 mg/l, LC_{50} ปลา Guppy *(Poeclla reticulate*) 96 ชั่วโมง 48 mg/l (Kegley, S.E. *et al.,* 2011)

ในงานวิจัยนี้เพื่อคิดค้นชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของอีไธออน ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของคลอไพริฟอส และชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของโอเมทโธเอทในผักผลไม้ที่นำไปใช้ในภาคสนาม เพื่อความสะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการตรวจ เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนออกจากแปลงสู่แหล่งจำหน่ายและผู้บริโภค

วัตถุประสงค์

เพื่อคิดค้นชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของอีไธออน ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของคลอไพริฟอส และชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างของโอเมทโธเอทในผักผลไม้ที่นำไปใช้ในภาคสนาม เพื่อความสะดวก รวดเร็วประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจ

วิธีดำเนินการ

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ 1. มีดหั่นตัวอย่างและเขียง

2. เครื่องปั่น (Vortex mixer) ปรับความเร็วได้ 2 ระดับ คือ ระดับต่ำและระดับสูง

3. เครื่องกรอง (Suction filter pump)

4. เครื่องลดปริมาตร (Rotary vacuum evaporator)

5. แผ่นตรวจสอบชุดโพรเฟนโนฟอส

6. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น beaker ขนาด 100, 250, 400 ml; cylinder ขนาด 100, 250 ml; round bottom flask ขนาด 250 ml; syringe หยด TLC

7. สารเคมี เช่น acetone (AR),hexane (AR)

8. สารมาตรฐานอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอทและผลิตภัณฑ์อีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท (10%w/v)

วิธีการ 1. ทดสอบหา Sensitivity ของสารมาตรฐานอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอทที่ระดับ 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 ppm โดยการหยดสารมาตรฐานลงบน แผ่นตรวจสอบ เมื่อแห้งแล้วนำแผ่นตรวจสอบมาจุ่มในขวดแยกสาร ซึ่งเป็นตัวที่ใช้แยกสาร คือ hexane: acetone แต่มาปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ ของเหลว ทั้ง 2 ชนิด ทั้งหมด 100 ระบบ คือ hexane : acetone อัตราส่วน 1-20:, 1-20:2, 1-20:3, 1-20:4, 1-20:5 เพื่อหา Limit of detection เมื่อแห้งแล้วแล้วอบ plate ในถังที่มีสารที่เป็นตัว reducing agent นานครึ่งวินาที

2. หาเปอร์เซนต์การคืนกลับของสารพิษ (Recovery) ของอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอทในผักคะน้า ชั่งตัวอย่างผักคะน้าที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มา 5 กรัม ใส่ในขวดสกัดตัวอย่าง เติม acetone ลงไป 5 ml ปิดฝาขวดแล้วเขย่า 2-3 นาที จะได้เป็น control

3. ถ้าเป็น blank ใช้ acetone ใส่ในขวดสกัดตัวอย่าง 5 ml แล้วสกัดเหมือน control แต่ไม่ใส่ผักคะน้า

4. ส่วนตัว Recovery ใส่สารมาตรฐานอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอทลงไป 0.25 µg ในแต่ละขวดขวดละ 1 สารพิษ + คะน้า 5 กรัม + acetone 5 ml (0.05 ppm) ใส่สารมาตรฐานอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอทลงไป 0.5 µg + คะน้า 5 กรัม + acetone 5 ml (0.1 ppm) ใส่สารมาตรฐานโพรเฟนโนฟอสลงไป 1 µg + คะน้า 5 กรัม + acetone 5 ml (0.2 ppm) ใส่สารมาตรฐานโพรเฟนโนฟอสลงไป 1.5 µg + คะน้า 5 กรัม + acetone 5 ml (0.3 ppm) ทุกขวดเติม acetone ลงไปจนถึงขีด 10 ml แล้วสกัดเหมือน control

5. เตรียมผลิตภัณฑ์อีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท (10 %w/v) ให้มีความเข้มข้น ตามที่ระบุในข้อ 4

6. หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์อีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอทความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ในข้อ 5 และตัวอย่างในข้อ 2, 3, 4 มาหยดลงบนแผ่นตรวจสอบชุดโพรเฟนโนฟอสเป็น 4 จุดในแต่ละแผ่นมี 3 แผ่น แผ่นแรก จุดแรกเป็นสารมาตรฐานอีไธออนปริมาณ 2 µl จุดที่ 2 เป็น blank ปริมาณ 2 µl จุดที่ 3 เป็น control ปริมาณ 2 µl ปริมาณ จุดที่ 4 เป็น Recovery ปริมาณ 2 µl แผ่นที่ 2 จุดแรกเป็นสารมาตรฐานคลอไพริฟอสปริมาณ 2 µl จุดที่ 2 เป็น blank ปริมาณ 2 µl จุดที่ 3 เป็น control ปริมาณ 2 µl จุดที่ 4 เป็น Recovery ปริมาณ 2 µl แผ่นที่ 3จุดแรกเป็นสารมาตรฐานโอเมทโธเอท ปริมาณ 2 µl จุดที่ 2 เป็น blank ปริมาณ 2 µl จุดที่ 3 เป็น control ปริมาณ 2 µl จุดที่ 4 เป็น Recovery ปริมาณ 2 µl

7. ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำมาอบในถังที่มี reducing agent ครึ่งวินาที จะมองเห็นจุดสีเหลืองบนพื้นสีส้มชัดเจนมาก ได้ค่า Rf อีไธออน ได้ค่า Rf คลอไพริฟอส ได้ค่า Rf โอเมทโธเอท สามารถหา Limit of determination ได้

8. นำผลที่ได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป เพื่อนำไปใช้ในภาคสนาม

9. นำผลที่ตรวจในภาคสนามมาเปรียบเทียบกับ GC ในห้องปฏิบัติการ

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

ที่กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และแปลงทดสอบของเกษตรกรปลูกพริกที่ อ.เมือง จ.ขอนแก่น ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 – 30 กันยายน 2555

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองหา ระบบของเหลวผสมที่เหมาะสมที่สุดในการแยกอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ออกจากสารตัวอื่นๆ ที่มีอยู่ในผักและผลไม้พบว่า Hexane: acetone อัตราที่เหมาะสมที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ระบบของเหลวผสมที่เหมาะสมที่สุด ในการแยกสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท แสดงเป็นอัตราส่วน และค่า Rf

ชนิดสาร	**อัตราส่วน** hexane : acetone	Rf value
อีไธออน	4 : 1	0.47
คลอไพริฟอส	17 : 3	0.60
โอเมทโธเอท	3 : 1	0.07, 0.22, 0.28

เมื่อนำระบบของเหลวผสมของทั้ง 3 ระบบคือ อีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท มาหาเปอร์เซนต์ Recovery ในผักคะน้า (n=10) พบว่าได้ เปอร์เซนต์ Recovery ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. แสดง เปอร์เซนต์ Recovery และ Limit of determination ของอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ในคะน้า

ชนิดสาร	% Recovery	Limit of determination (ppm)
อีไธออน	80-88	0.04
คลอไพริฟอส	85-88	0.03
โอเมทโธเอท	80-88	0.20

หลังจากทำการทดลองในงานวิจัยของห้องปฏิบัติการได้ผลเป็นที่น่าพอใจ จึงนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเพื่อใช้ในภาคสนาม โดยนำไปทดสอบกับแปลงปลูกพริกของเกษตรกร อ.เมือง จ.ขอนแก่น แล้วนำผล (ตัวอย่างเดียวกัน สกัดวิธีเดียวกัน) มาเปรียบเทียบกับวิธี GC ในห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. เปรียบเทียบค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ระหว่าง Test kit และ GC

สารพิษ	ตรวจด้วย test Kit	ตรวจด้วย GC
คลอไพริฟอส	0.05 ppm	0.01 ppm
อีไธออน	0.05 ppm	0.01 ppm
โอเมทโธเอท	0.30 ppm	0.17 ppm

ตารางที่ 4. เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย Test Kit และ GC (ผักผลไม้ที่ซื้อจากตลาดในกรุงเทพฯ)

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณสารตกค้าง (mg/kg) (GC)	ปริมาณสารตกค้าง (mg/kg)(Test Kit)
คะน้า	ND	ND
คะน้า	Chlorpy 0.03	Chlorpy > 0.03
ผักบุ้ง	Chlorpy 11.8, ethion 0.04	Chlorpy > 0.03, ethion >0.04
พริกขี้หนูเขียว	Chlorpy 0.05	Chlorpy > 0.03
ถั่วฝักยาว	Omethoate 0.67	Omethoate > 0.2
ถั่วฝักยาว	ND	ND
ผักบุ้งไทย	Chlorpy 22.63	Chlorpy > 0.03
พริกแดง	Chlorpy 0.21	Chlorpy > 0.03
ถั่วฝักยาว	ND	ND
พริกเขียว	Chlorpy 0.21	Chlorpy > 0.03
พริกขี้หนูเขียว	Chlorpy 0.1	Chlorpy > 0.03
มะเขือเปราะ	Chlorpy 0.02	ND
พริกแดง	Chlorpy 0.03	Chlorpy > 0.03
หอมแดง	ND	ND
ถั่วฝักยาว	Omethoate 0.3, chlorpy 0.02,ethion 1.53	Omethoate,chlorpy ND,ethion > 0.4
แครอท	chlorpy 0.02,ethion 0.01	chlorpy,ethion ND
องุ่นดำ	chlorpy 0.04,ethion 0.02	Chlorpy > 0.03, ethion ND
แครอท	Omethoate 0.57, chlorpy 0.02	Omethoate > 0.2, chlorpy ND
คะน้า	ND	ND
มะเขือเทศ	chlorpy 0.19	Chlorpy > 0.03
ถั่วฝักยาว	ND	ND

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณสารตกค้าง (mg/kg)(GC)	ปริมาณสารตกค้าง (mg/kg)(Test Kit)
องุ่นแดง	ethion 0.02	ND
พริกแดง	Omethoate 0.17, chlorpy 0.08	Omethoate ND,chlorpy>0.03
ถั่วฝักยาว	chlorpy 0.02	Chlorpy ND
พริกจินดา	chlorpy 0.11	chlorpy>0.03
ถั่วฝักยาว	ethion 0.04	ethion >0.04
พริกแดง	chlorpy 0.09	chlorpy>0.03
พริกเหลือง	chlorpy 0.03,ethion 0.03	chlorpy>0.03, ethion >0.04
พริกแดง	chlorpy 0.04	chlorpy>0.03
คะน้า	ND	ND
แครอท	Omethoate 0.32, chlorpy 0.02	Omethoate > 0.2, chlorpy ND
พริกแดง	Omethoate 0.9, chlorpy 0.04	Omethoate ND, chlorpy>0.03

การพัฒนามาเป็นชุดตรวจสอบอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท

การตรวจสอบสารพิษตกค้างอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ในพืชผักและผลไม้นี้ได้พัฒนามาจากการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทาง Thin Layer Chromatography ได้พัฒนาตัวกลางที่เป็นตัวพาสารพิษ (Mobile phase) ให้สอดคล้องกับสูตรโครงสร้างของสารพิษ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents) ผสมกัน 2 ชนิดด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้มีคุณสมบัติละลายสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ได้ดี และหลังจากที่ดูดซับเอาไว้ที่ตัวกลางที่อยู่กับที่ (Stationary phase) ยังมีความสามารถแยกสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ออกจากองค์ประกอบเคมีอื่นๆ ในผักและผลไม้ได้อีกด้วย

ชุดตรวจสอบอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ประกอบด้วยขวดสกัดตัวอย่างพืชผักที่มีตัวทำละลายสำหรับสกัดบรรจุอยู่ เมื่อสกัดเสร็จแล้วนำมาตรวจสอบด้วย TLC ที่พัฒนาขึ้นมาโดยย่อส่วนมาจากชุดปกติ แต่ยังคงส่วนที่จำเป็นในการวิเคราะห์ไว้ โดยนำตัวอย่างที่สกัดแล้ว มาหยดลงบนแผ่นพลาสติกที่เคลือบด้วยซิลิกาที่ผสมกับสารที่เป็นสี (Chromogenic agent) ทำหน้าที่เป็น Stationary phase เพื่อลดขั้นตอนการ Spray เมื่อหยดตัวอย่างที่สกัดแล้วลงไป ปล่อยให้แห้ง หลังจากนั้นนำมาจุ่มในขวดปากกว้าง ที่ทำหน้าที่เป็น Chromatotank แบบประหยัด ซึ่งมีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมกันอยู่ 2 ชนิดในอัตราที่พอเหมาะและอิ่มตัว และมีคุณสมบัติพิเศษสามารถแยกสารพิษโพรเฟนโนฟอสได้บรรจุอยู่ ทำหน้าที่เป็น Mobile phase เมื่อตัวทำละลายอินทรีย์ผสมเคลื่อนที่มาจนถึงขีดบนของแผ่นพลาสติกที่ทำเครื่องหมายไว้ เอาแผ่นพลาสติกออกมาจากขวดปากกว้าง ปล่อยให้แห้ง จะมองเห็นจุดของสารพิษเป็นสีขาว เมื่อวางทิ้งไว้สีจะหายไป ต้องนำไปจุ่มในขวดที่มี reducing agent อยู่ครึ่งวินาที จะปรากฏเห็นเป็นจุดสีเหลืองบนพื้นสีส้ม และไม่มีการจางหายไปทำให้สามารถแยกสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ได้

ชุดตรวจสอบนี้ทำเป็นกล่องกระดาษน้ำหนักไม่เกิน 1 กิโลกรัมหลังจากบรรจุอุปกรณ์ทุกอย่างลงไป ใช้ชื่อว่า ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างอีไธออน (Test Kit for Ethion Residue) ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างคลอไพริฟอส (Test Kit for Chlorpyrifos Residue) ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างโอเมทโธเอท (Test Kit for Omethoate Residue)

ชุดตรวจสอบทั้ง 3 ชุดนี้ใช้หลักการของ TLC แต่นำมาย่อส่วนของตัวกลางที่อยู่กับที่ (Stationary phase) และตัวกลางที่เป็นตัวพา (Mobile phase) ที่ใช้แยกสารพิษ ทำให้มีขนาดกะทัดรัดไม่หนักเกินไป เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ตรวจที่แปลงเกษตรกร และลดขั้นตอนยุ่งยากที่ทำในห้องปฏิบัติการ คือไม่มีขั้นตอนการ Spray สารที่เป็นสี โดยการผสมสีลงไปพร้อมกับสารซิลิกาตอนเริ่มต้น การแปรผลใช้เปรียบเทียบกับรูปที่ให้มาอยู่ในคู่มือการใช้งานที่บรรจุอยู่ภายในกล่องชุดตรวจสอบ ขั้นตอนและวิธีทำจะบอกอย่างละเอียดในคู่มือที่ให้มา อ่านแล้วเข้าใจง่าย สามารถทำเองได้ วิธีนี้ประหยัดเงินในการวิเคราะห์ประมาณ 40 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีตรวจวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ (GC) และประหยัดเวลา สามารถตรวจสอบได้ภายใน 30 นาที (วิธี GC ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 1 วัน) 1 ชุด ตรวจสอบได้ 24 ตัวอย่าง

การแยกโดยใช้ TLC อาศัยหลักที่ว่าสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ที่ต้องการแยกจากสารประกอบตัวอื่นๆ จะต้องละลายได้ในตัวกลางที่ใช้เป็นตัวแยก (Mobile phase) ซึ่งเป็นของเหลวที่เหมาะสม 2 ชนิด ผสมกันด้วยอัตราส่วนที่พอเหมาะ และในขณะเดียวกันส่วนของอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ที่ละลายออกมาใน Mobile phase จะต้องถูกดูดซับได้ หรือเกิดปฏิกิริยาเคมีได้กับตัวกลางที่อยู่กับที่ (Stationary phase) ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกเคลือบด้วยซิลิกาที่ผสมกับสี ทำให้สามารถแยกสารพิษออกมาเป็นจุดสีเห็นได้ชัด เมื่อปล่อยทิ้งไว้สีจะจางหายไป ต้องนำไปจุ่มในขวดที่มี reducing agent ครึ่งวินาที เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ จะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองบนพื้นสีส้ม ความเข้มของจุดที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ชุดตรวจสอบทั้ง 3 ชุดนี้วัดได้ในช่วง 0.1-1.0 ส่วนในล้านส่วน (part per million หรือ ppm) การตรวจสอบสารพิษใช้วิธีการวัดด้วยสายตา (Visual)

การตรวจสอบสารพิษตกค้างของอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท เป็นเรื่องที่ดำเนินการด้วยความยาก เพราะสารพิษเหล่านี้มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนคล้ายกับสูตรโครงสร้างของสารโพรเฟนโนฟอส จึงได้พัฒนามาจากการวิจัยชุดตรวจสอบโพรเฟนโนฟอสมาใช้ จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้สอดคล้องกับสูตรโครงสร้างสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท นอกจากนี้ยังต้องขจัดความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของตัวอย่างผลผลิต สารที่ใช้สกัด เพื่อให้มีสัดส่วนพอเหมาะที่จะทำให้ได้ค่าตรวจวัด ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับภายใต้เกณฑ์ความปลอดภัยตามมาตรฐานสากล

วิธีดำเนินการของชุดตรวจสอบ

ชุดตรวจสอบสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ประกอบด้วย

1.ขวดสกัดตัวอย่าง ได้พัฒนามาเพื่อใช้สกัดตัวอย่างพืชผักปริมาณน้อยๆ ใช้ตัวทำละลายในการสกัดปริมาณเพียง 5 ml และเมื่อใส่ตัวอย่างชิ้นเล็กๆ ลงไปจนถึงขีดบนของขวดที่ทำเครื่องหมายไว้จะเป็น 10 ml ทำให้ทราบว่าตัวอย่างที่ใส่ลงไป คือ 5 กรัม (ตามหลักของอาร์เคมีดีส) ทำให้ประหยัดเงินและเวลาในการสกัด

2.แผ่นพลาสติกเคลือบซิลิกาซึ่งผสมกับสารที่เป็นสี (Chromogenic agent) เพื่อใช้เป็นตัวกลางที่อยู่กับที่ (Stationary phase) ทำการคิดค้นและพัฒนาโดยเริ่มทำจากแผ่นแก้วขนาดใหญ่ นำสารผสมที่เป็นซิลิกาและสารที่เป็นสีมาเคลือบลงไป ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างซิลิกาและสารที่เป็นสีแต่ละตัว ด้วยอัตราส่วนต่างๆ จนสามารถค้นพบสารที่เป็นสีที่เหมาะสมในอัตราส่วนที่พอเหมาะที่สามารถแยกสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ได้

หลังจากนั้นนำมาพัฒนาทำกับแผ่นพลาสติก โดยใช้สารชนิดเดียวกับที่ทำกับแผ่นแก้ว และใช้อัตราส่วนเหมือนกัน ด้วยการนำแผ่นพลาสติกขนาดใหญ่ (20x20 ซม.) มาเคลือบด้วยสารผสมเหมือนกับที่ทำในแผ่นแก้วแล้วนำมาตัดแบ่งเป็นขนาดเล็ก (4x10 ซม.) จะได้ 10 แผ่นเล็ก เพื่อสะดวกในการนำไปใส่กล่องชุดตรวจสอบ สะดวกในการพกพาไปตรวจในแปลง ทำให้ประหยัดเงินได้ 10 เท่า ของวิธี TLC ปกติ และประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 30 เท่า เนื่องจากตัดขั้นตอนการ Spray Chromogenic agent ออกไปแล้วมาทำการทดลองเหมือนกับที่ค้นพบในแผ่นแก้ว แต่มาดัดแปลงอัตราส่วนของของเหลวที่มาทำเป็น mobile phase เพื่อให้เหมาะสมกับ plate ขนาดเล็ก

3. ขวดปากกว้างคิดค้นและพัฒนามาเพื่อใช้แทน Chromatotank ซึ่งมีราคาแพงมาก สำหรับใช้ใส่ของเหลวผสม 2 ชนิดด้วยอัตราที่เหมาะสมเป็น mobile phase เพื่อใช้เป็นตัวแยกสารพิษ หลังจากจุ่ม plate ขนาดเล็กลงไปแล้วปล่อยให้ของเหลวผสมพาสารพิษเคลื่อนที่ขึ้นมาจากจุดเริ่มต้น จนถึงขีดที่ทำไว้บน plate

4. หลอด Capillary ที่ใช้แทนเข็ม (Syringe) ที่มีราคาแพงมาก โดย Syringe ราคาอันละ 2,500 บาท แต่หลอด Capillary ราคาอันละ 10 บาท ถูกกว่ากัน 250 เท่า

5. อุปกรณ์อื่นๆ นำมาใช้เพื่อป้องกันอันตรายกับผู้ทำการตรวจสอบ เช่น ผ้าปิดจมูก ถุงมือ ปากคีบ (Forceps) ฯลฯ

ชุดตรวจสอบนี้สะดวกในการนำไปใช้ในแปลงเกษตรกรได้ และมีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 0.05-1.0 ppm เพื่อใช้ตรวจสอบสารพิษตกค้างของอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ที่มีการใช้ในแปลง GAP ของผักและผลไม้ ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาพิษตกค้างในการส่งออกและผู้บริโภคภายในประเทศ

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่าง นำพืชผักหรือผลไม้ที่ต้องการวิเคราะห์ มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5 ซม. สุ่มมาจากส่วนต่างๆ ที่บริโภคได้

2. การสกัดตัวอย่าง นำขวดสกัดตัวอย่างที่มีน้ำยาสกัดอยู่ในขวดเปิดฝาออก ใช้ปากคีบ (forceps) คีบชิ้นตัวอย่างที่หั่นไว้ จับใส่ขวดที่มีน้ำยา จนน้ำยาไหลขึ้นมาถึงขีดบนที่ทำไว้ข้างขวด แล้วปิดฝาขวด เขย่าทุก 2 นาที 5 ครั้ง เป็น 10 นาที วางไว้

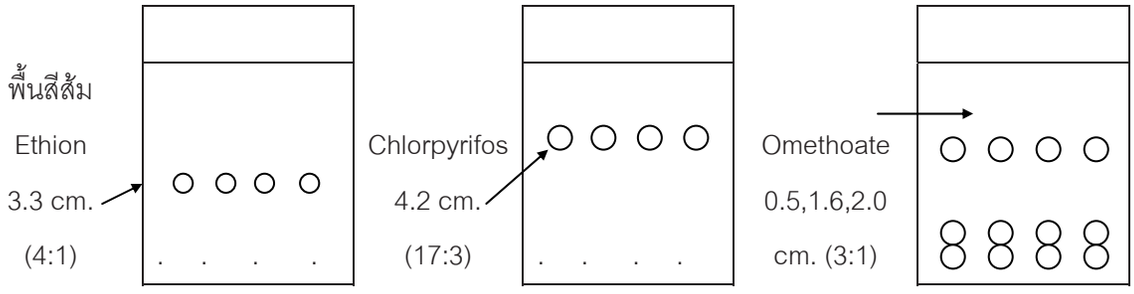
3. การเตรียมตัวกลางที่เป็นตัวพา (Mobile phase) นำขวดปากกว้างพร้อมฝาปิดบรรจุของเหลวผสม 2 ชนิดที่เหมาะสม มาผสมกันด้วยอัตราส่วนที่พอเหมาะ เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้อิ่มตัว ใช้เป็นตัวกลางที่เป็นตัวพาสารพิษ มีคุณสมบัติในการแยกสาร (1 ขวดตรวจได้ 12 ตัวอย่าง ในชุดตรวจสอบ 1 ชุดมี 2 ขวด จะตรวจได้ 24 ตัวอย่าง)

4. การเตรียมตัวกลางที่อยู่กับที่ (Stationary phase) นำแผ่นพลาสติกที่เคลือบด้วยซิลิกาและสารที่เป็นสี (Chromogenic agent) มาวัดจากด้านล่างขึ้นไป 1 เซนติเมตร จุดด้วยดินสอ 4 จุด และวัดขึ้นไป 7 เซนติเมตร ขีดเส้นจากด้านหนึ่งไปสุดอีกด้านหนึ่ง (1 แผ่นตรวจได้ 4 ตัวอย่าง)

5. การวิเคราะห์ นำตัวอย่างที่สกัดไว้ในข้อ (2) มาหยดลงบนแผ่นพลาสติกที่เตรียมไว้ในข้อ (4) จะตรวจได้ 4 ตัวอย่างใน 1 แผ่น การหยดใช้หลอด Capillary ขนาด 5 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วนำแผ่นพลาสติกไปจุ่มในขวดปากกว้างที่เตรียมของเหลวผสม 2 ชนิดที่อิ่มตัวในข้อ (3) หลังจากนั้นปล่อยให้ของเหลวผสม

ไหลขึ้นไปตามแผ่นพลาสติกเคลือบซิลิกาและสารที่เป็นสี จนกระทั่งถึงขีดที่ขีดไว้บนแผ่นตามที่ทำเครื่องหมายไว้ แล้วเอาแผ่นพลาสติกออกจากขวดปากกว้างนั้น

นำแผ่นพลาสติกที่เอาออกมาจากขวดวางทิ้งไว้ให้แห้ง จะมองเห็นจุดสีขาวบนแผ่นพลาสติกพื้นสีเหลือง เมื่อวางทิ้งไว้จุดจะหายไป ต้องนำแผ่นพลาสติกไปจุ่มในขวดที่มี Reducing agent ครั่งวินาทีจะมองเห็นจุดสีเหลือง บนแผ่นพลาสติกสีส้ม สามารถมองเห็นจุดได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า วัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นเคลื่อนที่ไปได้ 2.9 เซนติเมตร (3:1) ดังแสดงในภาพที่ 1 (จุดเหลืองบนพื้นส้ม) ระบบ hexane : acetone



ภาพที่ 1. แสดงจุดสี ระยะทาง และระบบแยกสาร ที่ปรากฏตำแหน่งอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท

6. การแปรผล ถ้าพบมีจุดส้มเกิดขึ้นในแผ่นพลาสติก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับคู่มือที่ให้มาในชุดตรวจสอบแล้วพบว่าระยะที่เกิดขึ้นของจุดเท่ากันพอดีกับในคู่มือ แสดงว่า ตรวจพบสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ปนเปื้อนในตัวอย่างปริมาณมากกว่า 0.05 ppm ขึ้นไป ตัวอย่างที่ปนเปื้อนในปริมาณที่น้อยกว่า 0.05 ppm ไม่สามารถตรวจสอบได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เมื่อสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ตกค้างอยู่ในผักผลไม้และผลิตผลอื่นๆ ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า สารพิษบางส่วนจะซึมเข้าไปในส่วนของเนื้อผักและผลไม้ และบางส่วนยังคงอยู่บนผิวของผักและผลไม้ที่นำมาบริโภค โดยจะเคลือบอยู่ภายนอก จึงต้องสกัดสารพิษส่วนนี้ออกมาโดยวิธีแยกส่วน โดยใช้ความแตกต่างของความสามารถในการละลายของสารพิษอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ในของเหลวที่เป็นตัวทำละลายทางเคมี (Solvent) และเมื่อนำสารละลาย (Solution) ที่มีสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท มาตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบ TLC พบว่า สารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท มีการแยกจากองค์ประกอบอื่นๆ อย่างชัดเจน ทำให้สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เป็นจุดสีส้ม ณ ตำแหน่งที่ปรากฏในภาพที่ 1 ปริมาณที่ตรวจสอบได้มีค่าอยู่ในเกณฑ์ความปลอดภัยตามมาตรฐานสากล การตรวจสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท สามารถดำเนินการให้แล้วเสร็จภายในระยะเวลา 15 นาทีต่อ12 ตัวอย่าง (ตั้งแต่เริ่มสกัดตัวอย่างจนกระทั่งตรวจวัดด้วยสายตาแล้วเสร็จ) เมื่อนำชุดตรวจสอบอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท มาใช้ตรวจสอบในภาคสนาม สามารถตรวจตัวอย่างได้ 24 ตัวอย่างต่อ1ชุดโดยใช้เวลา 30 นาที

ชุดตรวจสอบสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท เบื้องต้นนี้มีคุณสมบัติและลักษณะเด่น คือ เป็นสิ่งที่คิดขึ้นมาใหม่ มีความแปลกใหม่ สามารถพกพาไปใช้ตรวจสารพิษตกค้างในภาคสนามได้ ประหยัดเงินและเวลาในการตรวจวิเคราะห์ (จากเดิมตรวจด้วย GC ราคา 3,500 บาท / ตัวอย่างแต่ใช้ชุดตรวจสอบราคา 180 บาท / ตัวอย่าง) และตรวจสอบได้รวดเร็วกว่าเดิม (ตรวจด้วย GC ใช้เวลา 2 วัน / ตัวอย่าง แต่ตรวจด้วยชุดตรวจสอบใช้เวลา 15 นาที /

12 ตัวอย่าง) 1 ชุดสามารถตรวจสอบได้ 24 ตัวอย่าง และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้มีค่าต่ำกว่าค่าความปลอดภัย (Codex MRLs)

ชุดตรวจสอบสารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ที่คิดค้นขึ้นมานี้เหมาะกับที่จะใช้ในปัจจุบันอย่างยิ่ง เนื่องจากพบว่าในปี 2552-2553 สารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ถูกตรวจพบตกค้างในผักและผลไม้ส่งออกมาก (OSS, 2552; 2553) ซึ่งสอดคล้องกับการทำประเมินการใช้สารพิษของเกษตรกรในแปลงปลูกปี 2552 เพื่อลดความเสี่ยงภัยและความรุนแรงของผลกระทบการใช้วัตถุมีพิษ พบว่าอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท เกษตรกรนิยมใช้ในแปลงปลูกผักทั้งในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุดมลักษณ์และคณะ, 2552; อุดมลักษณ์และคณะ, 2553)

การนำไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่จะนำไปตรวจสารตกค้างในผักผลไม้ ได้แก่

หน่วยงานราชการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน

หน่วยงานเอกชนที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ศูนย์วิจัยพืชผักนานาชาติ (Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC) เกษตรกรผู้ปลูกผักส่งออก และปลูกผักเพื่อส่งแหล่งจำหน่ายทั่วประเทศ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายเศรษฐพงศ์ นุ้ยเมือง นักวิชาการเกษตร และนายไชยากร นิยมสวยเสน่ห์ เจ้าหน้าที่การเกษตร ในการช่วยทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ 2552. “ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างโพรเฟนโนฟอส” ผลงานวิจัยด้านนวัตกรรมประจำปี กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (10 หน้า)

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ และจิราพร โชติสมิทธิกุล 2552. “การประเมินข้อมูลการใช้ผลิตภัณฑ์ Cypermethrin, EPN และผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติจากเกษตรกร” ผลงานวิจัยประจำปี กลุ่มวิจัยวัตถุมีการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (9 หน้า)

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ พิเชษฐ์ ทองละเอียด และยุพดี จิตรไพศาล 2553. “การประเมินข้อมูลการใช้ผลิตภัณฑ์ Cypermethrin, EPN และผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติจากเกษตรกร” ผลงานวิจัยประจำปี กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (10 หน้า)

Codex MRLs, Thai MRLs, 2009. Available on http://www.aseansec.org/agr_pub/crops1.doc. (2009)

Chlorpyrifos, available on http:// www.extoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm. (2010) 4 pp.

Ethion, available on http:// www.extoxnet.orst.edu/pips/ethion.htm. (2010) 4 pp.

Kegley, S.E.; Hill, B.R., Orme, S.; Choi,A.H.; 2011. Omethoate: Pan Pesticide Database Chemicals 2011 "Chemical, Use, and Toxicity Information for Omethoate"available on http:// www.pesticideinfo.org (2011) 2 pp.

OSS, ศูนย์บริการทางวิชาการแบบเบ็ดเสร็จ,2552. "ข้อมูลสารพิษตกค้างในผักผลไม้ส่งออก" ประจำปี 2546-2553

ภาคผนวก

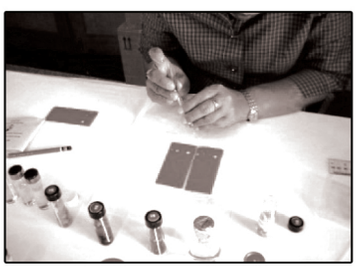
ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารอีไธออน คลอไพริฟอส โอเมทโธเอท ในภาคสนาม



ภาพที่ 1. ชุดตรวจสอ อีไธออน คลอไพริฟอส และโอเมทโธเอท



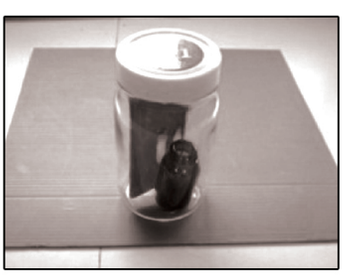
ภาพที่ 2. ตัวอย่างผักพร้อมตรวจสอบ



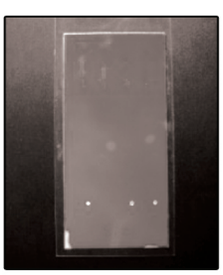
ภาพที่ 3. การหยดสารพิษลงบนแผ่นตรวจสอบ



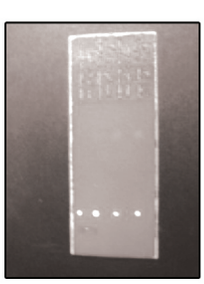
ภาพที่ 4. นำแผ่นตรวจสอบใส่ในขวดแยกสาร



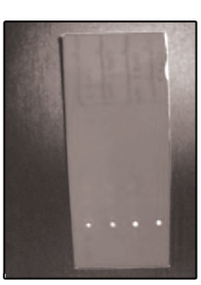
ภาพที่ 5. การทำให้เห็นจุดสารพิษชัดเจนยิ่งขึ้น



ภาพที่ 6. แสดงจุดสารอีไธออน 3.3 ซม.



ภาพที่ 7. แสดงจุดสารคลอไพริฟอส 4.2 ซม.



ภาพที่ 8. แสดงจุดสารโอเมทโธเอท 0.5, 1.6, 2.0 ซม.

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphorus pyrethroid และ endosulfan ในมะม่วง โดยวิธี QuEChERS ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-ECD/FPD)

Validation of QuEChERS method for determination of organophosphorus pyrethriod and endosulfan pesticide residues in mango using gas chromatography with FPD and ECD

ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล วิทยา บัวศรี

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่มีความถูกต้องแม่นยำ เหมาะสม รวดเร็ว ทันต่อความต้องการ เสียค่าใช้จ่ายน้อย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Lehotay, *et al*., 2007) ทำการสกัดตัวอย่างโดยการเขย่าด้วย acetonitrile (MeCN) containing 1% acetic acid(HAc), anhydrous $MgSO_4$ และ sodium acetate (NaAC) แล้วนำไป centrifuge โดยใช้ primary secondary amine (PSA) และ $MgSO_4$ ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) นำวิธีมาพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค fortified sample วัตถุมีพิษจำนวน 38 ชนิด ในมะม่วง และตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง Gas Chromatography/ECD-FPD ตาม parameter ที่ทดสอบ ทำการทดลองในมะม่วงที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ 7 ระดับ คือ 0.01 0.02 0.05 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากผลการทดสอบการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphorus pyrethriod และ endosulfan จำนวน 39 ชนิดในมะม่วง พบว่าวัตถุมีพิษจำนวน 32 ชนิด มีความเหมาะสมในการทดสอบโดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง (Accuracy) และมีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.01-1 mg/kg มีค่า LOD เท่ากับ 0.01 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.01-0.02 mg/kg วัตถุมีพิษ fenvalerate ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษในมะม่วง 0.1 mg/kg มีเพียงวัตถุมีพิษจำนวน 6 ชนิดที่ไม่ผ่านเกณฑ์การทดสอบ ได้แก่ methamidophos acephate monocrotophos chlorpyriphos-methyl parathion-methyl และ permethrin วิธีวิเคราะห์นี้สามารถตรวจสารพิษในมะม่วงได้อย่างสะดวกรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

คำนำ

ในปัจจุบันได้มีการคำนึงถึงเรื่องสุขภาพอนามัยและสิ่งแวดล้อมจากการใช้สาร chlorinated solvents จึงเกิดวิธีการวิเคราะห์ใหม่ๆ ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารดังกล่าวในการสกัด โดยใช้สารอื่นที่เป็น non-halogen-containing และ solvent mixtures เช่น ethyl acetate : acetonitrile และ cyclohexane : ethyl acetate เป็นต้น จากความต้องการวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถใช้กับพืชและวัตถุมีพิษหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว รวมทั้งคุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์สูง ลดขั้นตอนและแรงงานคนในการสกัดตัวอย่าง ใช้สารเคมีและเครื่องแก้วน้อยในปี 2002 Michelangelo Anastassiades และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ และตั้งชื่อว่า QuEChERS Method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ในปี 2003 ได้เผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of AOAC International หลังจากนั้นห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง CVUA Stuttgart ประเทศเยอรมัน (The pesticide residue laboratory of the CVUA Stuttgart, Germany) ได้นำวิธีนี้มาใช้สำหรับงานประจำในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ และได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency test) กับ EU-PT 4 ในส้ม (2002) ซึ่งให้ผลทดสอบที่ดีเยี่ยมต่อมา Steven J Lehotay และคณะได้มีการดัดแปลงและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้โดยการขยายขอบข่ายทั้งชนิดของสารและพืช โดยใช้ buffering salts เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกลับคืนได้ของสารที่วิเคราะห์ (Recoveries) ที่ pH มีผลต่อสาร analytes โดยใช้ acetate buffering ในการปรับค่า pH ประมาณ 6 ในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ และได้ตีพิมพ์ในวารสาร AOAC 2007.01 Anastassiades และคณะได้พัฒนาวิธีการนี้โดยใช้ citrate salts สำหรับเป็น buffering ในการตรวจวิเคราะห์สารที่วิเคราะห์ได้ยากในพืช และได้ตีพิมพ์และเผยแพร่ใน the European Standard EN 15662 ปี 2008 ในปัจจุบันวิธี QuEChERS เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการนิยมอย่างแพร่หลายในกลุ่มประเทศยุโรป สหรัฐอเมริกา และประเทศต่างๆ นำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ และความสามารถของวิธีการในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และใช้ตรวจวิเคราะห์ที่เป็นงานประจำทั้งภาครัฐและเอกชน

การดำเนินกิจกรรมต่างๆ ในยุคปัจจุบันหลายๆ กรณี ต้องอาศัยผลการวัดจากห้องปฏิบัติการเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจ เช่น การเฝ้าระวังกระบวนการผลิต การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การยืนยันความเป็นไปตามข้อกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของสินค้า การเฝ้าระวังความเป็นอันตรายต่อคนและสภาวะแวดล้อม รวมถึงการใช้มาตรการสุขอนามัยทางการค้าในตลาดโลก ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้องและเป็นที่น่าเชื่อถือนั้น วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นำมาใช้ต้องมีการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน (ทิพวรรณ, 2549) การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะที่ต้องศึกษา ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ช่วงของการใช้งาน (working range) ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาปริมาณได้โดยมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Limit of Quantitation, LOQ) ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด เนื่องจากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กรมวิชาการเกษตร จำเป็นต้องติดตามและเตรียมความพร้อมที่จะต้องปฏิบัติให้ได้ตามกฎเกณฑ์ต่างๆ ดังนั้นจึงพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

กลุ่มไพรีทรอยด์ และเอ็นโดซัลแฟนในมะม่วง ด้วยเทคนิค Chromatography GC เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน สามารถในการตรวจวัดหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่มีอยู่ปริมาณน้อยในตัวอย่างได้ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 centrifuge tubes ขนาด 50 มล. (Polypropylene, LP, ITALIA)

1.2 centrifuge tubes ขนาด 10-15 มล (Polypropylene,LP, ITALIA)

1.3 graduated centrifuge tubes ขนาด 10-15 มล (Pyrex)

1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง

1.5 ตู้อบ และเตาเผา

1.6 เครื่องบดสับตัวอย่าง (food processor)

1.7 vortex mixer

18. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมด้วย adapter สำหรับ tube ขนาด 50 มล. และ 10-15 มล.อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย(auto pipette) ขนาด 20-200ไมโครลิตร 0.1-1 มล. 0.5-5 มล. และ1-10 มล.อุปกรณ์ดูดจ่ายสารเคมีจากขวด (dispenser) ขนาด 25 มล.

19. เครื่องลดปริมาตรโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตนเจน (nitrogen evaporator)

20. เครื่อง Gas Chromatograph ซึ่งมีหัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector : FPD และ Electron Capture Detector : ECD ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890

21. คอลัมน์ที่ใช้ สำหรับ FPD : capillary column DB-5ms ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์มที่ใช้เคลือบในคอลัมน์ 0.25 ไมโครเมตร

22. คอลัมน์ที่ใช้สำหรับ ECD : capillary column HP-ultra 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตร ความหนาของฟิล์มที่ใช้เคลือบในคอลัมน์ 0.17 ไมโครเมตร

2. สารเคมี

2.1 acetonitrile, ชนิด pesticide grade J.T. Baker

2.2 magnesium sulfate-dried(powder, Fisher) เผาที่ 500 ^{0}C นาน 5 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่ ตู้ดูดความชื้น

2.3 acetic acid (HOAc): glacial

2.4 anhydrous sodium acetate (NaOAc) (powder-Merck)

2.5 primarry-secondary-amine (PSA) sorbent: particle size 40 µm Varian part No.12213024)

2.6 toluene ชนิด pesticide grade J.T. Baker

2.7 helium gas : purity 99.999% และ N_2 gas

3. สารมาตรฐาน

3.1 สารละลายผสมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด ได้แก่ methamidophos dichlovos acephate omethoate etroprophos dicrotophos monocrotophos phorate dimethoate diazinon phosphamidon chlorpyrifos-methyl parathion-methyl pirimiphos-methyl fenitothion malathion chlorpyrifos parathion-ethyl pirimiphos-ethyl phenthoate methidathion prothiophos profenophos ethion triazophos EPN Phosalone azinphos-methyl และ coumaphos

3.2 สารมาตรฐานของวัตถุมีพิษ endosulfan และไพรีทรอยด์ 10 ชนิด ได้แก่ α-endosulfan, β-endosulfan, endosulfan sulfate, bifenthrin, λ-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate และ deltamethrin

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างมะม่วงประมาณ 10 กิโลกรัม นำเนื้อและเปลือก มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (food processor) คลุกเคล้าให้เข้ากันดีก่อนชั่งตัวอย่างละ 10±0.1 กรัมใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มล.เป็น analytical sample เพื่อนำไปสกัดหาสารพิษตกค้าง ในตัวอย่าง (blank) ซึ่งจะนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20°C สำหรับใช้ในครั้งต่อไป

4.1 การสกัดและการ clean up ตัวอย่าง

4.1.1 การสกัดตัวอย่าง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ QuEChERS (Michelangelo Anastassiades, CVUA Stuttgart) ดังนี้

4.1.1.1 ชั่งตัวอย่างมะม่วงตัวอย่างละ 10 ± 0.1 กรัม ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 มล.

4.1.1.2 เติม สารละลาย acetonitile จำนวน10 มล.

4.1.1.3 เติม Disodium hydrogencitrate sesquihydrate จำนวน 1 กรัม

4.1.1.4 เติม Trtisodium citrate dehydrate จำนวน 1 กรัม

4.1.1.5 เติม anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$) จำนวน 4 กรัม และ Sodium Chloride จำนวน 1 กรัม ปิดฝา

4.1.1.6 เขย่าด้วยมือ และเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที

4.1.1.7 นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 5 นาที

4.2 การ clean up ทำความสะอาดตัวอย่าง โดย Dispersive-SPE Cleanup

4.2.1 ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง จำนวน 6 มล. ด้วย autopipette ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มล. ที่ใส่ anh. $MgSO_4$ 0.9 กรัม และ PSA 0.15 กรัม ไว้แล้ว ปิดฝาแล้ว เขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุด นาน 1 นาที

4.2.2 นำไป centrifuge ด้วย ที่ระดับความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 1 นาที

4.2.2 ดูดสารละลายส่วนบนของตัวอย่างด้วย autopipette จำนวน 4 มล.ใส่ใน graduated centrifuge tube ขนาด 15 มล แล้วเติม toluene 1 มล.

4.2.3 นำไปเป่าลดปริมาตรด้วยN_2 evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C จนเหลือประมาณ 0.3-0.5 มล.ปรับปริมาตร 1 มล. ด้วย toluene

4.2.4 เติม anh. $MgSO_4$ จนถึงขีด 0.2 มล. เขย่าให้ทั่วจนถึงขีดปริมาตรที่ 6 มล.

4.2.5 นำไป centrifuge ด้วย ที่ระดับความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 1 นาที

4.2.6 ดูดสารละลาย 0.6 มล. ใส่ใน GC-vial ขนาด 2 มล. นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC/FPD:ECD ปริมาณ 2 µl เพื่อตรวจหาชนิด และปริมาณของวัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และกลุ่มไพรีทรอยด์

5. การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC/FPD:ECD

5.1 การตั้งสภาวะของเครื่อง GC/FPD:ECD 6890 โดยใช้

FPD Column: DB-5ms; 30 m. length (i.d.) 0.25 mm 0.25 µm. film thickness

ECD Column: HP-ultra1; 25 m. length (i.d.) 0.32 mm 0.25 µm. film thickness ปรับสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

5.1.1 oven: temperature: 100°C initial temp ramped to 175°C (25°C/min), 225°C(5°C/min), 290°C (25°C/min runtime) hold 10 min, runtime = 21.6 min

5.1.2 carrier gas: Helium, flow 1.5 ml/min, Mode: Constant flow

5.1.3 injector: injection temperature 250°C, inlet: EPC Mode: pulsed splitless, injection pulse pressure 56.40 psi until 0.75 min, Injection volume 2 µl

5.2 การทำ Calibration curve

ปรับสภาพเครื่องให้อยู่ในสภาพพร้อมจะใช้งาน นำสารละลาย working standard solution ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม/มล. ฉีดเข้าเครื่อง GC/FPD:ECD เพื่อทำ calibration curve เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน โดย plot กราฟระหว่างพื้นที่ใต้ peak (peak area) ในแกน y และความเข้มข้นของสารในแกน x ซึ่ง calibration curve เป็นกราฟเส้นตรง (linear line) มีค่า correlation ของ linear regression (R^2) ไม่น้อยกว่า 0.995

5.3 การตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารพิษตกค้าง

ฉีดสารสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่า retention time ของ peak ตัวอย่างกับ peak ของสารมาตรฐานเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน (qualitative data analysis) นำมาคำนวณปริมาณโดยเทียบพื้นที่ใต้ peak ระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารสกัดตัวอย่าง (quantitative data analysis)

6. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

6.1 Accuracy

เป็นการวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษลงในตัวอย่างที่ไม่มีวัตถุมีพิษที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (sample blank) และทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้ (% recovery) ทำการทดลองในตัวอย่างมะม่วงที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ 7 ระดับ คือ 0.01 0.02 0.05 0.10 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ 7 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย ประเมิน accuracy จาก % recovery โดยเกณฑ์การยอมรับ Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ Codex, 1995

6.2 Precision

เป็นการวัดความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (repeatability) ในห้องปฏิบัติการเดียวกันโดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ใช้วิธีวิเคราะห์ เครื่องมือและผู้วิเคราะห์ชุดเดียวกัน ซึ่งทำการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาหา % RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ค่า precision ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

6.3 Limit of quantitation (LOQ)

LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุมีพิษในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยง (precision) ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

6.4 Limit of detection (LOD)

LOD เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามรถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ต้องมีค่าอัตราส่วนของ Signal/Noise ของแต่ละสารมากกว่า 3

ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด)

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างมะม่วงที่นำมาใช้ในการทดลอง** (blank)

ผลการวิเคราะห์ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างของกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มไพรีทรอยด์และเอ็นโดซัลแฟน รวม 39 ชนิด ในตัวอย่างมะม่วงที่นำมาใช้ทดสอบ

2. **ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์**

2.1 **Linearity และ Range** ผลการวิเคราะห์ พบว่า range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.995-0.9999 พบว่าวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มไพรีทรอยด์และเอ็นโดซัลแฟน 39 ชนิด อยู่ในช่วง 0.01 – 1.0 mg/kg

2.2 **Accuracy และ Precision** ทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) โดยเกณฑ์ยอมรับของ accuracy ที่ความเข้มข้นของวัตถุมีพิษในตัวอย่าง>0.01mg/kg ≤ 1 mg/kg มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 70 -120 (Codex, 1995) precision มีค่า % RSD ≤ 20 และ HORRAT ≤ 2

ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg ของวัตถุมีพิษกลุ่ม จำนวน 39 ชนิดในตัวอย่างมะม่วง (ตารางที่1.1 และ 1.2) % recovery ของผลวิเคราะห์ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (%recovery อยู่ในช่วง 70-120) จำนวน 26 ชนิด ได้แก่ dichlovos etroprophos dicrotophos phorate dimethoatediazinon phosphamidon chlor

pyrifos -methyl parathion -methyl fenitothion malathion chlorpyrifos parathion-ethyl pirimiphos-ethyl phenthoate methidathion prothiophos profenophos ethion triazophos phosalone azinphos-methyl coumaphos α-endosulfan β-endosulfan และ bifenthrin มี % recovery ในช่วง 85-119% และค่า precision มี % RSD ในช่วง 1.1-7.7 และ HORRAT ในช่วง 0.1-0.4

ผลการวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ระดับ 0.01 mg/kg แต่ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg จำนวน 6 ชนิด (ตารางที่ 1.1 และ 1.2) ได้แก่ omethoate pirimifos-methyl EPN endosulfan sulfate cypermethrin และ λ-cyhalothrin ค่า accuracy มี % recovery ในช่วง 85-114% ค่า precision % RSD ในช่วง 5.2-16.3 และ HORRAT ในช่วง 0.3 - 0.8

วัตถุมีพิษจำนวน 2 ชนิด ที่ ผ่านเกณฑ์ยอมรับ cyfluthrin และ deltamethrin ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg % recovery ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า accuracy มี % recovery เท่ากับ 107 และ 109% ค่า precision % RSD เท่ากับ 1.1 และ 0.4 และ HORRAT เท่ากับ 0.1 และ 0.03

วัตถุมีพิษ fenvalerate ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1mg/kg ค่า accuracy มี %recovery เท่ากับ 114% ค่า precision %RSD เท่ากับ 1.9 และ HORRAT เท่ากับ 0.1

สำหรับวัตถุมีพิษ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ methamidophos acephate monocrotophos และ permethrin ผลวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.02 0.05 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg % recovery มีค่าต่ำ และสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับ (% recovery อยู่ในช่วง 70-120)

2.3 Limit of Detection (LOD)

จากการวิเคราะห์ fortified samples วัตถุมีพิษจำนวน 39 ชนิดในมะม่วงที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg จำนวน 7 ซ้ำ คำนวณอัตราส่วนของ Signal/Noise ของแต่ละสารต้องมีค่ามากกว่า 3 ดังนั้นค่า LOD ของวิธีการทดสอบนี้เท่ากับ 0.01 mg/kg

2.4 Limit of Quantitation (LOQ)

จากการทำ fortified samples วัตถุมีพิษจำนวน 39 ชนิด ในตัวอย่างมะม่วงที่ระดับความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.01 0.02 0.05 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ มีผลการทดสอบดังนี้ (ตารางที่ 1.1 และ 1.2)

วัตถุมีพิษจำนวน 29 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดได้แก่ dichlovos etroprophos dicrotophos phorate dimethoate diazinon phosphamidonchlorpyrifos-methyl parathion-methyl fenitothion malathion chlorpyrifos parathion-ethyl pirimiphos-ethyl phenthoate methidathion prothiophos profenophos ethion triazophos phosalone azinphos-methyl และ coumaphos

วัตถุมีพิษจำนวน 2 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.02 mg/kg ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ omethoate และ cypermethrin วัตถุมีพิษ fenvalerate มีค่า LOQ เท่ากับ 0.1 mg/kg

สำหรับวัตถุมีพิษ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ methamidophos acephate monocrotophos และ permethrin ผลวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.02 0.05 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg % recovery มีค่าต่ำและสูงกว่าเกณฑ์

ยอมรับ (% recovery อยู่ในช่วง 70-120) ไม่สามารถกำหนดค่า LOQ ของวัตถุมีพิษทั้ง 4 ชนิดได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วัตถุมีพิษจำนวน 34 ชนิด มีความเหมาะสมในการทดสอลโดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง (Acuracy)และมีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในช่วงความเข้มข้น ระหว่าง 0.01-0.15 mg/kg มีค่า LOD เท่ากับ 0.01 mg/kg และ LOD เท่ากัน 0.01-0.05 mg/kg ได้แก่ dichlovos etroprophtos dicrotophos phorate dimethoate diazinon phosphamidon chlorpyrifos-methyl parathion-methyl fenitothion malathion chlorpyrifos parathion-ethyl pirimiphos-ethyl phenthoate methidathionprothiophos profenophos ehton triazophos phosalone azinphos-methly coumaphos a-endosulfan β-endosulfanbifenthirn omethoate pirimifos-methyl EPN endosulfan sulfate cypermethring λ-cyhalothrin cyfluthrin และ deltamethrin

มี % recovery ในช่วง 85-119% และค่า precision มี % RSD ในช่วง 1.1-16.3 และ HORRAT ในช่วง 0.1-0.8

วัตถุมีพิษ fenvalerate ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ % recovery เท่ากับ 114% ค่า precision % RSD เท่ากับ 1.9 และ HORRAT เท่ากับ 0.1 มีค่า LOD เท่ากับ 0.01 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.1 mg/kg

มีเพียงวัตถุมีพิษจำนวน 4 ชนิดที่ไม่ผ่านเกณฑ์การทดสอบ ได้แก่ methamidophos acephate monocrotophos และ permethrin ในกรณีที่วัตถุมีพิษที่ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับหรือ ค่า LOQ มีค่ามากกว่าค่า MRL ผลการทดสอบที่ได้จากกรศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้เป็นข้อมูลและแนวทางสำหรับผู้ที่จะนำไปพัฒนาและทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีการที่ดีและเหมาะสมต่อไป วิธีวิเคราะห์นี้สามารถตรวจสารพิษในมะม่วงได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้ที่จะทำการพัฒนาและปรับวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีการที่ดีและเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น
2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไปขยายขอบข่ายวิธีการตรวจวิเคราะห์และขอการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025
3. นำไปถ่ายทอดให้แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 เพื่อเป็นการพัฒนาและเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร
4. นำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว
5. จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐและเอกชนนำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อติสุข และ ทิพวรณ นิ่งน้อย2547. Method Validation, เอกสารการฝึกอบรมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ดุษฎี มั่นความดี และอุมาพร สุขม่วง 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation), เอกสารการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ทิพวรรณ นิ่งน้อย 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า

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

Codex. 1995. Codex Alimentarius volume3. Residues of Veterinary Drugs in Food.

European Commission (EC). 2000. Guidance Document on Residue Analysis Method. SANCO/825/00 rev. 620/06/00. 16p.

Food Standard Agency. 2004. Food Standard Agency Information Bulletin on Methods of Analysis and Sampling for Foodstuffs. Institute of Food Research,UK. http://www.food.gov.uk.

Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to validate Pesticide Residue Method Performance. In: Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus (eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

Lehotay, S.J. 2007. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partition with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. J. AOAC Int. 90, 48

การสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรม : แม่น้ำท่าจีน

Accumulation of Pesticide in the main river in Agricultural Area: The Thajean River

มลิสา เวชยานนท์ สิริพร เหลืองสุชนกุล ประกิจ จันทร์ติ๊บ

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ศึกษาการสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรมของลุ่มแม่น้ำท่าจีนและคลองแยก โดยใช้ระบบกำหนดตำแหน่งพื้นโลกด้วยดาวเทียม (Global Positioning System; GPS) จำนวน 24 จุด สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำตะกอน พืชน้ำและสัตว์น้ำ 4 ครั้ง ในช่วงเดือนธันวาคม 2553 เดือนกุมภาพันธ์ เมษายน และกรกฎาคม 2554 รวมทั้งหมด 270 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างน้ำ ตะกอน พืชน้ำและสัตว์น้ำ จำนวน 93, 85, 71 และ 21 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบสารพิษตกค้างในตัวอย่างน้ำ 76 ตัวอย่าง คิดเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ สารพิษที่ตรวจพบได้แก่ สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มคาร์บาเมท สารกำจัดวัชพืชกลุ่มไทรอาซีน และสารกำจัดโรคพืชกลุ่มฟินิลเอไมด์ เอคิลอาลานิน ปริมาณ < 0.01 – 0.07, 0.01 – 0.49, 0.76, 0.05 – 0.79 และ 0.08 – 0.20 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างตะกอน 85 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษ 29 ตัวอย่าง คิดเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มไพรีทรอยด์ กลุ่มไทรอาซีนและสารกำจัดวัชพืชกลุ่มคลอโรฟีนอกซี คอมพาวด์ ปริมาณ < 0.01 – 0.02, < 0.01 - 0.07, < 0.01 – 0.33, 0.03 – 0.12 และ < 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตัวอย่างพืชน้ำ 71 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษ 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 7 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และกลุ่มไพรีทรอยด์ ปริมาณ < 0.01 – 0.02 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตัวอย่างสัตว์น้ำ 21 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษ 20 ตัวอย่าง คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และกลุ่มไพรีทรอยด์ ปริมาณ < 0.01 – 0.02 และ < 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณสารพิษที่พบในตัวอย่างน้ำไม่เกินค่าสูงสุดของมาตรฐานน้ำผิวดิน และไม่อยู่ในระดับที่เป็นพิษต่อปลา รวมทั้งพืชน้ำและสัตว์น้ำที่จะนำมาบริโภคยังอยู่ในระดับที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค

รหัส 03-06-54-05-03-01-01-54

คำนำ

แม่น้ำท่าจีนเป็นแม่น้ำสำคัญสายหนึ่งของประเทศ แยกมาจากแม่น้ำเจ้าพระยาที่อำเภอวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท ไหลผ่านจังหวัดชัยนาท สุพรรณบุรี นครปฐม และไหลออกสู่อ่าวไทยที่ตำบลบางหญ้าแพรก อำเภอเมืองสมุทรสาคร มีความยาวทั้งสิ้นประมาณ 325 กิโลเมตร และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามพื้นที่ที่แม่น้ำไหลผ่าน ถ้าไหลผ่านจังหวัดชัยนาท เรียกว่าแม่น้ำมะขามเฒ่า ไหลผ่านจังหวัดสุพรรณบุรี เรียกว่า แม่น้ำสุพรรณบุรี ไหลผ่านจังหวัดนครปฐมเรียกว่า แม่น้ำนครชัยศรี และไหลผ่านจังหวัดสมุทรสาคร เรียกว่า แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำท่าจีนแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ แม่น้ำท่าจีนตอนบนตั้งแต่จังหวัดชัยนาทถึงอำเภอเมืองจังหวัดสุพรรณบุรีรวมระยะทาง 123 กิโลเมตร แม่น้ำท่าจีนตอนกลางตั้งแต่อำเภอเมืองสุพรรณบุรีถึงอำเภอนครชัยศรี นครปฐม รวมระยะทาง 120 กิโลเมตร แม่น้ำท่าจีนตอนล่างตั้งแต่อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐมถึงปากแม่น้ำอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสมุทรสาคร รวมระยะทาง 82 กิโลเมตร

ตามอนุสัญญาสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (Stockholm convention on Persistent Organic Pollutants, POPs) ประเทศไทยเป็นรัฐภาคีใน 50 ประเทศ ได้ให้สัตยาบันในเรื่องการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การปนเปื้อนของสารมลพิษ เพื่อเป็นการคุ้มครองสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสิ่งแวดล้อมจากสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน โดยให้มีการลดและเลิกการใช้สารเหล่านี้ มีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 17 พฤษภาคม 2547 (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ได้ศึกษาการสะสมและการแพร่กระจายของสารพิษตกค้างเหล่านี้ รวมทั้งสารพิษกลุ่มอื่นๆ ในบริเวณเกษตรกรรมลุ่มแม่น้ำที่สำคัญๆ ตั้งแต่ปี 2545 (ภิญญา และคณะ 2545) เป็นต้นมา และในปี 2553 (มลิสา และคณะ 2553) ได้ทำการศึกษาในเขตลุ่มแม่น้ำป่าสักซึ่งเป็นแม่น้ำสายหลักสำคัญในเขตภาคกลาง และยังคงตรวจพบสารพิษตกค้างในกลุ่ม POPs ปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเพื่อเป็นการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การปนเปื้อนของวัตถุมีพิษการเกษตรในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรมอย่างต่อเนื่อง ในปี 2554 จึงได้เลือกทำการศึกษาในเขตพื้นที่ลุ่มแม่ท่าจีนและคลองแยก ซึ่งถือได้ว่าเป็นแม่น้ำอีกสายหนึ่งที่มีความสำคัญในเขตภาคกลาง รวมทั้งมีพื้นที่สำหรับทำการเพาะปลูกพืชที่หลากหลาย ประกอบกับสถานการณ์การใช้สารพิษที่ผ่านมามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (กรมควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร, 2553) น่าจะเกิดผลกระทบและปนเปื้อนสู่แม่น้ำและแหล่งน้ำใกล้เคียง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วสกัดได้แก่ separatory funnel, beaker, cylinder, Erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for auto sampler, volumetric pipette และ volumetric flask

2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ

2.1 สารเคมี analytical grade ได้แก่ siliga gel, SPE C18, SPE florisil, anhydrous sodium sulfate, acetone, dichloromethane, ethyl acetate, ethyl ether, hexane, methanol, sodium hydrogen carbonate, sulfuric acid, sodium hydroxide และ sodium chloride, ammonium chloride สารเคมีชนิด pesticide grade และ HPLC grade

ได้แก่ acetone, acetonitrile, ethyl acetate, hexane และ iso-octane

2.2 สารพิษมาตรฐาน pesticide grade กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 20 ชนิด ประกอบด้วย aldrin, alpha BHC, alpha endosulfan, beta BHC, beta endosulfan, cis chlordane, dicofol, dieldrin, endosulfan sulfate, endrin, gamma BHC, heptachlor, heptachlor epoxide, o,p'-DDE, o,p'-DDT, o,p'-TDE, p,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'–TDE และ trans chlordane กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 21 ชนิดประกอบด้วย azinphos ethyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, diazinon, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, ethoprophos, fenthion, fenitrothion, malathion, methidathion, monocrotophos, parathionmethyl, pirimiphos methyl, profenofos, triazophos, methamidophos, omethoate และ phosalone กลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด ประกอบด้วย bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, lamda cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate และ permethrin กลุ่มคาร์บาเมท 7 ชนิด ประกอบด้วย carbaryl, carbofuran, fenobucarb, metalaxyl, methomyl, metolcarb และ promecarb กลุ่มไทรอาซีน 3 ชนิด ประกอบด้วย ametryn, metribuzin และ triazine กลุ่ม chlorophenoxy compounds ชนิด 2,4-D และกลุ่ม bipyridyliums ชนิด paraquat

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องชั่งละเอียด, เครื่องสกัดชนิด separatory funnel shaker, shaker, Homogeneizer เครื่อง food processor เครื่องลดปริมาตร, เครื่อง spectrophotometer, เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ของบริษัท Agilent Technology รุ่น HP 6890 หัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) และ Electron Capture Detector (ECD), เครื่อง Gas Chromatograph Mass spectrometry รุ่น 5973

4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง ได้แก่ แคงทำด้วย stainless steel และขวดพลาสติกชนิด polypropylene พร้อมฝาปิสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ ช้อนทำด้วย stainless steel และขวดแก้วพร้อมฝาปิด สำหรับเก็บตัวอย่างตะกอน ถุงพลาสติกพร้อมที่ผูก สำหรับเก็บตัวอย่างพืชน้ำและสัตว์น้ำ ถังแช่พร้อมฝาปิดสำหรับเก็บรักษาสภาพตัวอย่างในระหว่างขนส่ง

วิธีการ

1. สำรวจพื้นที่และกำหนดจุดเก็บตัวอย่างบริเวณที่พื้นที่เกษตรกรรมที่แม่น้ำท่าจีนไหลผ่านตลอดทั้งสาย โดยใช้ระบบกำหนดตำแหน่งพื้นโลกด้วยดาวเทียม (Global Positioning System; GPS)

2. การเก็บ และเตรียมตัวอย่าง

2.1 ตัวอย่างน้ำ สุ่มเก็บให้เต็มขวดปริมาตรประมาณตัวอย่างละ 4 ลิตร

2.2 ตัวอย่างตะกอน สุ่มเก็บจุดเดียวกับน้ำ ให้ได้น้ำหนักประมาณ 500 กรัม ปิดฝาให้สนิท ก่อนนำไปสกัดผึ่งในถาดสแตนเลสที่อุณหภูมิห้อง ให้มีความชื้นประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ (พงศ์ศรีและพูลสุข, 2545) แล้วทุบให้ละเอียดผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ก่อนนำไปสกัดและหาเปอร์เซนต์ความชื้น

2.3 ตัวอย่างสัตว์น้ำ (ปลา) เก็บใส่ในถุงพลาสติก เตรียมตัวอย่างโดยเลือกเฉพาะส่วนเนื้อ นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง food processor

2.4 ตัวอย่างพืชน้ำ (ผักบุ้ง ผักกระเฉด) จะสุ่มเก็บในบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่เก็บน้ำและตะกอน ให้ได้น้ำหนักมากพอสำหรับการสกัด นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง food processor ตัวอย่างน้ำ ตะกอน สัตว์น้ำและพืชน้ำที่สุ่มเก็บได้ เก็บในถังแช่น้ำแข็ง เพื่อป้องกันสารพิษสลายตัวในระหว่างการขนส่ง

3. การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน เตรียม stock standard solution ของสารพิษแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น ประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม Intermediate standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมของแต่ละกลุ่มให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.01 - 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. วิธีการสกัดตัวอย่าง

4.1 การสกัดสารพิษในน้ำ

4.1.1 กลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มไพรีทรอยด์ ตวงตัวอย่างน้ำ 1,000 มิลลิลิตร สกัดด้วย hexane (AR) 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 3 นาที ชั้นบนกรองผ่าน anh. Na_2SO_4 เก็บใน round bottom flask ชั้นล่างเป็นชั้นน้ำนำไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วย hexane (AR) 50 มิลลิลิตร เก็บรวมกับครั้งแรก นำไปลดปริมาตร โดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิดหัวตรวจวัด ECD

4.1.2 กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มคาร์บาเมท และกลุ่มไทรอาซีนใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับวิธีการสกัดข้อ 4.1.1 แต่จะเปลี่ยนในส่วนของสารเคมีที่ใช้ในการสกัดจาก hexane เป็น ethyl acetate และนำสารสกัดที่ได้ฉีดเครื่อง GC ชนิด FPD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และฉีดเครื่อง GC – MS เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มคาร์บาเมทและกลุ่มไทรอาซีน

4.1.3 กลุ่ม chlorophenoxy compound ชนิด 2,4-D ตวงตัวอย่างน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 18 N H_2SO_4 ให้ได้ ≤ 2 เติม methanol: ethyl ether (2:8) 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 3 นาที กรองผ่าน anh. Na_2SO_4 เก็บใน round bottom flask ชั้นล่างเป็นชั้นน้ำนำไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วย methanol : ethyl ether (2:8) 50 มิลลิลิตร เก็บรวมกับครั้งแรก เติม 10 M NaOH 10 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ water bath 60 องศาเซลเซียส นาน 35 นาที เทตัวอย่างใส่ separatory funnel ล้าง round bottom flask ที่ใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งชั้น dichloromethane ปรับ pH ด้วย 18 N H_2SO_4 (เย็น) ให้ได้ ≤ 2 เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ กรองผ่าน anh. Na_2SO_4 ลงใน round bottom flask สกัดด้วย dichloromethane 25 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 2 ครั้ง ล้าง separatory funnel ที่ใส่ตัวอย่างด้วย dichloromethane 10 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วย rotary evaporator ให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร เติม methanol:conc. H_2SO_4 (9:1) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทตัวอย่างลงใน separatory funnel ล้าง round bottom flask ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เติม hexane (PR) 10 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ทิ้งชั้นล่าง เติม 0.5 M $NaHCO_3$ 15 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทิ้งชั้นล่าง ชั้นบนกรองผ่าน anh. Na_2SO_4 ลงใน graduated tube นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD

4.1.4 กลุ่ม bipyridilium ชนิด paraquat ตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร นำไป clean up โดยใช้ burette อุดปลายด้วย glass wool บรรจุ cation exchange resin 5 กรัม ใส่ใน burette เติม sat^{d} NaCl 50 มิลลิลิตร ไขทิ้งเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ไขทิ้งเติมตัวอย่างปรับอัตราการไหลประมาณ 10 -12 มิลลิลิตรต่อนาที เติมน้ำกลั่น 50

มิลลิลิตร 2 N HCl 50 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 2.5% NH_4Cl 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทั้งหมด ปรับอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที ชะตัวอย่างด้วย sat^{d} NH_4Cl 50 มิลลิลิตร ปรับอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นำไปตรวจวัดเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 396 นาโนเมตร

4.2 ตัวอย่างตะกอน

4.2.1 การหาความชื้นในตะกอน ตัวอย่างตะกอนที่นำมาตรวจวิเคราะห์จะต้องคำนวณเปอร์เซนต์ความชื้นตามวิธีการ (Back C.A., 1965) เพื่อนำไปลบน้ำหนักตัวอย่างตะกอนที่มีความชื้นจะได้น้ำหนักตะกอนแห้งสุทธิ สำหรับใช้คำนวณในขั้นตอนการหาปริมาณสารพิษ ซึ่งจะแบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งสำหรับคำนวณเปอร์เซนต์ความชื้นพร้อมๆ กับแบ่งไปสกัด โดยชั่งและบันทึกน้ำหนัก petri dish และชั่งตัวอย่างตะกอนใส่ใน petri dish นี้ 50 กรัม นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 $\pm$ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปใส่ใน desiccators ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างตะกอนพร้อม petri dish และนำตัวอย่างอบต่ออีกประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักครั้งที่ 2 ถ้าน้ำหนักที่หายไปจากการอบครั้งที่ 1 และ 2 แตกต่างกันไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าน้ำระเหยออกจากตัวอย่างหมดแล้ว ถ้ามากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จะต้องนำไปอบต่ออีก 3 – 4 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักที่หายไปแตกต่างกันไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ จึงจะนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นและน้ำหนักตะกอนแห้ง

4.2.2 การสกัดสารพิษ

4.2.2.1 กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มไพรีทรอยด์ กลุ่มคาร์บาเมท และกลุ่มไทรอาซีน ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ Erlenmeyer flask เติม ethyl acetate (AR) 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker นาน 5 ชั่วโมง กรองสารสกัดผ่าน anh. $NaSO_4$ ใส่ใน round bottom flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย ethyl acetate 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร ดูดสารสกัด 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด FPD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และฉีดเครื่อง GC-MS เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มคาร์บาเมทและกลุ่มไทรอาซีน ส่วนสารสกัดที่เหลือ 1 มิลลิลิตร เปลี่ยนและปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 2.5 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด ECD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มไพรีทรอยด์

4.2.2.2 กลุ่ม chlorophenoxy compound ชนิด 2 4-D ตะกอน 20 กรัม ใส่ Erenmeyer flask เติม methanol:water (8:2) 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที กรองผ่าน anh. Na_2SO_4 เก็บใน round bottom flask เติม 10 M NaOH 10 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ water bath 60 องศาเซลเซียส นาน 35 นาที เทตัวอย่างใส่ separatory funnel ล้าง round bottom flask ที่ใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งชั้น dichloromethane ปรับ pH ด้วย 3 M H_2SO_4 ให้ได้ < 3 เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ กรองผ่าน anh. Na_2SO_4 ลงใน round bottom flask สกัดด้วย dichloromethane 25 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 2 ครั้ง ล้าง separatory funnel ที่ใส่ตัวอย่างด้วย dichloromethane 10 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วย rotary evaporator ให้เกือบแห้งเติม methanol: conc. H_2SO_4 (9:1) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทตัวอย่างลงใน separatory funnel ล้าง round bottom flask ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เติม hexane (PR) 10 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ทิ้งชั้นล่าง(ชั้นน้ำ) เติม 0.5 M $NaHCO_3$ 15 มิลลิลิตร เขย่า

ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นทิ้งชั้นล่าง (ชั้น $NaHCO_3$) ชั้นบนกรองผ่าน anh. Na_2SO_4 ลงใน graduated tube นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/ECD

4.2.2.3 กลุ่ม bipyridilium ชนิด paraquat ตัวอย่างตะกอน 25 กรัม ใส่ round bottom flask เติมน้ำ 65 มิลลิลิตร เติม 18 N H_2SO_4 35 มิลลิลิตร และ octanal 1 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 5 ชั่วโมง กรองผ่าน cillite ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไป clean up โดยใช้ burette อุดปลายด้วย glass wool บรรจุ cation exchange resin 5 กรัม ใส่ใน burette เติม sat^{d} NaCl 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมตัวอย่าง เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร 2 N HCl 100 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร 2.5 % NH_4Cl 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ทั้งหมดปรับอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาทีและไขทิ้ง ชะตัวอย่างด้วย sat^{d} NH_4Cl 50 มิลลิลิตรปรับอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บชั้นสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 396 นาโนเมตร

4.3 การสกัดสารพิษในพืชน้ำ (ดัดแปลงจาก Steinwandter, 1985)

4.3.1 การสกัด ชั่งตัวอย่างพืชบด 25 กรัม ใส่ขวดปริมาตร เติม acetone 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วย homogenizer นาน 1 นาที เติม dichloromethane 40 มิลลิลิตร และ NaCl 8 กรัม ปั่นต่ออีก 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ใส ใส่ Erlenmeyer flask เติม anh. $NaSO_4$ 15 กรัม ตั้งไว้ประมาณ 20 นาที กรองผ่าน anh. $NaSO_4$ แบ่งสารละลาย 50 มิลลิลิตร ใส่ round bottom flask นำไปลดปริมาตรเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 10 มิลลิลิตร แบ่งสารสกัด 2 มิลลิลิตร ไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยใช้เครื่อง GC ชนิด FPD และตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มคาร์บาเมทและไทรอาซีน โดยใช้เครื่อง GC–MS ส่วนสารสกัดอีก 4 มิลลิลิตร นำไปขจัดสิ่งปนเปื้อน

4.3.2 การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ชั่ง siliga gel ที่ deactivated ด้วยน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 กรัม ใส่ในคอลัมม์เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ปิดทับ siliga gel ด้วย anh. $NaSO_4$ สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ล้างคอลัมม์ด้วย hexane 5 มิลลิลิตร ดูดสารสกัดตัวอย่างลงในคอลัมม์ ชะตัวอย่างในคอลัมม์ด้วยสารผสมของ hexane: dichloromethane (4:1) 5 มิลลิลิตร และสารผสมของ hexane:dichloromethane (1:1) 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใน round bottom flask นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 2 มิลลิลิตรด้วย hexane (PR) ดูดสารสกัดใส่ vial นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด ECD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มไพรีทรอยด์

4.4 การสกัดสารพิษในเนื้อปลา ใช้วิธีของ FEEI SUN (2000)

4.4.1 การสกัด ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบด 10 กรัม ใส่ขวดปริมาตร เติม acetonitrile 50 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้ homogenizer 1 นาที กรองผ่านกระดาษกรองด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum pump) ใส่ใน Erlenmeyer flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย acetonitrile 100 มิลลิลิตร ตวงแบ่งสารสกัด 50 มิลลิลิตร ใส่ใน round bottom flask นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง เติม acetonitrile 15 มิลลิลิตร นำไปขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up)

4.4.2 การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ใช้ SPE ชนิด C18 ต่อกับ SPE ชนิด florisil ที่บรรจุเพิ่มด้วย anh. $NaSO_4$ 2 กรัม ล้างคอลัมม์ด้วย acetonitrile 6 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจากข้อ 4.4.1 ใส่คอลัมม์และปรับอัตราการไหล 3 หยดต่อวินาที ใส่ใน graduated tube ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย

ethyl acetate (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร แบ่งสารสกัด 0.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เครื่อง GC ชนิด FPD และตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มคาร์บาเมทและไทรอาซีน โดยใช้เครื่อง GC–MS สารสกัดที่เหลือ 0.5 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง และปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 0.5 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด ECD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มไพรีทรอยด์

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด) ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินงาน กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ ตะกอน พืชน้ำและสัตว์น้ำ เพื่อศึกษาการสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรมของลุ่มแม่น้ำท่าจีนทั้งหมด 4 ครั้งในช่วงเดือนธันวาคม 2553 เดือนกุมภาพันธ์ เดือนเมษายน และเดือนมิถุนายน 2554 รวมตัวอย่างที่สุ่มเก็บทั้งหมด 265 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างน้ำ ตะกอน พืชน้ำและสัตว์น้ำ จำนวน 93, 85, 66 และ 21 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 5 กลุ่ม แบ่งเป็นสารกำจัดแมลง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 20 ชนิด กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 21 ชนิด กลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด และกลุ่มคาร์บาเมท 7 ชนิด และสารกำจัดวัชพืช 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไทรอาซีน 3 ชนิด กลุ่มคลอโรฟีนอกซี คอมพาวด์ 1 ชนิด กลุ่มไบไพริดิเลียม 1 ชนิด ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษในตัวอย่างน้ำ 93 ตัวอย่างพบสารพิษตกค้างในตัวอย่างน้ำ 76 ตัวอย่าง คิดเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ สารพิษที่ตรวจพบเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์การ์โนคลอรีน จำนวน 41 ตัวอย่างซึ่งสารพิษที่ตรวจพบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสารมลพิษที่มีฤทธิ์ตกค้างยาวนาน (Persistant Organic Pollutants; POPs) ในสิ่งแวดล้อมได้แก่ ชนิด DDT & metabolites และ endrin ปริมาณ < 0.01– 0.02 และ < 0.01 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจพบ endosulfan ซึ่งเป็นวัตถุอันตรายประเภทที่ 4 ที่ประกาศห้ามใช้ตั้งแต่ปี 2547 ปริมาณ 0.01– 0.07 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้งนี้น่าจะเกิดจากการที่เกษตรกรลักลอบนำมาใช้กำจัดหอยเชอรี่ในนาข้าว ส่วนสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสจะตรวจพบมากในการสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ในเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เข้าสู่ฤดูแล้ง ปริมาณน้ำในบางจุดค่อนข้างน้อย ประกอบกับในบางพื้นที่ยังมีการทำไร่และปลูกผัก จึงทำให้ตรวจพบสารพิษกลุ่มนี้ ได้แก่ชนิด chlorpyrifos, EPN, ethion, monocrotophos และ triazophos ปริมาณ 0.03, 0.02–0.49, 0.01– 0.04, 0.01- 0.21 และ 0.02-0.04 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวน 25 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังตรวจพบสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมทชนิด carbofuran และ metalaxyl ปริมาณ 0.76 และ 0.08 - 0.20 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวน 3 ตัวอย่าง และสารกำจัดวัชพืชกลุ่มไทรอาซีนชนิด ametryn, และ atrazine ปริมาณ 0.09 – 0.79 และ 0.05 – 0.42 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวน 69 ตัวอย่าง ซึ่งกลุ่มสารกำจัดวัชพืชกลุ่มนี้จะตรวจพบทุกครั้ง และเกือบทุกตัวอย่างในการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้ง 4 ครั้ง ซึ่งกำจัดวัชพืชชนิด atrazine ไม่อยู่ในสารกลุ่ม POPs และไม่ได้กำหนดค่า MAC ของน้ำทางการเกษตรและน้ำผิวดินไว้ ปริมาณที่ตรวจพบค่อนข้างสูงจะอยู่ในช่วงเดือนมิถุนายนซึ่งเป็นระยะที่เริ่มทำการเพาะปลูกจึงมีการใช้มาก ทำให้มีการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ ค่า LC_{50} (96 hour) ที่เป็นพิษต่อปลา rainbow trout มีค่า 8.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นปริมาณที่พบจึงไม่อยู่ในระดับที่เป็นพิษต่อปลา (Anonymous 1994) ส่วนสารพิษชนิดอื่นๆ ที่ตรวจพบยังไม่เกินค่าสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Maximum Allowable Concentration, MAC) ในน้ำ (μg/L) (ตารางที่ 3)

ตัวอย่างตะกอน 85 ตรวจพบสารพิษ 29 ตัวอย่าง คิดเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิด DDT & metabolites และ endosulfan ปริมาณ < 0.01 และ < 0.01 – 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 8 ตัวอย่าง กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสชนิด ethion, chlorpyrifos และ monocrotophos ปริมาณ <0.01-0.03, <0.01-0.07 และ <0.01-0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 22 ตัวอย่าง กลุ่มไพรีทรอยด์ชนิด bifenthrin และ cypermethrin ปริมาณ 0.01 และ <0.01 – 0.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 3 ตัวอย่าง สารกำจัดวัชพืชกลุ่มไทรอาซีน ชนิด ametryn ปริมาณ 0.03-0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 2 ตัวอย่าง และสารกำจัดวัชพืชกลุ่มคลอโนฟีนอกซี คอมพาวด์ชนิด 2,4-D ปริมาณ < 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 2 ตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชน้ำเป็นชนิดที่นำมาบริโภคเป็นผักได้แก่ ผักบุ้งน้ำ *(Ipomoea aquatica)* จำนวน 66 ตัวอย่าง และ ผักกระเฉด *(Neptunia oteracea)* จำนวน 5 ตัวอย่าง รวม 71 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษ 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 7 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิด dieldrin และ endosulfan ปริมาณ < 0.01 และ < 0.01 - 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 4 ตัวอย่าง และตรวจพบสารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ชนิด cypermethrin ปริมาณ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างสัตว์น้ำ 21 ตัวอย่าง แบ่งเป็นปลาตะเพียน *(Barbodes gonionotus)* 5 ตัวอย่าง ปลาแขยง *(Mystus bocourti)* 4 ตัวอย่าง ปลายี่สก *(Probarbus jullieni)* 2 ตัวอย่าง ปลากราย *(Chitala ornata)* ปลาเนื้ออ่อน *(Micronema bleekri)* ปลาหมอ *(Anabas testudineus)* ปลาสลิด *(Trichogaster pectoralis)* ปลาสวาย *(Pangasianodon hypophthalmas)* ปลากระดี่ *(Trihogaster microlepis)* ปลาดุก *(Clarias batrachus)* ปลากระสูบ *(Hampala dispar)* ปลาสังกะวาด *(Pangasius macronema)* ปลากดเหลือง *(Mystus nemurus)* ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษ 20 ตัวอย่าง คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิด DDT & metabolites, dieldrin และ endosulfan ปริมาณ <0.01- 0.02, <0.01 และ <0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 19 ตัวอย่าง กลุ่มไพรีทรอยด์ชนิด cypermethrin ปริมาณ <0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ซึ่งสารพิษที่ตกค้างในปลาส่วนใหญ่จะถ่ายทอดทางห่วงโซ่อาหารสามารถเพิ่ม และทวีปริมาณขึ้นสะสมในเนื้อเยื่อและไขมันของเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ หรือที่เรียกว่า bioaccumulation อย่างไรก็ตามค่าที่ตรวจพบนี้ยังอยู่ในระดับที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค เมื่อเปรียบเทียบกับ acute oral LD_{50} ของสารพิษที่ทดลองกับหนูได้แก่ DDT & metabolites, endosulfan และ cypermethrin มีค่าเท่ากับ 113, 70 และ 200-800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Anonymous, 1994)

ตารางที่ 1. จุดเก็บตัวอย่าง จากการกำหนดตำแหน่งพื้นโลกด้วยดาวเทียม (Global Positioning System; GPS)

รหัส	x	y	สถานที่
P1	613486	1687695	วัดปากคลองมะขามเฒ่า ต.ปากคลองมะขามเฒ่า อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท
P2	615254	1682373	ประตูน้ำพลเทพ ต.หาดท่าเสา อ.เมือง จ.ชัยนาท
P3	612261	1674168	ต. หนองน้อย อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท
P4	610392	1667175	ต.หนองหวาย อ.สามง่ามพระโบสถ์ จ.ชัยนาท
P5	608738	1657477	ต.หันคา อ.หันคา จ.ชัยนาท
P6	607916	1650268	บ.หนองทรกู ต.บ้านเชี่ยน อ.หันคา จ.ชัยนาท
P7	616114	1650571	วัดปากน้ำ ต.เดิมบาง อ.เดิมบางนางบวช จ.สุพรรณบุรี
P8	618058	1641482	วัดเขาพระ ต.เขาพระ อ.เดิมบางนางบวช จ.สุพรรณบุรี
P9	622494	1620460	วัดพังม่วง ต.พังม่วง อ.ศรีประจันทร์ จ.สุพรรณบุรี
P10	623385	1611624	วัดไก่เตี้ย ต.วังยาง อ.ศรีประจันทร์ จ.สุพรรณบุรี
P11	618424	1611624	คลองชลประทาน บ้านวังกุ่ม ต วัดวังกุ่ม อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี
P12	620513	1605990	วัดพระนอน ต.พิหารแดง อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี
P13	623607	1584606	วัดสุขเกษม ต.บ้านแหลมพัฒนา อ.บางปลาม้า จ.สุพรรณบุรี
P14	620407	1566909	ต.บางตะเคียน อ.สองพี่น้อง (จุดบรรจบคลองลัดปากเกร็ดและแม่น้ำท่าจีน)
P15	620953	1561118	คลองบางหลวง ต.บางหลวง อ.บางเลน จ.นครปฐม
P16	620950	1561128	วัดบางปลา ต.บางหลวง อ.บางเลน จ.นครปฐม
P17	627292	1546351	วัดสุขวัฒนาราม ต.บางระกำ อ.บางเลน จ.นครปฐม
P18	629823	1540210	วัดสำโรง ต.วัดสำโรง อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม (จุดบรรจบแม่น้ำท่าจีนและคลองโยง)
P19	623232	1529053	ปากคลองจินดา ต.บางช้าง อ.สามพราน จ.นครปฐม
P20	626990	1526576	คลองเจดีย์บูชา บ้านสะพานหก หมู่ 1 ต.วัดแขก อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม
P21	626906	1590365	คลองบางยี่หน บ้านปากคลองกุ่ม ต.มะค่า อ.บางปลาม้า จ.สุพรรณบุรี
P22	630537	1515576	สะพานบางยางรุ่งสินพัฒนา ต.บางยาง อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร
P23	633341	1508643	สะพานท่าจีน2 ต.ท่าเสา อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร (ใกล้จุดบรรจบคลองดำเนินสะดวก และคลองภาษีเจริญ)
P24	6301021	1509633	วัดใหญ่จอมปราสาท ต.ท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร

ตารางที่ 2. ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างน้ำ ตะกอน พืชน้ำ และสัตว์น้ำในบริเวณเกษตรกรรมลุ่มแม่น้ำท่าจีน และคลองแยก

ตัวอย่าง	จำนวน		กลุ่มสารพิษ	ปริมาณ	ชนิดของสารพิษ
	ทั้งหมด (270)	ตรวจพบ (130)			
น้ำ	93	76	Organochlorines (41)	< 0.01 – 0.07 < 0.01 0.01 – 0.02 < 0.01	endosulfan endrin o,p′ -DDE p,p′ -DDE
			Oraganophosphorus (25)	0.03 0.02 -0.49 0.01 – 0.04 0.01 - 0.21 0.02 – 0.04	chlorpyrifos EPN ethion monocrotophos triazophos
			Triazine (69)	0.09 – 0.79 0.05 - 0.42	ametryn atrazine
			Carbamate (1)	0.76	carbofuran
			Phenylamide: acylalanine (3)	0.08 – 0.20	metalaxyl
ตะกอน	85	29	Organochlorines (7)	< 0.01 – 0.02 < 0.01	endosulfan p,p′-DDE
			Oraganophosphorus (22)	< 0.01 - 0.07 < 0.01 – 0.03 < 0.01 – 0.01	chlorpyrifos ethion monocrotophos
			Pyrethroids (3)	0.01 < 0.01 – 0.33	bifenthrin cypermethrin
			Triazine (2)	0.03 – 0.12	ametryn
			Chlorophenoxy compound (2)	< 0.01	2,4-D
พืชน้ำ	71	5	Organochlorines (4)	< 0.01 < 0.01 -0.02	dieldrin endosulfan
			Pyrethroids (1)	0.02	cypermethrin
สัตว์น้ำ	21	20	Organochlorines (19)	< 0.01 < 0.01 < 0.01 - 0.02 < 0.01 < 0.01 - 0.01	dieldrin endosulfan p,p′-DDE p,p′-DDT p,p′-TDE
			Pyrethroids (1)	< 0.01	cypermethrin

หมายเหตุ : น้ำ : ปริมาณที่พบหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อลิตร (µg/L)

ตะกอน พืชน้ำ และสัตว์น้ำ : ปริมาณที่พบหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

ตารางที่ 3. ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน (กรมควบคุมมลพิษ, 2552)

ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	เกณฑ์มาตรฐานสูงสุด ตามการแบ่งประเภทคุณภาพน้ำตามการใช้ประโยชน์			
		ประเภท 1	ประเภท 2	ประเภท 3	ประเภท 4
สารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ชนิดที่มีคลอรีนทั้งหมด (Total Organochlorines Pesticides)	มิลลิกรัมต่อลิตร	ธ	0.05		
ดีดีที (DDT)	ไมโครกรัมต่อลิตร	1.0	1.0		
บีเอชซีชนิดเอลฟ่า (alpha BHC)			0.02		
ดิลดริน (Dieldrin)			0.1		
อัลดริน (Aldrin)			0.1		
เฮปตาคลอร์ และเฮปตาคลออีปอกไซด์ (heptachlor & heptachlor epoxide)			0.2		

ธ : เป็นไปตามธรรมชาติ

ประเภท 1 : แหล่งน้ำที่คุณภาพน้ำมีสภาพตามธรรมชาติ โดยปราศจากน้ำทิ้งจากกิจกรรมทุกประเภทและสามารถใช้ประโยชน์

1) การอุปโภคและบริโภคต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อน
2) การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตระดับพื้นฐาน
3) การอนุรักษ์ระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ

ประเภท 2 : แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์

1) การอุปโภคและบริโภค โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติ และผ่านกระบวนการปรังปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน
2) การอนุรักษ์สัตว์น้ำ
3) การประมง
4) การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ

ประเภท 3 : แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

1) การอุปโภคและบริโภคโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติ และผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน
2) การเกษตร

ประเภท 4 : แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

1) การอุปโภคและบริโภค โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติ และผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษก่อน
2) การอุตสาหกรรม

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ ตะกอน พืชน้ำ และสัตว์น้ำในบริเวณลุ่มแม่น้ำท่าจีนและคลองแยก ตรวจพบสารพิษตกค้างส่วนใหญ่เป็นกลุ่มมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (POPs) แต่อยู่ในระดับต่ำ ไม่เกินค่ากำหนดที่ยอมให้มีได้ (MAC) ในน้ำและไม่อยู่ในระดับที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยค่า LC_{50} (96 hour) กำหนดไว้ในปลา golden orfe 2 ไมโครกรัมต่อลิตร (Anonymous, 1994) อย่างไรก็ตามสารกลุ่ม POPs ที่ตรวจพบในปริมาณต่ำนี้ก็ยังคงทนอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน ส่งผลกระทบไปยังห่วงโซ่อาหาร มนุษย์ในฐานะที่เป็นผู้บริโภคควรมีความระมัดระวังและพิจารณาที่จะบริโภคอาหารจากแหล่งเหล่านี้ซึ่งเป็นเรื่องที่มีความจำเป็นที่จะต้องติดตามตรวจสอบการแพร่กระจายและการสะสมของสารกลุ่มนี้อย่างต่อเนื่องต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นข้อมูลเพื่อเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การใช้ การแพร่กระจาย และการสะสมของสารพิษการเกษตรในแหล่งแม่น้ำ และคลองแยกใกล้เคียง
2. เป็นข้อมูลในการติดตามสถานการณ์การปนเปื้อนของสารมลพิษตกค้างยาวนาน (POPs) ตามอนุสัญญาสตอกโฮล์ม
3. เกษตรกรและผู้อาศัยในเขตลุ่มแม่น้ำท่าจีนและคลองแยกที่เกี่ยวข้อง ได้ทราบข้อมูลการปนเปื้อน การแพร่กระจายและการสะสมของสารพิษการเกษตร ทำให้เกิดความมั่นใจในการตัดสินใจที่จะใช้น้ำจากแหล่งดังกล่าวเพื่อการอุปโภคหรือบริโภค
4. ใช้ประกอบการพิจารณาการห้ามใช้ การยกเลิกการใช้สารพิษบางชนิด ในกรณีที่มีการตรวจพบสารพิษเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมเกินค่ามาตรฐานที่กำหนด

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ 2547 Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) อนุสัญญาสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน 99 หน้า

ส่วนแหล่งน้ำจืด สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 2552 มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน

พงศ์ศรี ใบอดุลย์ และพูลสุข หฤทัยธนาสันติ์ 2545 การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ในดินและน้ำ เอกสารประกอบการประชุมวิชาการกองวัตถุมีพิษการเกษตร ครั้งที่ 4 หน้า 240-246.

ภิญญา จุลินทร และคณะ 2545 การแพร่กระจายของวัตถุมีพิษจากแหล่งเกษตรกรรมลงสู่แม่น้ำสายหลักในประเทศไทย เอกสารประกอบการประชุมวิชาการกองวัตถุมีพิษการเกษตร ครั้งที่ 4 หน้า 55-63.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร 2553 สถิติการนำเข้าวัตถุมีพิษทางการเกษตร 2553

มลิสา เวชยานนท์ และคณะ 2553 การสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรม : แม่น้ำป่าสัก ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553 หน้า 34-46

Anonymous 1994. The Agrochemical Handbook Third Edition. The Royal Society of Chemical, Cambridge, England.

Back C.A. 1965. “Method of soil analysis: part I physical and mineralogical properties”. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min on-line Method for Extraction and Isolating Pesticide Residues and industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem. 322: 752-754.

ศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชในนาข้าว : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน

Pesticide Residue Contaminated on the Body of Sprayer in Rice Field : 2,4-D in Paddy Irrigation Area

ปรีชา ฉัตรสันติประภา สิริพร เหลืองสุชลกุล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่นวัตถุมีพิษ เพื่อประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว ได้ทำการศึกษาที่ตำบลสนามชัย อำเภอเมืองสุพรรณบุรี จังหวัดสุพรรณบุรี โดยฉีดพ่นสารพิษ 2,4-D สูตร 84% W/V SL จำนวน 2 ครั้ง ตามอัตราฉีดพ่นที่แนะนำ คือ ครั้งที่ 1 ฉีดพ่นก่อนหว่านเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยใช้ความเข้มข้น 45 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ครั้งที่ 2 ฉีดพ่นหลังจากต้นข้าวงอกประมาณ 2 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้น 16 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ภายหลังการฉีดพ่น ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ 2,4-D บนแผ่นผ้าที่ติดตามจุดต่างๆ ได้แก่ หมวก จมูก บ่า อก(นอก-ใน) ข้อศอก หลัง(นอก-ใน) ต้นขา และหน้าแข้ง(นอก-ใน) บนร่างกายของผู้ฉีดพ่น รวมทั้งน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าภายหลังการฉีดพ่นด้วย นอกจากนี้ยังตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ 2,4-D บนเสื้อและกางเกงของผู้ฉีดพ่นด้วย จากผลการทดลองฉีดพ่นทั้ง 2 ครั้ง พอสรุปได้ว่าจุดบนร่างกายที่ผู้ฉีดพ่นมีโอกาสสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษมากที่สุดระหว่างการฉีดพ่นคือ บริเวณหน้าแข้งและต้นขาพบเฉลี่ย 26.95 และ 21.58 ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร รองลงมาได้แก่บ่า อก และ จมูก ปริมาณที่พบเฉลี่ย 16.44, 7.14 และ 5.02 ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร ส่วนข้อศอก และ หลัง มีโอกาสสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษลดลงมาตามลำดับ ปริมาณที่พบเฉลี่ย 2.21 และ 1.78 ไมโครกรัม/100ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ บริเวณศีรษะจะมีโอกาสสัมผัสกับวัตถุมีพิษน้อยที่สุดคือ พบเฉลี่ย 1.35 ไมโครกรัม/100ตารางเซนติเมตร นอกจากนี้ยังตรวจน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นภายหลังการฉีดพ่นด้วย พบว่าตรวจพบในน้ำล้างเท้ามากกว่าที่พบในน้ำล้างมือ ปริมาณที่ตรวจพบคือ 488.10 และ 396.99 ไมโครกรัม ส่วนชุดที่ใช้สวมใส่ในระหว่างที่ทำการฉีดพ่น พบว่าชุดกางเกงของผู้ฉีดพ่นมีปริมาณ 2,4-D ตกค้างมากกว่าที่เสื้อ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความสูงของวัชพืชอยู่ที่ระดับต่ำกว่าเอวของผู้ที่ฉีดพ่น ดังนั้นโอกาสที่ส่วนล่างของผู้ฉีดพ่นจึงมีโอกาสสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษมากกว่าส่วนบนของร่างกายผู้ฉีดพ่น และด้วยเหตุนี้ส่วนบนสุดของร่างกายคือที่ศีรษะ จึงตรวจพบปริมาณวัตถุมีพิษตกค้างอยู่น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ และเมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร ได้ค่า MOE มากกว่า 100 (ค่า MOE = NOAEL/Risk exposure) ซึ่งมีความหมายว่า การใช้สารพิษ 2,4-D ฉีดพ่นกำจัดวัชพืชในแปลงข้าว เกษตรกรมีโอกาสที่จะสัมผัสกับวัตถุมีพิษที่ใช้บ้าง แต่ปริมาณที่ได้รับยังไม่เกินค่าความเสี่ยงภัยที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ฉีดพ่น

คำนำ

2,4-D เป็นสารกำจัดวัชพืช ซึ่งจัดอยู่ในสารกลุ่ม chlorinated phenoxy compound เป็นหนึ่งในวัตถุมีพิษการเกษตรหลายชนิดที่เกษตรกรนิยมใช้กันแพร่หลายในการป้องกันกำจัดวัชพืชในนาข้าว และพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด ในปี 2554 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารพิษ 2,4-D ในปริมาณ 9,996 ตัน คิดเป็นมูลค่า 873 ล้านบาท นับได้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ต้องมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชชนิดนี้ ถึงแม้ว่าสารพิษชนิดนี้มีความเป็นพิษจัดอยู่ในระดับปานกลาง (Moderately toxic, WHO class II) และมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมค่อนข้างน้อย (ADI inhuman = 0.3 mg/kg) แต่โอกาสที่ผู้ใช้สารพิษชนิดนี้จะสัมผัสกับสารพิษก็มีโอกาสสูงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เพราะแปลงข้าวอยู่กลางทุ่งโล่งกว้าง ซึ่งย่อมต้องมีลมพัดอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นเมื่อเกษตรกรทำการฉีดพ่นสารพิษชนิดนี้ก็ย่อมมีโอกาสที่จะสัมผัสกับละอองของวัตถุมีพิษชนิดนี้มากไปด้วย ดังนั้นการฉีดพ่น 2,4-D ในแปลงนาข้าว นอกจากที่ละอองของสารพิษจะตกลงบนพืชที่เป็นเป้าหมายแล้ว สารพิษบางส่วนจะฟุ้งกระจายไปในอากาศ ตกลงบนพื้นดิน แหล่งน้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมายในการป้องกันกำจัด (non-target organism) รวมถึงตัวผู้ฉีดพ่นเองด้วย ซึ่งผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความเสี่ยงภัยมาก่อน กรมวิชาการเกษตรจึงได้กำหนดให้มีการเฝ้าระวัง ศึกษาหาข้อมูลการได้รับผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้ เพื่อประเมินความเสี่ยงภัยที่จะเกิดขึ้น ทั้งนี้เพื่อการควบคุมสารพิษชนิดนี้ทางกฎหมาย ตลอดจนการขออนุญาตขึ้นทะเบียน การจำกัดการใช้ หรือการห้ามใช้ต่อไป ด้วยเหตุนี้จึงต้องทำการศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษ 2,4-D บนร่างกายผู้ฉีดพ่นรวมถึง ผู้ที่ปฏิบัติงานในแปลงนาข้าว เพื่อที่จะใช้ประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในแปลงนาข้าว และเป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตรเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D ในแหล่งปลูกข้าว สำหรับการขออนุญาตขึ้นทะเบียนในคราวต่อไป ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมอื่นๆ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนนักวิจัย นักวิชาการ และประชาชนทั่วไปที่สนใจเพื่อใช้เป็นข้อมูล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แผ่นผ้าฝ้ายขนาด 10 x 10 cm^2 พร้อมเข็มกลัดซ่อนปลาย
2. ขวดแก้วและฝาปิดสำหรับใส่แผ่นผ้า
3. วัสดุเครื่องแก้วและเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ
4. เครื่องชั่งหยาบและเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)
5. เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด separatory funnel shaker
6. เครื่องเขย่า (reciprocal shaker)
7. เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator
8. เครื่องลดปริมาตร ชนิด nitrogen evaporator

9. เครื่องมือวิทยาศาสตร์และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ ตู้อบสารเคมี (digital oven) เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) เครื่องทำสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) และตู้ดูดความชื้น (desiccator)

10. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) พร้อมหัวตรวจจับชนิด Electron Capture Detector (ECD)

11. สารมาตรฐานชนิดป้องกันกำจัดแมลง (insecticide standards) 2,4-D ความบริสุทธิ์สูง

12. ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดแมลงที่ใช้ในแปลงข้าว สารกลุ่ม chlorinated phenoxy compound - 2,4-D สูตร 84% W/V SL ใช้อัตรา 45 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการ

เลือกแปลงทดลองของเกษตรกรที่ทำนาข้าวในบริเวณพื้นที่เขตชลประทานและมีการใช้สารพิษ 2,4-D ในระหว่างการดูแลรักษา ได้แปลงข้าวที่มีความเหมาะสมสำหรับการทดลองที่ ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี เนื้อที่ขนาด 3 ไร่ 3 งาน ทำเป็นคันนาสำหรับปลูกข้าว พื้นที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีบ่อน้ำข้างคันนา กว้าง 5 เมตร ยาว 15 เมตร และลึกประมาณ 1 เมตร โดยจะทำการไถทำเทือกก่อน และหมักดินไว้ 2-3 วัน ทำการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช 2,4-D สองครั้ง ตามอัตราฉีดพ่นที่แนะนำ คือ ครั้งที่ 1 ฉีดพ่นก่อนหว่านเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยใช้ความเข้มข้น 45 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ครั้งที่ 2 ฉีดพ่นหลังจากข้าวงอก 2 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้น 16 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้เวลาฉีดพ่น 25 และ 30 นาที (ในช่วงที่ดูแลรักษาเกษตรกรมีการฉีดพ่นสารพิษชนิดอื่นๆ อีก เพื่อกำจัดศัตรูพืชเป็นระยะๆ แต่ไม่ได้ใช้สาร 2,4-D อีก) โดยผู้ที่ทำการฉีดพ่น จะติดแผ่นผ้าไว้ตามจุดต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ หมวก จมูก บ่า หน้าอก(นอก-ใน) หลัง(นอก-ใน) ข้อศอก ต้นขา และหน้าแข้ง(นอก-ใน) เพื่อเป็นการตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษตามจุดต่างๆ บนร่างกายของผู้ปฏิบัติงานระหว่างการฉีดพ่นวัตถุมีพิษว่ามีปนเปื้อนอยู่ตามจุดต่างๆ ในปริมาณเท่าใด และทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างบนเสื้อผ้าของผู้ปฏิบัติงาน รวมทั้งน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าภายหลังการฉีดพ่นในแต่ละครั้งด้วย นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การดูแลรักษาผลผลิต การใช้วัตถุมีพิษชนิดอื่นๆ ระยะเวลาเกี่ยวข้าว ปริมาณน้ำฝน ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง ตลอดจนอุณหภูมิ และอื่นๆ

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำ : โดยทั่วไปถ้าน้ำมีลักษณะใส สามารถนำมาสกัดได้ทันที แต่ถ้ามีความขุ่นหรือสกปรกมากให้กรองด้วย Glass wool จนได้สารละลายใส

ตัวอย่างแผ่นผ้า : นำแผ่นผ้าที่เก็บจากแต่ละส่วนของร่างกายผู้ฉีดพ่น ใส่ในขวด Erlenmeyer flask ที่มีฝาปิดสนิทกันความชื้น

ตัวอย่างทั้งหมดถ้ายังไม่วิเคราะห์ในทันที ต้องเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารพิษ และเมื่อจะนำออกมาตรวจวิเคราะห์ ต้องตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ รอจนถึงอุณหภูมิห้อง

การตรวจวิเคราะห์ 2,4-D ในน้ำและแผ่นผ้า

ใช้วิธีของ BASF, Agricultural Research Station, 1985. และ In-house method, 2004.

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ : ตวงน้ำปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ ≤ 2 ด้วย 18 N H_2SO_4 เติมสารละลาย methanol:ethyl ether (2:8) 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง separatory funnel shaker ที่ความเร็วรอบ 75 รอบ/นาที นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ไขชั้นน้ำที่อยู่ชั้นล่างลงใน beaker ขนาด 1000 มิลลิลิตร สารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของ ethyl ether ไขผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน round bottom flask 250 มิลลิลิตร แล้วสกัดซ้ำด้วย methanol:ethyl ether (2:8) 50 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที กรองสารละลายผ่าน anhydrous Na_2SO_4 นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาเติม 10 M NaOH 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นลดปริมาตรด้วย rotary evaporator นาน 35 นาที (ตั้งอุณหภูมิ water bath ที่ 60ºC ไม่เปิด vacuum) เทตัวอย่างใส่ separatory funnel ขนาด 250 มิลลิลิตร ล้าง round bottom flask ที่ใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทรวมใน separatory funnel จากนั้นเติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งชั้นล่าง (ชั้นของ dichloromethane) ปรับ pH ให้ได้ ≤ 2 ด้วย 18 N H_2SO_4 เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน round bottom flask 125 มิลลิลิตร สกัดด้วย dichloromethane 25 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำไปลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร เติม 5 มิลลิลิตรของmethanol:conc.H_2SO_4 (9:1) ลงใน round bottom flask เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทตัวอย่างลงใน separatory funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม Hexane 10 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ทิ้งชั้นล่าง เติม $NaHCO_3$ 15 มิลลิลิตร เขย่า ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ทิ้งชั้นล่าง กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน graduated tube 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatograph (GLC) ใช้หัวตรวจจับชนิด Electron capture detector (μECD)

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแผ่นผ้า : นำแผ่นผ้าใส่ในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol : water (8:2) 100 มิลลิลิตร ปิดด้วย aluminum foil และปิดฝาขวด นำไปเขย่าเบาๆ ด้วยเครื่อง shaker นาน 30 นาที กรองสารละลายผ่าน anhydrous Na_2SO_4 เพื่อดูดความชื้น แล้วสกัดซ้ำด้วย methanol : water (8:2) 50 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาเติม 10 M NaOH 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นลดปริมาตรด้วย rotary evaporator นาน 35 นาที (ตั้งอุณหภูมิ water bath ที่ 60°C ไม่เปิด vacuum) เทตัวอย่างใส่ separatory funnel ขนาด 250 มิลลิลิตร ล้าง round bottom flask ที่ใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทรวมใน separatory funnel จากนั้นเติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งชั้นล่าง (ชั้นของ dichloromethane) ปรับ pH ให้ได้ ≤ 2 ด้วย 18 N H_2SO_4 เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน round bottom flask 125 มิลลิลิตร สกัดด้วย dichloromethane 25 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำไปลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร เติม 5 มิลลิลิตรของ methanol: conc.H_2SO_4 (9:1) ลงใน round bottom flask เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทตัวอย่างลงใน separatory funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม Hexane 10 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ทิ้งชั้นล่าง เติม $NaHCO_3$ 15 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ทิ้งชั้นล่าง กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน graduated tube 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatograph (GLC) ใช้หัวตรวจจับชนิด Electron capture detector (μECD)

ระยะเวลา

เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

สถานที่ทำการทดลอง

แปลงนาข้าวของเกษตรกรที่ ต.สนามชัย อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง 2,4-D บนแผ่นผ้าที่ติดอยู่ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายผู้ฉีดพ่น พบว่ามีการปนเปื้อนบนแผ่นผ้าที่ติดตามร่างกายในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 1) แต่จุดบนร่างกายที่ผู้ฉีดพ่นมีโอกาสสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษมากที่สุดระหว่างการฉีดพ่นคือ บริเวณหน้าแข้งและต้นขา พบเฉลี่ย 26.95 และ 21.58 ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร รองลงมาได้แก่ บ่า อก และ จมูก ปริมาณที่พบเฉลี่ย 16.44, 7.14 และ 5.02 ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร ส่วนข้อศอก และหลังมีโอกาสสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษลดลงมาตามลำดับ ปริมาณที่พบเฉลี่ย 2.21 และ 1.78 ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ บริเวณศีรษะจะมีโอกาสสัมผัสกับวัตถุมีพิษน้อยที่สุดคือ พบเฉลี่ย 1.35 ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร นอกจากนี้ยังตรวจน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นภายหลังการฉีดพ่นด้วย พบว่าตรวจพบในน้ำล้างเท้ามากกว่าที่พบในน้ำล้างมือ ปริมาณที่ตรวจพบคือ 488.10 และ 396.99 ไมโครกรัม ส่วนชุดที่ใช้สวมใส่ในระหว่างที่ทำการฉีดพ่น พบว่าชุดกางเกงของผู้ฉีดพ่นมีปริมาณ 2,4-D ตกค้างมากกว่าที่เสื้อ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความสูงของวัชพืชอยู่ที่ระดับต่ำกว่าเอวของผู้ที่ฉีดพ่น ดังนั้นบริเวณส่วนล่างของผู้ฉีดพ่นจึงมีโอกาสสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษมากกว่าส่วนบนของร่างกายผู้ฉีดพ่น และส่วนบนสุดของร่างกายคือที่ศีรษะ จึงตรวจพบปริมาณวัตถุมีพิษตกค้างอยู่น้อยที่สุด และเมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร ได้ค่า MOE เกินกว่า 100 (ค่า MOE = NOAEL/Risk exposure) ซึ่งมีความหมายว่าการใช้สารพิษ 2,4-D ฉีดพ่นกำจัดวัชพืชในแปลงข้าว เกษตรกรมีโอกาสที่จะสัมผัสกับวัตถุมีพิษที่ใช้บ้าง แต่ปริมาณที่ได้รับยังไม่เกินค่าความเสี่ยงภัยที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ฉีดพ่น

ตารางที่ 1. ปริมาณ 2,4-D บนแผ่นผ้าที่ติดตามจุดต่างๆ บนร่างกายผู้ฉีดพ่น (µg/100 cm^2)

บริเวณปนเปื้อน	ปริมาณ 2,4-D บนแผ่นผ้า (ไมโครกรัม/100 ตารางเซนติเมตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1. หน้าแข้ง	11.69	42.20	26.95
2. ต้นขา	3.97	39.18	21.58
3. บ่า	3.92	28.96	16.44
4. หน้าอก	5.26	9.02	7.14
5. จมูก	7.19	2.85	5.02
6. ข้อศอก	0.67	3.74	2.21
7. หลัง	2.89	0.67	1.78
8. ศีรษะ(หมวก)	2.02	0.68	1.35

สาเหตุที่ปริมาณการปนเปื้อนที่หน้าแข้งและต้นขาของผู้ฉีดพ่นพบมากกว่าที่บริเวณอื่นๆ อาจเนื่องจากว่าละอองวัตถุมีพิษที่ฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศ เมื่อถูกลมพัดจะลอยมาในระดับของยอดต้นวัชพืช ซึ่งก็อยู่ประมาณระดับหน้าแข้งของผู้ฉีดพ่น ดังนั้นโอกาสที่หน้าแข้งและต้นขาของผู้ฉีดพ่นจะสัมผัสกับละอองวัตถุมีพิษจึงมีมากไปด้วย และวัตถุมีพิษบางส่วนที่ฟุ้งกระจายอยู่ข้างบนก็มีโอกาสที่จะสัมผัสกับส่วนบนของร่างกายผู้ฉีดพ่นมากน้อยลดหลั่นลงมาตามลำดับ คือที่บ่า หน้าอก จมูก ข้อศอก ส่วนด้านหลังและส่วนหัว โอกาสที่จะสัมผัสกับวัตถุมีพิษก็น้อยตามไปด้วย ส่วนน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าภายหลังการฉีดพ่นพบปริมาณสารพิษ 2,4-D ในปริมาณเฉลี่ย 396.99 และ 488.10 ไมโครกรัม/ลิตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2. ปริมาณ 2,4-D ในน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าผู้ฉีดพ่น ภายหลังการฉีดพ่น (µg/L)

ครั้งที่ฉีดพ่น	น้ำล้างมือ	น้ำล้างเท้า
ครั้งที่ 1	474.68	431.29
ครั้งที่ 2	319.29	544.90
เฉลี่ย	**396.99**	**488.10**

สาเหตุที่น้ำล้างเท้าพบปริมาณสารพิษ 2,4-D มากกว่าน้ำล้างมือของผู้ฉีดพ่น เนื่องจากว่าต้นวัชพืชสูงอยู่ที่ระดับหน้าแข้ง เมื่อทำการฉีดพ่น ละอองวัตถุมีพิษจะฟุ้งกระจายไปทั่วบริเวณ และจะลอยฟุ้งอยู่มากตั้งแต่ระดับหน้าแข้งลงมา ดังนั้นโอกาสที่วัตถุมีพิษจะสัมผัสกับส่วนล่างของร่างกายจึงมีมากกว่าส่วนบน ส่วนชุดที่ใช้สวมใส่ในระหว่างที่ทำการฉีดพ่น พบว่ากางเกงของผู้ฉีดพ่นมีปริมาณ 2,4-D ตกค้างมากกว่าที่เสื้อของผู้ฉีดพ่นเช่นกัน

ซึ่งเมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร จะได้ค่า MOE เกินกว่า 100 (ตารางที่ 3) ซึ่งมีความหมายว่าการใช้สารพิษ 2,4-D ฉีดพ่นในแปลงนาข้าว เกษตรกรมีโอกาสที่จะสัมผัสกับวัตถุมีพิษ แต่ปริมาณที่ได้รับยังไม่เกินค่าความเสี่ยงภัยที่จะเกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ที่ปฏิบัติงานในแปลงนาข้าว

ตารางที่ 3. ปริมาณการได้รับ 2,4-D เข้าสู่ร่างกายของผู้ฉีดพ่น และระดับความเสี่ยงภัย

การฉีดพ่น ครั้งที่	2,4-D Dose abs. mg/kg.bw.	NOAEL mg/kg	MOE	**ระดับความเสี่ยง**
1	0.0172	5.0	290.70	ต่ำ
2	0.0189	5.0	264.55	ต่ำ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพื่อประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว พอสรุปได้ว่าการใช้สารพิษชนิดนี้ฉีดพ่นในแปลงนาข้าวมีความเสี่ยงภัยต่อผู้ฉีดพ่นน้อย กล่าวคือเกษตรกรผู้ที่ปฏิบัติงานในแปลงมีโอกาสที่จะสัมผัสกับละอองของวัตถุมีพิษที่ใช้ แต่ปริมาณที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายยังไม่เกินค่าความเสี่ยงภัยที่จะเกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ที่ปฏิบัติงานในแปลง แต่อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปฏิบัติงานในแปลงนาข้าวระหว่างที่ฉีดพ่นวัตถุมีพิษ ควรจะระมัดระวังหลีกเลี่ยงการสัมผัสหรือรับละอองวัตถุมีพิษในระหว่างที่ทำการฉีดพ่น ตลอดจนเสื้อผ้าที่สวมใส่ต้องปกปิดร่างกายให้มิดชิด และต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องป้องกันตัวอย่างเต็มที่ ทั้งนี้เพราะถึงแม้ว่าวัตถุมีพิษชนิดนี้จะมีความเสี่ยงภัยต่อผู้ฉีดพ่นต่ำ แต่ในการฉีดพ่นแต่ละครั้ง เกษตรกรนิยมใช้วัตถุมีพิษหลายชนิดรวมกันในคราวเดียวกัน ซึ่งเป็นผลให้เกษตรกรมีโอกาสรับสารพิษชนิดอื่นเพิ่มมากขึ้นอีกหลายเท่า และการที่เกษตรกรได้รับหรือสัมผัสกับสารพิษชนิดนี้บ่อยๆ ย่อมไม่สมควร เนื่องจากมีการศึกษาที่แสดงว่าสารพิษ 2,4-D อาจก่อให้เกิดความผิดปกติต่อตัวอ่อน ทำลายระบบต่อมไร้ท่อ การสร้างภูมิคุ้มกัน และระบบประสาท นอกจากนี้บางรายงานยังกล่าวว่าสารพิษ 2,4-D อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง (Richard A Brain *et al*., 2005.) จากการศึกษาพบว่า 2,4-D สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ และจะทำให้เกิดอาการทางประสาทตามมา ทำให้เกิดผื่นคัน ทำลายเนื้อเยื่อตับและไต และยังเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) มีรายงานการทดลองในสัตว์พบว่า สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้ทำให้เกิดมะเร็งและยังมีผลกระทบไปถึงลูกในรุ่นต่อไป ทำให้ทารกพิการแต่กำเนิด แม้ได้รับในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำ ดังนั้นเกษตรกรจึงควรที่จะใช้สารพิษชนิดนี้อย่างระมัดระวัง โดยใช้ให้น้อยครั้งที่สุดเท่าที่จำเป็น และเมื่อจำเป็นต้องใช้วัตถุมีพิษทุกครั้ง ควรจะมีการป้องกันการที่จะได้รับสารพิษเป็นอย่างดี หรืออาจใช้วิธีเกษตรผสมผสานร่วมกับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติหรือใช้สารชีวินทรีย์ร่วมด้วย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำข้อมูลที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงภัยมาใช้แนะนำเกษตรกร และเป็นข้อมูลสำหรับเกษตรกรในการใช้สารพิษ ให้เป็นไปอย่างระมัดระวังและถูกต้อง เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ตลอดจนสิ่งแวดล้อม

2. เป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตร ใช้พิจารณาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D เพื่อใช้ประกอบการขอขึ้นทะเบียน หรือการห้ามใช้

3. เผยแพร่ข้อมูลที่ได้สู่สาธารณชน และหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนผู้ที่สนใจทั่วไป

4. เพื่อการบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษทางการเกษตรที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงภัยสูง ตามภารกิจของกรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2551. การป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืชปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กองจัดการสารอันตรายจากกากของเสีย, 2536. ค่ามาตรฐานความปลอดภัยของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ในสิ่งแวดล้อม ฝ่ายสารอันตรายจากเกษตรกรรม กรมควบคุมมลพิษ, 31 หน้า

ปรีชา ฉัตรสันติประภา และณัณฐ์ชยธร ขัตติยะพุฒิเมธ, 2552. ปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่นวัตถุมีพิษในแหล่งปลูกพริก: cypermethrin ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2552. เล่มที่ 1 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

In-house method. 2004. Determination residues of 2,4-D in soil and water. Agricultural Richard Production Science Research and Development Office, Department of Agriculture.

A Brain, Angus N Crossan, Lesbia Smith and Keith R Solomon. 2005. The Toxicology of Substances Used in the Production and Refining of Cocaine and Heroin: A Tier-Two Hazard Assessment. (Appendices 6) CICAD OAS Washington, DC, USA. 481 p. U. koesukwiwat,

K. Sanguankaew, and N. Leepipatpiboon. 2008. Rapid Determination of Phenoxy Acid Residues in Rice by Modified QuEChERS Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Anal Chem Acta, 626, 921-924.

Wauchope R.D., Buttler T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Beckers P.W., Burt J.P. 1992. Pesticides properties database for environmental decision making, *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 123:1-157.

W. Keller and S. Otto. 1985. BASF, Agricultural Research Station, Limburgerhof, Germany

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. ปริมาณสาร 2,4-D ปนเปื้อนบนแผ่นผ้าที่จุดต่างๆ ตามร่างกายผู้ฉีดพ่น (µg /100 cm^2)

บริเวณปนเปื้อน	ฉีดพ่นครั้งที่ 1	ฉีดพ่นครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
หมวก(ศีรษะ)	2.02	0.68	1.35
จมูก	7.19	2.85	5.02
บ่า	3.92	28.96	16.44
อก (ใน)	0.06	0.08	0.07
อก (นอก)	5.26	9.02	7.14
ข้อศอก	0.67	3.74	2.21
หลัง (ใน)	0.50	0.60	0.55
หลัง (นอก)	2.89	0.67	1.78
ต้นขา	3.97	39.18	21.58
หน้าแข้ง(นอก)	11.69	42.20	26.95
หน้าแข้ง(ใน)	1.22	0.34	0.78
น้ำล้างมือ (µg)	478.68	319.29	396.99
น้ำล้างเท้า (µg)	431.29	544.90	488.10

ตารางที่ 2. แสดงการคำนวณการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายของผู้ฉีดพ่น และค่าทางพิษวิทยา

Test No.	Total Expo.(µg)	Test(hr.) period	Work/ Day(hr)	Adj. time	Potential Dose(µg)	% Abs.	Abs. dose(µg)	BW. kg	Dose abs. mg/kg.bw	NOAEL mg/kg	MOE	Risk
1	1033.40	0.5	1	2	2066.80	50	1033.40	60	0.0172	5.0	290.70	Unlikely
2	1134.84	0.5	1	2	2269.68	50	1134.84	60	0.0189	5.0	264.55	Unlikely

ศึกษาการสลายตัวและการสะสมของสารกำจัดวัชพืชในผลผลิตของข้าว: ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน

Accumulation of Pesticide Residue in Rice and It's Product in Rice Field: 2,4-D in Paddy Irrigation Area

ปรีชา ฉัตรสันติประภา สิริพร เหลืองสุชนกุล เอกราช สิทธิมงคล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงการสะสมของสารพิษการเกษตรชนิด 2,4-D ในข้าว และผลิตผลของข้าว โดยทำการทดลองในแปลงนาข้าวของเกษตรกรที่ ต.สนามชัย อ.เมืองสุพรรณบุรี จ.สุพรรณบุรี ทำการฉีดพ่นสารพิษ 2,4-D สูตร 84% W/V SL จำนวน 2 ครั้ง ตามอัตราฉีดพ่นที่แนะนำ คือ ครั้งที่ 1 ฉีดพ่นก่อนหว่านเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยใช้ความเข้มข้น 45 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ครั้งที่ 2 ฉีดพ่นหลังจากต้นข้าวงอกประมาณ 2 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้น 16 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร โดยวางแผนการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวเปลือก และฟางข้าว เมื่อต้นข้าวมีอายุครบสำหรับการเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลา 100 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดข้าวและฟางข้าว ซึ่งตัวอย่างข้าวเปลือกทั้งหมด จะถูกนำมาสี เพื่อให้ได้รำข้าว ข้าว และแกลบ ต่อจากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดหาปริมาณ 2,4-D และตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษที่ตกค้างในตัวอย่างรำข้าว ข้าว แกลบ และฟางข้าว ที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยว ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D จากตัวอย่างข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าวและฟางข้าว ได้ผลดังนี้

ตัวอย่างรำข้าว และข้าวที่ได้สุ่มเก็บมาจำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง ถูกนำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หา 2,4-D ซึ่งจากการทดสอบวิธีวิเคราะห์พบว่าวิธีสกัดของ Modified QuEChERS (2008) ได้ผลทางประสิทธิภาพด้าน recovery ดีที่สุด ผลของการทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธีนี้พบว่าในรำข้าว ได้ผล recovery อยู่ระหว่าง 80-104% และในข้าวได้ผลอยู่ระหว่าง 75-103% นับได้ว่าวิธีการนี้เชื่อถือและใช้ได้ ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D จากตัวอย่างรำข้าว และข้าว ปรากฏว่าตรวจไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของ 2,4-D เหลืออยู่เลย ส่วนตัวอย่าง แกลบ และฟางข้าว ตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกสกัดด้วยวิธีที่ปรับปรุงมาจาก BASF, Agricultural Research Station (1985) ซึ่งเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบเป็นเส้นใย ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ ในแกลบ ได้ผล recovery อยู่ระหว่าง 83-97% และในฟางข้าวได้ผลอยู่ระหว่าง 87-109% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน และผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแกลบและฟางข้าวปรากฏว่าตรวจไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของ 2,4-D เหลืออยู่เช่นกัน พอสรุปได้ว่าการใช้วัตถุมีพิษ 2,4-D ฉีดพ่นกำจัดวัชพืชในนาข้าวในเขตชลประทานไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในเมล็ดข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าว เมื่อถึงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวมาบริโภค

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้วัตถุมีพิษการเกษตรหลายชนิดในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงนาข้าว รวมทั้ง 2,4-D ซึ่งจัดอยู่ในสารกลุ่ม chlorinated phenoxy compound ที่ต้องมีการระมัดระวังและเข้มงวดในการใช้ (Restricted Use Pesticides, RUP) และผู้ใช้ต้องผ่านการอบรมและรับรองมาแล้วเท่านั้น (US.EPA., 1988) สารพิษชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเป็นพิษในระดับปานกลาง (Moderately toxic, class II) ซึ่งที่ป้ายฉลากของวัตถุมีพิษจะใช้สัญลักษณ์คำว่า WARNING ซึ่งทางกลุ่ม EU (European Commission) จัดสารชนิดนี้ให้อยู่ในกลุ่ม Annex I (EXTONET, 1996) จากการศึกษาพบว่า 2,4-D สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ และจะทำให้เกิดอาการทางประสาทตามมา ทำให้เกิดผื่นคัน ทำลายเนื้อเยื่อตับและไต และยังเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) มีรายงานการทดลองในสัตว์พบว่า สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้ทำให้เกิดมะเร็งและยังมีผลกระทบไปถึงลูกในรุ่นต่อไป ทำให้ทารกพิการแต่กำเนิด แม้ได้รับในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำ ดังนั้นการฉีดพ่น 2,4-D ในแปลงนาข้าว นอกจากที่ละอองของสารพิษจะตกลงบนพืชที่เป็นเป้าหมายแล้ว สารพิษบางส่วนจะฟุ้งกระจายไปในอากาศ ตกลงบนพื้นดิน ในแหล่งน้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมาย ทำให้เกิดการสะสมของสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อมและมีผลกระทบไปถึงระบบนิเวศน์ ซึ่งผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้ในแปลงนาข้าว ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความเสี่ยงภัยต่อสิ่งแวดล้อมมาก่อน ดังนั้นเพื่อที่จะประเมินความเสี่ยงภัยของการใช้ 2,4-D ในแปลงนาข้าว จึงต้องทำการศึกษาการสะสมของสารพิษชนิดนี้ ที่ตกค้างในเมล็ดข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าว ว่ามีปริมาณเท่าใดภายหลังการฉีดพ่น และใช้เวลาในการสลายตัวนานเพียงใด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตรใช้ประกอบการประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D ในแหล่งปลูกข้าว และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการขออนุญาตขึ้นทะเบียนการนำเข้าและจำหน่าย สำหรับวัตถุมีพิษชนิดนี้ ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมอื่นๆ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนนักวิจัย นักวิชาการ และประชาชนทั่วไปที่สนใจเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ขวดและอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และตะกอน
2. ขวด Erlenmeyer flask สำหรับสกัดตัวอย่างดิน
3. วัสดุเครื่องแก้วและเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ
4. เครื่องชั่งหยาบและเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)
5. เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด separatory funnel shaker
6. เครื่องเขย่าดิน (reciprocal shaker)
7. เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator
8. เครื่องลดปริมาตร ชนิด nitrogen evaporator

9. เครื่องมือวิทยาศาสตร์และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ ตู้อบสารเคมี (digital oven เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) เครื่องทำสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องผสม สารละลาย (vortex mixer) และตู้ดูดความชื้น (desiccator)

10. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) พร้อมหัวตรวจจับชนิด Electron Capture Detector (μECD)

11. สารมาตรฐานชนิดป้องกันกำจัดแมลง (insecticide standards) 2,4-D ความบริสุทธิ์สูง

12. ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดแมลงที่ใช้ในแปลงข้าว สารกลุ่ม chlorinated phenoxy compound 2,4-D สูตร 84% W/V SL ใช้อัตรา 45 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการ

เลือกแปลงทดลองของเกษตรกรที่ทำนาข้าวในบริเวณพื้นที่เขตชลประทาน และมีการใช้สารพิษ 2,4-D ในระหว่างการดูแลรักษา ได้แปลงข้าวที่มีความเหมาะสมสำหรับการทดลองที่ ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี เนื้อที่ขนาด 3 ไร่ 3 งาน ทำเป็นคันนาสำหรับปลูกข้าว พื้นที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีบ่อน้ำข้างคันนา กว้าง 5 เมตร ยาว 15 เมตร และลึกประมาณ 1 เมตร โดยจะทำการไถทำเทือกก่อน และหมักดินไว้ 2-3 วัน ทำการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช 2,4-D สองครั้ง ตามอัตราฉีดพ่นที่แนะนำ คือ ครั้งที่ 1 ฉีดพ่นก่อนหว่านเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยใช้ความเข้มข้น 45 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ครั้งที่ 2 ฉีดพ่นหลังจากข้าวงอก 2 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้น 16 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้เวลาฉีดพ่น 25 และ 30 นาที (ในช่วงที่ดูแลรักษาเกษตรกรมีการฉีดพ่นสารพิษชนิดอื่นๆอีก เพื่อกำจัดศัตรูพืชเป็นระยะๆ แต่ไม่ได้ใช้สาร 2,4-D อีก) ก่อนการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะต้องวัดคุณภาพน้ำทุกครั้ง เมื่อต้นข้าวมีอายุครบการเก็บเกี่ยวที่ 100 วัน ทำการเก็บตัวอย่างข้าวเปลือก และฟางข้าว จากนั้นนำข้าวเปลือกมาสี จะได้ข้าวสาร รำข้าว และแกลบ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวสาร รำข้าว แกลบ และฟางข้าว จำนวนชนิดละ 10 ซ้ำ คิดเป็นจำนวนตัวอย่างได้ทั้งหมดคือ ข้าวสาร รำข้าว แกลบ และฟางข้าว 4 ชนิด ทำ 10 ซ้ำ รวม 40 ตัวอย่าง ทำการตรวจหาปริมาณสารพิษตกค้าง เพื่อเป็นการตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษในข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าว ว่ามีปนเปื้อนอยู่ในปริมาณเท่าใด เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาประกอบการพิจารณาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D ในแหล่งปลูกข้าว

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าว: ถ้าเป็นเมล็ดข้าวสาร นำมาบดให้ละเอียดก่อนนำไปชั่ง ส่วนรำข้าวสามารถนำไปชั่งได้เลย และสกัดด้วยวิธีการสกัดของ QuEChERS (2008) สำหรับแกลบก็ต้องนำมาบดให้ละเอียดก่อนเช่นกัน ส่วนฟางข้าวนำมาหั่นและสับให้เป็นชิ้นเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ จากนั้นก็นำไปชั่ง และสกัดด้วยวิธี ที่ปรับปรุงมาจาก BASF, Agricultural Research Station (1985)

การตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าว

ใช้วิธีการของ Modified QuEChERS, และวิธีที่ปรับปรุงมาจาก BASF, Agricultural Research Station (1985)

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวและรำข้าว : ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร และ 5% (v/v) formic acid in acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1 นาที เติม $MgSO_4$ 4.0 กรัม และ NaCl 1 กรัม นำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่เติม PSA 0.25 กรัม และ $MgSO_4$ 1.5 กรัม เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1 นาที centrifuge ที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน graduate tube และนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใส 2 มิลลิลิตร ลงใน graduate tube ใหม่ ชั่ง anhydrous $NaSO_4$ 2 กรัม ใส่ column ของ SPE Florisil 1 กรัม และต่อกับ SPE C_{18} ด้านบน ปรับสภาวะของ SPE ด้วย acetonitrile 6 มิลลิลิตร ใส่สารละลายตัวอย่าง และล้าง tube ด้วย acetonitrile 15 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาลดปริมาตรด้วยไนโตรเจน ให้เหลือ 1 มิลลิลิตร เติม methanol:conc.H_2SO_4 (9:1) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทตัวอย่างลงใน separatory funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร ล้าง graduate tube ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เติม hexane 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ไขน้ำชั้นล่างทิ้งไป เติม $NaHCO_3$ 15 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน graduate tube 15 มิลลิลิตร เพื่อดูดความชื้น จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาลดปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatograph (GLC) ใช้หัวตรวจจับชนิด Electron capture detector (μECD)

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแกลบและฟางข้าว : ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 20 กรัม ใส่ในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol : water (8:2) 200 มิลลิลิตร ปิดด้วย aluminum foil และปิดฝาขวด นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer นาน 3 นาที กรองด้วย suction filter และล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย methanol : water (8:2) 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ถ่ายตัวอย่างใส่ round bottle flask 500 มิลลิลิตร เติม 10 โมล NaOH 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปลดปริมาตรด้วย rotary evaporator นาน 35 นาที เทตัวอย่างใส่ separatory funnel 250 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทรวมใน separatory funnel เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ทิ้งชั้นล่างของ dichloromethane ไป เติม 3 M H_2SO_4 25 มิลลิลิตร วัด pH <3 เติม dichloromethane 25 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ กรองสารละลายผ่าน anhydrous Na_2SO_4 เพื่อดูดความชื้น ลงใน round bottle flask 125 มิลลิลิตร สกัดด้วย dichloromethane 25 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง กรองสารละลายผ่าน anhydrous Na_2SO_4 เก็บใน round bottle flask 125 มิลลิลิตร ใบเดิม ล้าง separatory funnel ที่ใส่ตัวอย่างด้วย dichloromethane 10 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วย rotary evaporator ให้เกือบแห้ง เติม 5 มิลลิลิตร ของ methanol:conc.H_2SO_4 (9:1) ลงใน round bottle flask เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทตัวอย่างลงใน separatory funnel 125 มิลลิลิตร อันใหม่ ล้าง round bottle flask ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เติม hexane 10 มิลลิลิตร เขย่า ตั้งทิ้งไว้นาน 3 นาที ทิ้งน้ำชั้นล่างไป เติม $NaHCO_3$ 15 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทิ้งชั้นล่างของ $NaHCO_3$ ไป กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ลงใน graduate tube 15 มิลลิลิตร นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาลดปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatograph (GLC) ใช้หัวตรวจจับชนิด Electron capture detector (μECD)

ระยะเวลา

เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ

แปลงนาข้าวของเกษตรกรที่ ต.สนามชัย อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองเก็บตัวอย่างข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าว เช่นรำข้าว แกลบ และฟางข้าว มาสกัดหาปริมาณ 2,4-D โดยทำการสกัด และตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 2,4-D ที่ตกค้างในตัวอย่าง เมื่อครบระยะเวลาเก็บเกี่ยว ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D จากตัวอย่างข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าวและฟางข้าว ได้ผลดังนี้

ตัวอย่างรำข้าว และข้าวที่ได้สุ่มเก็บมาจำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง ถูกนำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หา 2,4-D ด้วยวิธีของ Modified QuEChERS (2008) ซึ่งทดสอบแล้วพบว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุด ผลของการทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธีนี้พบว่าในรำข้าว ได้ผล recovery อยู่ระหว่าง 80-104 % และในข้าวได้ผลอยู่ระหว่าง 75-103% นับได้ว่าวิธีการนี้เชื่อถือและใช้ได้ อย่างไรก็ตามผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D จากตัวอย่างรำข้าว และข้าวสาร ปรากฏว่าตรวจไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของ 2,4-D เหลืออยู่เลย ส่วนตัวอย่าง แกลบ และฟางข้าว ได้ผลดีที่สุดจากการสกัดด้วยวิธีที่ปรับปรุงมาจาก BASF, Agricultural Research Station (1985) ซึ่งเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบเป็นเส้นใย โดยผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ ในแกลบ ได้ผล recovery อยู่ระหว่าง 83-97% และในฟางข้าวได้ผลอยู่ระหว่าง 87-109% ซึ่งนับได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างแกลบและฟางข้าวปรากฏว่าตรวจไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของ 2,4-D เหลืออยู่เช่นกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้วัตถุมีพิษ 2,4-D ฉีดพ่นกำจัดวัชพืชในนาข้าวในเขตชลประทาน ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในเมล็ดข้าวและผลิตภัณฑ์ของข้าว เมื่อถึงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวมาบริโภค

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองการใช้สาร 2,4-D กำจัดวัชพืชในแปลงนาข้าวในเขตชลประทาน เพื่อศึกษาการสลายตัวและการสะสมของสารกำจัดวัชพืชชนิดนี้ในข้าวและผลิตผลของข้าว ทำให้สรุปได้ว่าที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยว ภายหลังจากการใช้วัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษตกค้างในผลผลิตเมื่อถึงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวมาบริโภค ปรากฏว่าตรวจไม่พบสารพิษตกค้างในเมล็ดข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าว รวมถึงฟางข้าวด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าระยะเวลาที่ใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดนี้ครั้งสุดท้าย จนถึงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวผลผลิต ห่างกันประมาณ 3 เดือน ซึ่งระยะเวลานานขนาดนี้ สารกำจัดวัชพืชที่ใช้น่าจะสลายตัวไปหมดแล้ว อีกทั้งในระยะเวลาที่ใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดนี้ต้นข้าวยังไม่ทันจะออกรวง ดังนั้นจึงไม่น่าจะมีสารพิษชนิดนี้ตกค้างอยู่ในเมล็ดข้าวได้

ดังนั้นพอจะประเมินได้ว่าการใช้ 2,4-D ฉีดพ่นกำจัดวัชพืชในแปลงนาข้าวตามอัตราที่ฉลากแนะนำ ไม่ก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษชนิดนี้ในเมล็ดข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าวแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามการใช้วัตถุมีพิษทุกชนิดควรจะใช้ให้น้อยครั้งที่สุด และใช้เมื่อมีความจำเป็นจริงๆ เท่านั้น หรืออาจใช้วิธีเขตกรรม ร่วมกับการจัดการเกษตรที่ดีและเหมาะสม (Good Agricultural Practices, GAP) ก็ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เป็นข้อมูลสำหรับเกษตรกรเพื่อให้การใช้สารพิษเป็นไปอย่างระมัดระวังและถูกต้อง เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ตลอดจนสิ่งแวดล้อม

2. เป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตร ใช้พิจารณาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D เพื่อใช้ประกอบการขอขึ้นทะเบียน หรือการห้ามใช้

3. เผยแพร่ข้อมูลที่ได้สู่สาธารณชน และหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนผู้ที่สนใจทั่วไป

4. เพื่อการบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษทางการเกษตรที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงภัยสูง ตามภารกิจของกรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2551. การป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืชปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กองจัดการสารอันตรายจากกากของเสีย, 2536. ค่ามาตรฐานความปลอดภัยของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ในสิ่งแวดล้อม ฝ่ายสารอันตรายจากเกษตรกรรม กรมควบคุมมลพิษ, 31 หน้า

ปรีชา ฉัตรสันติประภา ภิญญา จุลินทร และ พงศ์ศรี ใบอดุลย์, 2550. ศึกษาเทคโนโลยีการใช้วัสดุธรรมชาติในการดูดซับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและไพรีทรอยด์ในนาข้าว ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2550. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Douglas Hartley and Hamish Kidd, 1991. The Agrochemical Handbook. Third Edition 1991, The Royal Society Chemistry. Cambridge, England.

EXTONET. 1966. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. http://ace.orst.edu/info/extonet/pips/cypermet.htm

koesukwiwat U., Sanguankaew K., and Leepipatpiboon N. 2008. Rapid Determination of Phenoxy Acid Residues in Rice by Modified QuEChERS Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Anal Chem Acta, 626, 921-924.

USEPA., 1988. Pesticide Fact Sheet. Washington, DC, USA: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances.

Wauchope R.D., Buttler TM, Hornsby A.G., Augustijn-Beckers P.W., Burt JP. 1992. Pesticides properties database for environmental decision making, *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 123:1-157.

Keller W. and Otto S. 1985. BASF, Agricultural Research Station, Limburgerhof, Germany

ศึกษาการสลายตัวและสะสมของสารกำจัดวัชพืช กลุ่ม chlorinated phenoxy compound ในดิน น้ำ และตะกอนในแหล่งปลูกข้าวและพืชไร่ : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน

Risk Assessment of 2,4-D Used in Paddy Field

ภิญญา จุลินทร วรวิทย์ สุจิรธรรม สิริพร เหลืองสุชนกุล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว ทำการศึกษาที่ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี ในฤดูปลูกตั้งแต่เดือนธันวาคม 2553 – เมษายน 2554 ฉีดพ่น 2,4-D สูตร 82.1% SL อัตราสูงสุดตามคำแนะนำบนฉลาก เพื่อเป็นการศึกษาหาข้อมูลในกรณีที่มีการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้อย่างเต็มที่ (worst case scenario) หลังการฉีดพ่นสารพิษ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 2,4-D ใน ดิน น้ำ และตะกอน นำผลที่ได้จากการศึกษามาประมวลกับข้อมูลทางพิษวิทยาของ 2,4-D เพื่อประเมินผลกระทบจากการฉีดพ่น 2,4-D ต่อสภาพแวดล้อม ผลการศึกษาพบว่าหลังการฉีดพ่น 2,4-D ในนาข้าว ตรวจพบสารพิษในน้ำ ดิน และตะกอน ตั้งแต่วันที่ฉีดพ่นถึง 45 วัน หลังการฉีดพ่น พบสารพิษในน้ำในวันที่ฉีดพ่น 34.57 µg/l ปริมาณสารพิษลดลงอย่างรวดเร็วและมีปริมาณเหลือ 0.03 µg/l ในวันที่ 45 ส่วนสารพิษในดินและในตะกอนตรวจพบในปริมาณค่อนข้างต่ำ

คำนำ

กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบในการพิจารณาการห้ามใช้และจำกัดการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรหรือสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่างๆ เป็นการปฏิบัติงานเพื่อลดความเสี่ยงจากการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ต่อผู้ใช้และผู้บริโภค และแก้ไขปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากมาตรการพิจารณาการห้ามใช้และจำกัดการใช้แล้ว ยังได้กำหนดโครงการเฝ้าระวังติดตามการใช้และผลกระทบของสารพิษที่มีพิษร้ายแรงที่อาจมีการห้ามใช้ในอนาคต เช่น methomyl, carbofuran, dicrotophos, EPN ฯลฯ หรือสารพิษที่พบพิษตกค้างในผลิตผลเกษตรกรรมในปริมาณสูง และอาจมีปัญหาต่อการส่งผลผลิตไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น chlorpyrifos และ cypermethrin รวมถึงสารกำจัดวัชพืชบางชนิดที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในแหล่งปลูกพืชไร่ และนาข้าว เช่น 2,4-D เพื่อประเมินความเสี่ยงภัยที่เกิดจากการใช้สารพิษเหล่านี้ด้วย

2,4-D เป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืชกลุ่ม chlorinated phenoxy compound 2,4-D ในรูป acid มีความเป็นพิษในระดับพิษน้อยถึงพิษปานกลาง (slight to moderately toxicity) ความเป็นพิษโดยการกิน (oral LD_{50}) ต่อหนู (rat) 375 – 666 mg/kg หนู (mice) 370 mg/kg และหนูตะเภา (guinea pig) < 320 – 1000 mg/kg. การศึกษาด้าน

รหัสการทดลอง 05-01-53-01-01-01-02-53

พิษวิทยาในต่างประเทศรายงานว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ทดลองเมื่อใช้ในระดับสูง และทำให้เกิดเนื้องอกและมะเร็งในหนูทดลองได้ มีความเป็นพิษต่อนกในระดับค่อนข้างต่ำถึงปานกลาง ความเป็นพิษต่อปลาของ 2,4-D ขึ้นอยู่กับสูตร (formulation) บางสูตรผสมมีความเป็นพิษสูงมากค่า LD_{50} มีช่วงตั้งแต่ 10-100 mg/l และมีรายงานว่าเป็นพิษต่อผึ้ง (http:ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/2,4-D.htm)

2,4-D เป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้มาก 2,4-D ผลิตเป็นเกลือได้หลายชนิด มีสูตรผสมเป็นทั้งสูตร SL, SP, EC และ WG ใช้ป้องกันกำจัดวัชพืชใบกว้างหลายชนิด เช่น ตาลปัตรฤาษี เทียนนา ผักปราบ ผักบุ้ง ผักเบี้ยหิน ผักโขม หญ้ายาง ประเภทกก เช่น กกขนาก แห้วหมู จากสถิติการนำเข้าวัตถุอันตราย ระบุว่า ในปี พ.ศ. 2554 วัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกนั้น มีการนำเข้า 2,4-D ในรูป 2,4-D dimethyl ammonium เป็นอันดับที่สาม และนำเข้าในรูป 2,4-D sodium salt เป็นอันดับที่ 5 ของประเทศ คิดเป็นปริมาณ 4,852.16 และ 3,818.83 ตันตามลำดับ หรือคิดเป็นมูลค่า 359.14 และ 353.14 ล้านบาทตามลำดับเช่นเดียวกัน 2,4-D มีวิธีการใช้โดยการฉีดพ่น ดังนั้นโอกาสที่สารพิษจะฟุ้งกระจายในอากาศขณะฉีดพ่น และเกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อม เมื่อตกลงบนดินหรือในแหล่งน้ำย่อมเกิดขึ้นได้สูง กลายเป็นมลพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในดินและในน้ำของบริเวณเกษตรกรรมนั้น

กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร จึงได้จัดทำชุดโครงการวิจัยเพื่อศึกษาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร สำหรับงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาผลกระทบของ 2,4-D ต่อสภาพแวดล้อมในนาข้าว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องใช้ในการประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D ต่อสภาพแวดล้อมในนาข้าว และเป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตรในการพิจารณาบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษที่มีอันตรายร้ายแรง เช่น การเข้มงวดการใช้ การจำกัดการใช้ หรือการห้ามใช้ เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง

1.1 ผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง 2,4-D ที่ใช้ฉีดพ่นในแปลงทดลอง ชื่อการค้า “เนลพอน” สูตร 82.1% SL

1.2 ชุดตรวจวัดปริมาณออกซิเจนในน้ำ (dissolved oxygen, DO)

1.3 ชุดตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดินและน้ำ (pH meter)

1.4 เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิน้ำ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette, separatory funnel, cylinder, beaker, Erlenmeyer flask, round bottom flask, chromatographic column, filtering funnel, test tube ฯลฯ

2.2 เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารเคมี analytical grade (AR) และ pesticide grade (PR) ได้แก่ acetone, hexane, petroleum ether, ethyl acetate, ichloromethane, sulfuric acid, sodium sulphate (granule 12-16 mesh), aluminium oxide 90 active neutral (70-230 mesh), silica gel (20-120 mesh) etc.

2.3 glass wool และ filter paper No.1 & 42

2.4 สารพิษมาตรฐาน 2,4-D ความบริสุทธิ์สูง

3. **เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ**

3.1 เครื่องชั่งหยาบ และเครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance)

3.2 เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด Homogenizer และ Blender

3.3 เครื่องลดปริมาตรชนิด Rotary Evaporator

3.4 เครื่องลดปริมาตรชนิด Nitrogen Evaporator

3.5 ตู้อบสารเคมี (Digital Oven)

3.6 เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace)

3.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

3.8 ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

3.9 ตู้เย็นแช่แข็ง (Deep Freezer) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ -20 °C

3.10 เครื่อง Gas Chromatograph (GC) พร้อมตัวตรวจจับชนิด Electron Capture Detector (ECD)

การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

1. ติดต่อได้แปลงข้าวที่เหมาะสม ที่ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี มีเนื้อที่ทำการทดลอง 5 ไร่ จากพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดมากกว่า 100 ไร่ มีคลองยาวขนาบด้านหนึ่งของแปลงนา เพื่อใช้เลี้ยงปลาธรรมชาติ คลองนี้รับน้ำจากคลองชลประทานซึ่งได้รับน้ำจากแม่น้ำท่าจีน น้ำมีลักษณะใส และมีค่าดัชนีคุณภาพน้ำเหมาะสมแก่การเลี้ยงปลา

2. ในฤดูปลูกตั้งแต่เริ่มหว่านข้าวจนถึงเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 120 วัน ฉีดพ่น 2,4-D ตามวิธีปฏิบัติของเกษตรกร เพื่อป้องกันกำจัดวัชพืช 2 ครั้ง ครั้งแรกก่อนหว่านข้าวเมื่อวันที่ 10 ธ.ค. 2553 เพื่อเป็นการฉีดคุมวัชพืช ครั้งที่ 2 ฉีดพ่น 2,4-D เมื่อวันที่ 30 ธ.ค. 2553 หลังหว่านข้าวแล้ว เพื่อฆ่าวัชพืชที่อาจเกิดขึ้นใหม่ เกษตรกรฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น เช่น pretilachlor, pyribenzoxim, butachlor + propanil การฉีดพ่นสารพิษใช้เครื่องยนต์สะพายหลัง

3. สารพิษ 2,4-D ที่ใช้ในการทดลอง เป็น 2,4-D dimethylammonium สูตรและความเข้มข้น 82.1 % w/v SL ชื่อการค้า “เนลพอน” ของบริษัท Dow Agrosciences อัตราตามคำแนะนำบนฉลาก ให้ใช้กำจัดวัชพืชใบกว้าง กกในนาข้าว และในไร่ข้าวโพด ให้พ่นหลังจากวัชพืชงอก และมีใบแล้ว 2-4 ใบ อัตราฉีดพ่น 155-205 ซีซี ต่อน้ำ 60-80 ลิตรต่อไร่ หรือ 40-52 ซีซีต่อน้ำ 25-50 ลิตรต่องาน ซึ่งจากการศึกษานี้เลือกใช้อัตรา 100 ซีซีต่อน้ำ 25 ลิตร เป็นการศึกษาหาข้อมูลในกรณีที่มีการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้อย่างเต็มที่ (worst case scenario)

4. ก่อนเริ่มการฉีดพ่นสารพิษ เก็บดิน น้ำ และตะกอน ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในร่องน้ำไปวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D ซึ่งอาจมีตกค้างอยู่เดิมในสภาพแวดล้อม เพื่อเป็นการตรวจวัดปริมาณสารพิษก่อนเริ่มการทดลอง เป็นค่าตั้งต้นก่อนที่จะมีการใช้สารพิษในแปลง (Reference value)

5. ได้เก็บตัวอย่างดิน น้ำ ตะกอน ในนาข้าว ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D เพื่อหาอัตราการสลายตัวของ 2,4-D ในตัวอย่างต่างๆ เป็นระยะดังนี้

1) ภายหลังฉีดพ่น 0 วัน (3 ชั่วโมงภายหลังฉีดพ่น)

2) ภายหลังฉีดพ่น 15 วัน

3) ภายหลังฉีดพ่น 30 วัน

4) ภายหลังฉีดพ่น 45 วัน

5) ภายหลังฉีดพ่น 90 วัน

บันทึกข้อมูลสภาพภูมิอากาศ และข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่นความชื้นดิน อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนในน้ำทุกวันที่มีการเก็บตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์ 2,4-D ในน้ำ ดิน และตะกอน

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

ตัวอย่างดิน/ตะกอน ตากดิน และตะกอนในถาดสแตนเลสที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งดิน/ตะกอนมีความชื้นประมาณ 20-30% แล้วบดย่อยให้กระจายเป็นก้อนเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ เทใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทกันความชื้น ถ้ายังไม่วิเคราะห์ในทันที ต้องเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อจะนำมาตรวจวิเคราะห์ ต้องตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ รอจนถึงอุณหภูมิห้อง จึงจะชั่งน้ำหนักดิน/ตะกอน และต้องชั่งใส่ petridish อีก 20 กรัม เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเวลาเดียวกัน

ตัวอย่างน้ำ โดยทั่วไปถ้าน้ำมีลักษณะใส สามารถนำมาสกัดได้ทันที แต่ถ้ามีความขุ่นหรือสกปรกมากให้กรองด้วย Glass wool จนได้สารละลายใส

ตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยใช้วิธีของ Thier, H.P. and J. Kirchhoff, 1996. 2,4-D, Dichlorprop (2,4-DP). In Manual of Pesticide Residue Analysis, Volume II. Working group analysis, Pesticide Commission, VCH, Germany. (Modified by Agricultural Production Science Research & Development Office: In-house method). ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง GC/ECD

ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2,4-D ในดิน น้ำ และตะกอน โดยวิธี Gas chromatography ทดสอบประสิทธิภาพ ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีตรวจวิเคราะห์โดยการหา % recovery, Limit of Quantification (LOQ) ได้ค่า % recovery ในน้ำที่ระดับความเข้มข้น 0.04 – 0.40 µg/L เฉลี่ย 75% และ % recovery ในดิน ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 – 0.40 mg/kg เฉลี่ย 90% ค่าปริมาณสารพิษต่ำที่สุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantification, LOQ) 0.05 µg/L และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ

ระยะเวลา

เริ่มการทดลอง ตุลาคม 2553 สิ้นสุดการทดลอง กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ

นาข้าวของเกษตรกร ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ภายหลังการฉีดพ่นสารพิษ 2,4-D ครั้งที่ 1 ได้ตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ และตะกอน ในวันที่ฉีดพ่น และหลังการฉีดพ่นสารพิษครั้งที่ 2 ได้ตรวจวิเคราะห์สารพิษในดิน น้ำ และตะกอน ตั้งแต่วันที่ฉีดพ่นจนถึง 90 วันหลังฉีดพ่น สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ได้ดังนี้ :

ปริมาณสารพิษในดิน

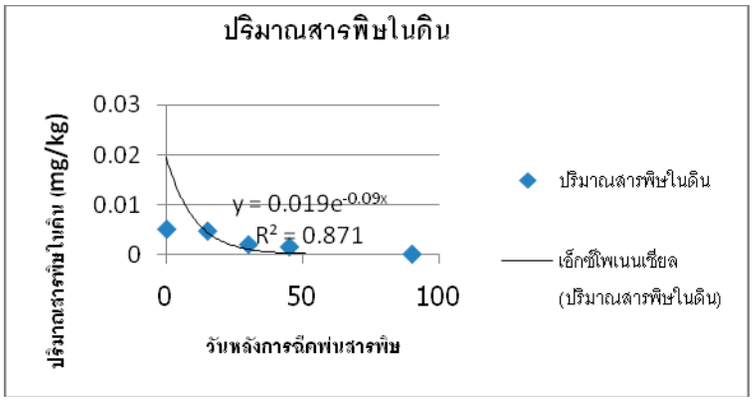
หลังการฉีดพ่น 2,4-D ในนาข้าว ตรวจพบสารพิษในดินในวันที่ฉีดพ่นในปริมาณค่อนข้างต่ำ และปริมาณสารพิษค่อยๆ ลดลงตามลำดับ จนถึงวันที่ 45 หลังการฉีดพ่น และหลังจากนั้นตรวจไม่พบสารพิษในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 1. ปริมาณสารพิษ 2,4-D ในดินในช่วงเวลาต่างๆ

วันหลังการฉีดพ่น	ปริมาณ 2,4-D เฉลี่ย (mg/kg) หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 1 (N = 10)	ปริมาณ 2,4-D เฉลี่ย (mg/kg) หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 2 (N = 10)
0	0.0182	0.0051
15	-	0.0047
30	-	0.0019
45	-	0.0015
90	-	ND

หมายเหตุ ND = Non Detectable หมายถึงตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง

ภาพที่ 1 ปริมาณสารพิษ 2,4-D ในดินในช่วงเวลาต่างๆ



ปริมาณสารพิษในตะกอน

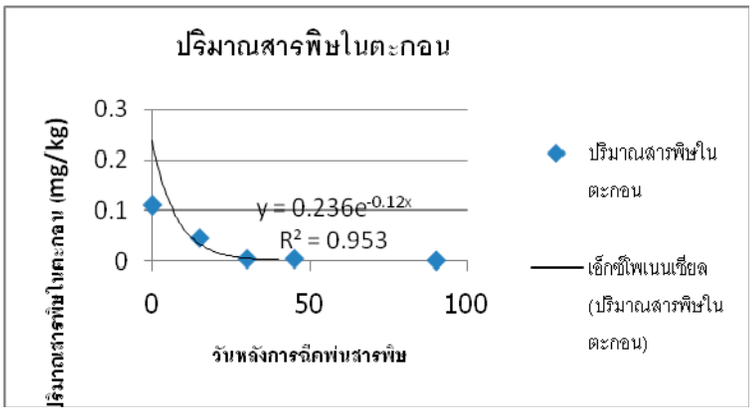
หลังการฉีดพ่น 2,4-D ในนาข้าว ตรวจพบสารพิษในตะกอนในวันที่ฉีดพ่นในปริมาณค่อนข้างต่ำ และปริมาณสารพิษค่อยๆ ลดลงตามลำดับ จนถึงวันที่ 45 หลังการฉีดพ่น และหลังจากนั้นตรวจไม่พบสารพิษในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 2. ปริมาณสารพิษ 2,4-D ในตะกอนในช่วงเวลาต่างๆ

วันหลังการฉีดพ่น	ปริมาณ 2,4-D เฉลี่ย (mg/kg) หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 1 (N = 10)	ปริมาณ 2,4-D เฉลี่ย (mg/kg) หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 2 (N = 10)
0	0.0182	0.1091
15	-	0.0448
30	-	0.0033
45	-	0.0035
90	-	ND

หมายเหตุ ND = Non Detectable หมายถึงตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง

ภาพที่ 2. ปริมาณสารพิษ 2,4-D ในตะกอนในช่วงเวลาต่างๆ



ปริมาณสารพิษในน้ำ

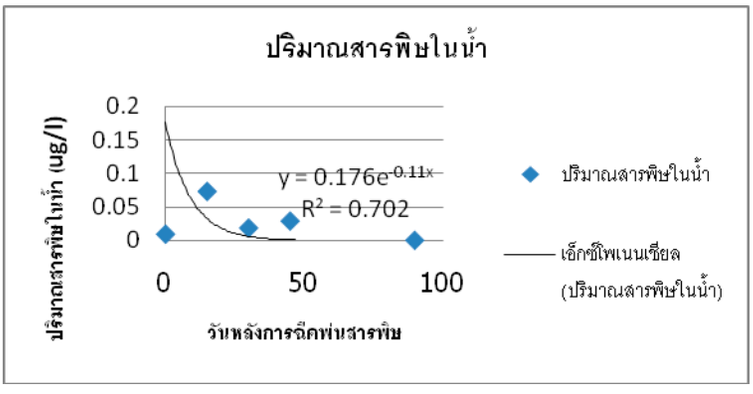
หลังการฉีดพ่น 2,4-D ครั้งที่ 1 ตรวจพบสารพิษในวันที่ฉีดพ่น (0 วัน) ปริมาณค่อนข้างสูง ส่วนหลังการฉีดพ่น 2,4-D ครั้งที่ 2 ในวันแรกไม่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำได้ เนื่องจากเกษตรกรปล่อยน้ำออกจากนา และน้ำมีปริมาณน้อยมาก แต่หลังจากนี้ได้ผันน้ำเข้านาตามปกติ จึงเก็บตัวอย่างน้ำได้จนถึงวันที่ 90 หลังการฉีดพ่น

ตารางที่ 3. ปริมาณสารพิษ 2,4-D ในน้ำในช่วงเวลาต่างๆ

วันหลังการฉีดพ่น	ปริมาณ 2,4-D เฉลี่ย (µg/l) หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 1 (N = 10)	ปริมาณ 2,4-D เฉลี่ย (µg/l) หลังการฉีดพ่นครั้งที่ 2 (N = 10)
0	34.574	-
15	-	0.073
30	-	0.018
45	-	0.029
90	-	ND

หมายเหตุ ND = Non Detectable หมายถึงตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง

ภาพที่ 3. ปริมาณสารพิษ 2,4-D ในน้ำในช่วงเวลาต่างๆ



สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพื่อประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว สรุปได้ว่าการฉีดพ่นสารพิษในนาข้าว ทำให้สารพิษปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมในนาข้าว แม้ว่าปริมาณการปนเปื้อนจะค่อนข้างต่ำ แต่สารพิษสะสมและปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม และอาจถ่ายทอดสู่ห่วงโซ่อาหารไปยังสัตว์น้ำและพืชน้ำได้ ซึ่งพืชและสัตว์เหล่านี้เป็นอาหารของมนุษย์ด้วยเช่นกัน เกษตรกรควรระมัดระวังในการฉีดพ่นสารพิษ หรือใช้วัตถุมีพิษชนิดที่สลายตัวได้เร็ว และไม่สะสมในสภาพแวดล้อมฉีดพ่นสลับบ้าง ถึงแม้ว่า 2,4-D มีความเป็นพิษในระดับพิษน้อยถึงพิษปานกลาง เกษตรกรก็ต้องระมัดระวังและป้องกันตนเองจากการได้รับพิษขณะฉีดพ่น ต้องสวมใส่อุปกรณ์ในการป้องกันการได้รับสารพิษ ต้องปฏิบัติตามคำแนะนำบนฉลาก และต้องปฏิบัติอย่างเคร่งครัดในการเว้นระยะเวลาเก็บเกี่ยวเพื่อให้สารพิษสลายตัวก่อนเก็บผลผลิตไปจำหน่าย เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายจากการใช้วัตถุมีพิษ และเพื่อเป็นการบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษทางการเกษตรตามภารกิจและจุดประสงค์ของกรมวิชาการเกษตรต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการศึกษาการประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว นำไปเผยแพร่และแนะนำเกษตรกรผู้ปลูกข้าวหรือพืชอื่นๆ ให้ทราบถึงการปนเปื้อนของสารพิษในสภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกพืชว่าปริมาณสารพิษที่ตกค้างและปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมในบริเวณนั้นอยู่ในระดับที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในดินและน้ำหรือไม่ เพื่อให้เกษตรกรมีความระมัดระวังในการฉีดพ่นสารพิษ เพื่อความปลอดภัยของเกษตรกรและสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2554. สถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร. FAO/WHO. 1996. Pesticide Residues in Food 1995. Evaluation Part II. Toxicological and Environment. WHO/PCS/96, 48.

FAO/WHO. 2000. Codex Alimentarius Commission. Status of Codex Maximum Residue Limits for Residues of Pesticides in Food and Animal Feeds. pp. part 1-72.

http://www.environhealthaction.org/upload_files/fullreport.pdf

http:ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/2,4-D.htm

http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0380.htm

IPCS International Programme on Chemical Safety. 1995. Health and Safety Guide No. 97. http://www.epa.gov/REDs

Louvar, J.F and B.D. Louvar. 1998. Health and Environmental Risk Analysis: Fundamentals with Applications. Prentice Hall PTR. New Jersey. U.S.A.

Thier, H.P. and J. Kirchhoff, 1996. 2,4-D, Dichlorprop (2,4-DP). In Manual of Pesticide Residue Analysis, Volume II. Working group analysis, Pesticide Commission, VCH, Germany.

US. EPA. 1999. The Role of Use-Related Information in Pesticide Risk Assessment and Risk Management. Office of Pesticide Program. Item:6039 (June 29, 1999)

U.S. Nation Library of Medicine. 1995. Hazardous Substances Databank. Bethesda, MD.

U.S. Public Health Service. 1995. Hazardous Substances Databank. Washington, DC.

Ware, G.W. 1996. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Volume 147. Springer-Verlag New York, inc. 163 p.

Wauchop, R.D., Buttler, T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M. and Burt, J.P. 1994. SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision Making. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 123:p 1-157.

ศึกษาผลกระทบจากการใช้สารกำจัดวัชพืช กลุ่ม chlorinated phenoxy compound ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งปลูกข้าวและพืชไร่ : ชนิด 2,4-D ในนาข้าวเขตชลประทาน

Risk Assessment of 2,4-D Used in Paddy Field

ภิญญา จุลินทร ปรีชา ฉัตรสันติประภา สิริพร เหลืองสุชนกุล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว ทำการศึกษาที่ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี ในฤดูปลูกตั้งแต่เดือนธันวาคม 2553 – เมษายน 2554 ฉีดพ่น 2,4-D สูตร 82.1% SL อัตราสูงสุดตามคำแนะนำบนฉลาก เพื่อเป็นการศึกษาหาข้อมูลในกรณีที่มีการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้อย่างเต็มที่ (worst case scenario) หลังการฉีดพ่นสารพิษ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 2,4-D ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เช่น ปลา และปู นำผลที่ได้จากการศึกษามาประมวลกับข้อมูลทางพิษวิทยาของ 2,4-D เพื่อประเมินผลกระทบจากการฉีดพ่น 2,4-D ต่อสภาพแวดล้อม ผลการศึกษาพบว่าหลังการฉีดพ่น 2,4-D ในนาข้าว ตรวจไม่พบสารพิษในสัตว์น้ำทุกตัวอย่าง ตั้งแต่วันที่ฉีดพ่นถึง 90 วันหลังการฉีดพ่น

คำนำ

กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบในการพิจารณาการห้ามใช้และจำกัดการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรหรือสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่างๆ เป็นการปฏิบัติงานเพื่อลดความเสี่ยงจากการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ต่อผู้ใช้ และผู้บริโภค และแก้ไขปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากมาตรการพิจารณาการห้ามใช้ และจำกัดการใช้แล้ว ยังได้กำหนดโครงการเฝ้าระวังติดตามการใช้และผลกระทบของสารพิษที่มีพิษร้ายแรงที่อาจมีการห้ามใช้ในอนาคต เช่น methomyl, carbofuran, dicrotophos, EPN ฯลฯ หรือสารพิษที่พบพิษตกค้างในผลิตผลเกษตรกรรมในปริมาณสูง และอาจมีปัญหาต่อการส่งผลผลิตไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น chlorpyrifos และ cypermethrin รวมถึงสารกำจัดวัชพืชบางชนิดที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในแหล่งปลูกพืชไร่ และนาข้าว เช่น 2,4-D เพื่อประเมินความเสี่ยงภัยที่เกิดจากการใช้สารพิษเหล่านี้ด้วย

2,4-D เป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืช กลุ่ม chlorinated phenoxy compound 2,4-D ในรูป acid มีความเป็นพิษในระดับพิษน้อยถึงพิษปานกลาง (slight to moderately toxicity) ความเป็นพิษโดยการกิน (oral LD_{50}) ต่อหนู (rat) 375 – 666 mg/kg หนู (mice) 370 mg/kg และหนูตะเภา (guinea pig) < 320 – 1000 mg/kg. การศึกษาด้านพิษวิทยาในต่างประเทศรายงานว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ทดลองเมื่อใช้ในระดับสูง และทำให้เกิดเนื้องอกและ

รหัสการทดลอง 05-01-53-01-01-01-02-53

มะเร็งในหนูทดลองได้ มีความเป็นพิษต่อนกในระดับค่อนข้างต่ำถึงปานกลาง ความเป็นพิษต่อปลาของ 2,4-D ขึ้นอยู่กับสูตร (formulation) บางสูตรผสมมีความเป็นพิษสูงมากค่า LD_{50} มีช่วงตั้งแต่ 10-100 mg/l และมีรายงานว่าเป็นพิษต่อผึ้ง (http:ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/2,4-D.htm)

2,4-D เป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้มาก 2,4-D ผลิตเป็นเกลือได้หลายชนิด มีสูตรผสมเป็นทั้งสูตร SL, SP, EC และ WG ใช้ป้องกันกำจัดวัชพืชใบกว้างหลายชนิด เช่น ตาลปัตรฤาษี เทียนนา ผักปราบ ผักปุ้ง ผักเบี้ยหิน ผักโขม หญ้ายาง ประเภทกก เช่น กกขนาก แห้วหมู จากสถิติการนำเข้าวัตถุอันตราย ระบุว่า ในปี พ.ศ. 2554 วัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรกนั้น มีการนำเข้า 2,4-D ในรูป 2,4-D dimethyl ammonium เป็นอันดับที่สาม และนำเข้าในรูป 2,4-D sodium salt เป็นอันดับที่ 5 ของประเทศ คิดเป็นปริมาณ 4,852.16 และ 3,818.83 ตันตามลำดับ หรือคิดเป็นมูลค่า 359.14 และ 353.14 ล้านบาทตามลำดับเช่นเดียวกัน 2,4-D มีวิธีการใช้โดยการฉีดพ่น ดังนั้นโอกาสที่สารพิษจะฟุ้งกระจายในอากาศขณะฉีดพ่น และเกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อม เมื่อตกลงบนดินหรือในแหล่งน้ำย่อมเกิดขึ้นได้สูง กลายเป็นมลพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในดินและในน้ำของบริเวณเกษตรกรรมนั้น

กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร จึงได้จัดทำชุดโครงการวิจัยเพื่อศึกษาประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร สำหรับงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาผลกระทบของ 2,4-D ต่อสภาพแวดล้อมในนาข้าว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องใช้ในการประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้สารพิษ 2,4-D ต่อสภาพแวดล้อมในนาข้าว และเป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตรในการพิจารณาบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษที่มีอันตรายร้ายแรง เช่น การเข้มงวดการใช้ การจำกัดการใช้ หรือการห้ามใช้ เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

1. **อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง**
   - 1.1 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างปลา ได้แก่สวิง แห ถังพลาสติก ถุงพลาสติก ฯลฯ
   - 1.2 ปลาสวาย และปลาตะเพียน ขนาดลำตัว 1-2 นิ้ว ชนิดละ 500 ตัว
   - 1.3 อาหารปลาเล็กอัดเม็ดสำเร็จรูป
   - 1.4 ผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืช 2,4-D ที่ใช้ฉีดพ่นในแปลงทดลอง ชื่อการค้า “เนลพอน” สูตร 82.1% SL
   - 1.5 ชุดตรวจวัดปริมาณออกซิเจนในน้ำ (dissolved oxygen, DO)
   - 1.6 ชุดตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดินและน้ำ (pH meter)
   - 1.7 เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิน้ำ
2. **อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ**

2.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette, separatory funnel, cylinder, Erlenmeyer flask, beaker, round bottom flask, chromatographic column, filtering funnel, test tube ฯลฯ

2.2 เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารเคมี analytical grade (AR) และ pesticide grade (PR) ได้แก่ acetone, hexane, petroleum ether, ethyl acetate, dichloromethane, sodium sulphate (granule 12-16 mesh), aluminium oxide 90 active neutral (70-230 mesh), silica gel (20-120 mesh) etc.

2.3 glass wool และ filter paper No.1 & 42

2.4 สารพิษมาตรฐาน 2,4-D ความบริสุทธิ์สูง

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1 เครื่องชั่งหยาบ และเครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance)

3.2 เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด Homogenizer และ Blender

3.3 เครื่องลดปริมาตรชนิด Rotary Evaporator

3.4 เครื่องลดปริมาตรชนิด Nitrogen Evaporator

3.5 ตู้อบสารเคมี (Digital Oven)

3.6 เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace)

3.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

3.8 ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

3.9 ตู้เย็นแช่แข็ง (Deep Freezer) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ -20°C

3.10 เครื่อง Gas Chromatograph (GC) พร้อมตัวตรวจจับชนิด Electron Capture Detector (ECD)

การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

1. ติดต่อได้แปลงข้าวที่เหมาะสม ที่ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี มีเนื้อที่ทำการทดลอง 5 ไร่ จากพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดมากกว่า 100 ไร่ มีคลองยาวขนาบด้านหนึ่งของแปลงนา เพื่อใช้เลี้ยงปลาธรรมชาติ คลองนี้รับน้ำจากคลองชลประทานซึ่งได้รับน้ำจากแม่น้ำท่าจีน น้ำมีลักษณะใส และมีค่าดัชนีคุณภาพน้ำเหมาะสมแก่การเลี้ยงปลา

2. ในฤดูปลูกตั้งแต่เริ่มหว่านข้าวจนถึงเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 120 วัน ฉีดพ่น 2,4-D ตามวิธีปฏิบัติของเกษตรกร เพื่อป้องกันกำจัดวัชพืช 2 ครั้ง ครั้งแรกก่อนหว่านข้าวเมื่อวันที่ 10 ธ.ค. 2553 เพื่อเป็นการฉีดคุมวัชพืช ครั้งที่ 2 ฉีดพ่น 2,4-D เมื่อวันที่ 30 ธ.ค. 2553 หลังหว่านข้าวแล้ว เพื่อฆ่าวัชพืชที่อาจเกิดขึ้นใหม่ เกษตรกรฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น เช่น pretilachlor, pyribenzoxim, butachlor + propanil การฉีดพ่นสารพิษใช้เครื่องยนต์สะพายหลัง

3. สารพิษ 2,4-D ที่ใช้ในการทดลอง เป็น 2,4-D dimethyl ammonium สูตรและความเข้มข้น 82.1% w/v SL ชื่อการค้า “เนลพอน” ของบริษัท Dow Agro Sciences อัตราตามคำแนะนำบนฉลาก ให้ใช้กำจัดวัชพืชใบกว้าง กกในนาข้าว และในไร่ข้าวโพด ให้พ่นหลังจากวัชพืชงอก และมีใบแล้ว 2-4 ใบ อัตราฉีดพ่น 155-205 ซีซี ต่อน้ำ 60-80 ลิตรต่อไร่ หรือ 40-52 ซีซีต่อน้ำ 25-50 ลิตรต่องาน ซึ่งจากการศึกษานี้เลือกใช้อัตรา 100 ซีซีต่อน้ำ 25 ลิตร เป็นการศึกษาหาข้อมูลในกรณีที่มีการใช้วัตถุมีพิษชนิดนี้อย่างเต็มที่ (worst case scenario)

4. ก่อนเริ่มการฉีดพ่นสารพิษ เก็บปลา ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในคลองติดนาข้าว ไปวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D ซึ่งอาจมีตกค้างอยู่เดิมในสภาพแวดล้อม เพื่อเป็นการตรวจวัดปริมาณสารพิษก่อนเริ่มการทดลอง เป็นค่าตั้งต้นก่อนที่จะมีการใช้สารพิษในแปลง (Reference value)

5. ได้เก็บตัวอย่างสัตว์น้ำในคลองติดนาข้าว ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 2,4-D เพื่อหาอัตราการสลายตัวของ 2,4-D ในตัวอย่างต่างๆ เป็นระยะดังนี้

1) ภายหลังฉีดพ่น 0 วัน (3 ชั่วโมงภายหลังฉีดพ่น)

2) ภายหลังฉีดพ่น 15 วัน

3) ภายหลังฉีดพ่น 30 วัน

4) ภายหลังฉีดพ่น 45 วัน

5) ภายหลังฉีดพ่น 90 วัน

บันทึกข้อมูลสภาพภูมิอากาศ และข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่นความชื้นดิน อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนในน้ำ ทุกวันที่มีการเก็บตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์ 2,4-D ในสัตว์น้ำ

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

ปลามีเกล็ด เช่นปลาตะเพียนให้ขอดเกล็ดออกให้หมด จากนั้นแล่เอาเฉพาะเนื้อด้านข้างของปลาทั้ง 2 ชนิด มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปั่นด้วย Blender ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วชั่งใส่ใน Erlenmeyer flask ตัวอย่างละ 20 กรัม เพื่อสกัดสารพิษตกค้างตามวิธีของ Thier, H.P. and J. Kirchhoff, 1996. 2,4-D, Dichlorprop (2,4-DP). In Manual of Pesticide Residue Analysis, Volume II. Working group analysis, Pesticide Commission, VCH, Germany. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง GC/ECD

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษ 2,4-D ในสัตว์น้ำ เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ โดยการหา % recovery และ Limit of Quantification (LOQ) ได้ผลการศึกษา % recovery ในเนื้อปลา ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 – 0.40 mg/kg เฉลี่ย 70% ค่าปริมาณสารพิษต่ำที่สุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantification, LOQ) 0.05 mg/kg

ระยะเวลา

เริ่มการทดลอง ตุลาคม 2553 สิ้นสุดการทดลอง กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ

นาข้าวของเกษตรกร ตำบลสนามชัย อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ภายหลังการฉีดพ่นสารพิษ 2,4-D ครั้งที่ 1 ได้ตรวจวิเคราะห์ปลา ในวันที่ฉีดพ่น และหลังการฉีดพ่นสารพิษครั้งที่ 2 ได้ตรวจวิเคราะห์สารพิษในปลาและปู จำนวน 12 ตัวอย่าง ตั้งแต่วันที่ฉีดพ่นจนถึง 90 วันหลังฉีดพ่น ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างในทุกตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพื่อประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว สรุปได้ว่าการฉีดพ่นสารพิษในนาข้าว อาจทำให้สารพิษปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมเช่นดิน น้ำ ตะกอน ในนาข้าว แม้ว่าปริมาณการปนเปื้อนจะค่อนข้างต่ำ แต่สารพิษสะสมและปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม และอาจถ่ายทอดสู่ห่วงโซ่อาหารไปยังสัตว์น้ำและพืชน้ำได้ ซึ่งแม้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้จะตรวจไม่พบสารพิษตกค้างในสัตว์น้ำ แต่สัตว์น้ำเหล่านี้เป็นอาหารของมนุษย์ด้วยเช่นกัน เกษตรกรควรระมัดระวังในการฉีดพ่นสารพิษ หรือใช้วัตถุมีพิษชนิดที่สลายตัวได้เร็ว และไม่สะสมในสภาพแวดล้อมฉีดพ่นสลับบ้าง ถึงแม้ว่า 2,4-D มีความเป็นพิษในระดับพิษน้อยถึงพิษปานกลาง เกษตรกรก็ต้องระมัดระวังและป้องกันตนเองจากการได้รับพิษขณะฉีดพ่น ต้องสวมใส่อุปกรณ์ในการป้องกันการได้รับสารพิษ ต้องปฏิบัติตามคำแนะนำบนฉลาก และต้องปฏิบัติอย่างเคร่งครัดในการเว้นระยะเวลาเก็บเกี่ยวเพื่อให้สารพิษสลายตัวก่อนเก็บผลผลิตไปจำหน่าย เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายจากการใช้วัตถุมีพิษ และเพื่อเป็นการบริหารจัดการควบคุมวัตถุมีพิษทางการเกษตรตามภารกิจและจุดประสงค์ของกรมวิชาการเกษตรต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการศึกษาการประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้ 2,4-D ในนาข้าว นำไปเผยแพร่และแนะนำเกษตรกรผู้ปลูกข้าวหรือพืชอื่นๆ ให้ทราบถึงการปนเปื้อนของสารพิษในสภาพแวดล้อมในแหล่งปลูกพืชว่าปริมาณสารพิษที่ตกค้างและปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมในบริเวณนั้นอยู่ในระดับที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในดินและน้ำหรือไม่ เพื่อให้เกษตรกรมีความระมัดระวังในการฉีดพ่นสารพิษ เพื่อความปลอดภัยของเกษตรกรและสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2554. สถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร.

http://www.environhealthaction.org/upload_files/fullreport.pdf

http:ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/2,4-D.htm

http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0380.htm

IPCS International Programme on Chemical Safety. 1995. Health and Safety Guide No. 97.

http://www.epa.gov/REDs

Louvar, J.F and B.D. Louvar. 1998. Health and Environmental Risk Analysis: Fundamentals with Applications. Prentice Hall PTR. New Jersey. U.S.A.

Thier, H.P. and J. Kirchhoff, 1996. 2,4-D, Dichlorprop (2,4-DP). In Manual of Pesticide Residue Analysis, Volume II. Working group analysis, Pesticide Commission, VCH, Germany.

US. EPA. 1999. The Role of Use-Related Information in Pesticide Risk Assessment and Risk Management. Office of Pesticide Program. Item:6039 (June 29, 1999)

U.S. Nation Library of Medicine. 1995. Hazardous Substances Databank. Bethesda, MD.

U.S. Public Health Service. 1995. Hazardous Substances Databank. Washington, DC.

Ware, G.W. 1996. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Volume 147. Springer-Verlag New York, inc. 163 p.

Wauchop, R.D., Buttler, T.M., Hornsby A.G., Augustijn - Beckers, P.W.M. and Burt, J.P. 1994. SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision Making. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 123:p 1-157.

ศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่น สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม triazines ในพืชสวน และพืชไร่ :ชนิด atrazine ในไร่อ้อย

ศึกษาการสลายตัวและสะสมของสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม triazines ในผลิตผลพืชสวน และพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อย

Risk Assessment of Atrazine Used in Sugarcane Crop to Applicator and Consumer

วิภา ตั้งนิพนธ์ ประกิจ จันทร์ติ๊บ เอกราช สิทธิมงคล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ไร่อ้อย *(Saccharum officinarum)* ของเกษตรกร ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น กำหนดเป็นแปลงทดสอบสารพิษ atrazine โดยปลูกอ้อย ระหว่างเดือนมกราคม 2554 – มกราคม 2555 ฉีดพ่นสารพิษ atrazine 3 ครั้ง เมื่อต้นอ้อยมีอายุ 20 วัน 3.5 เดือน และ 6 เดือน สูตร 90% WG ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ด้วยเครื่องยนต์สะพายหลัง ภายหลังการฉีดพ่น เก็บแผ่นผ้าที่ติดบนส่วนต่างๆ ของร่างกาย น้ำล้างมือและน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นสารพิษ มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ atrazine ที่ปนเปื้อนบนร่างกาย เก็บเกี่ยวอ้อยที่ระยะอายุ 12 เดือน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ในอ้อย ผลการทดลองที่ได้นำมาประมวลกับข้อมูลทางพิษวิทยาของ atrazine เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสุขอนามัยจากการฉีดพ่นของผู้ใช้พบว่าการใช้ atrazine ในแหล่งปลูกอ้อย ผู้ฉีดพ่นมีโอกาสปนเปื้อนสารพิษ atrazine เมื่อฉีดพ่นครั้งที่ 1 อ้อยอายุ 20 วัน ปริมาณ 0.1988 ถึง 0.4854 mg/kg bw/day ฉีดพ่นครั้งที่ 2 อ้อยอายุ 3.5 เดือน ปนเปื้อนปริมาณ 2.0724 ถึง 4.0431 mg/kg bw/day ฉีดพ่นครั้งที่ 3 อ้อยอายุ 6 เดือน ปนเปื้อนปริมาณ 1.1796 ถึง 1.5610 mg/kg bw/day ระยะต้นอ้อยอายุ 3.5 เดือน เป็นช่วงฤดูฝน เดือนพฤษภาคม 2554 วัชพืชพืชกำลังงอกงามหนาแน่น เกษตรกรใช้เวลาฉีดพ่นนานมากกว่า 1 ชั่วโมง การปนเปื้อนสารพิษ atrazine ภายหลังการฉีดพ่น เมื่อประเมินแล้วมีค่า MOE (Margin of exposure) 6-12 ต่ำกว่าช่วงเวลาอื่น เป็นความเสี่ยงที่ยอมรับไม่ได้ ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ในอ้อย และน้ำอ้อย ที่ระยะเก็บเกี่ยว ซึ่งห่างจากการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายนาน 6 เดือน ตรวจไม่พบปริมาณตกค้าง ดังนั้นการบริโภคลำอ้อย และน้ำอ้อยจะไม่เกิดความเสี่ยงต่อการรับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย การฉีดพ่น atrazine แต่ละครั้งเป็นเวลานานนับชั่วโมงในแปลงปลูกอ้อย เพื่อกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นหนาแน่นในช่วงฤดูฝน เป็นความเสี่ยงปนเปื้อนสารพิษ atrazine เข้าสู่ร่างกาย เกษตรกรพึงระมัดระวังสวมใส่เสื้อผ้าปกคลุมให้มิดชิดระหว่างการฉีดพ่น และชำระล้างร่างกายทันทีภายหลังการฉีดพ่น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจะได้ไม่เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพ

คำนำ

Atrazine เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีคุณลักษณะแบบ selective systemic herbicide สามารถถูกดูดซึมจากรากไปทางท่อน้ำเลี้ยง xylem ของพืชไปสะสมอยู่ที่ apical miristem และที่ใบ มีคุณสมบัติใช้ได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก (pre-emergence และ early post-emergence) ในไร่ข้าวโพด อ้อย สับปะรด กำจัดประเภทใบแคบ ได้แก่ หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนนก กำจัดประเภทใบกว้าง ได้แก่ ผักเบี้ยหิน ผักโขมธรรมดา ผักโขมหนาม น้ำนมราชสีห์ และ สาบแร้งสาบกา เป็นต้น องค์การอนามัยโลก WHO จัดให้มีระดับความเป็นพิษต่ำ (unclassified) มีค่า LD_{50} สำหรับหนูขาวใหญ่ 1,869-3,090 mg tech/kg bw โดยการกิน (The e-Pesticide Manual 15th,2009)

เนื่องจากมีการศึกษาจำนวนมากพบว่า atrazine เป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemicals) ทำให้ฮอร์โมนร่างกายทำงานผิดปกติ เกิดการเบี่ยงเบนทางเพศ มีผลทั้งต่อมนุษย์ และสัตว์ขึ้นอยู่กับจำนวนปริมาณที่ได้รับ ทำให้ไข่ของสัตว์มีเปลือกบาง จำนวนอสุจิลดน้อยลง เกิดความไม่สมดุลระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยเพศผู้จะลดจำนวนน้อยลง เพราะระบบสืบพันธุ์เพศผู้ผิดปกติเกิดสองเพศในตัวเดียวกัน ปริมาณฮอร์โมนเพศผู้ลดลงผิดปกติมาก โดยการศึกษาของ นัก Biologists Hayes และคณะ (2010) University of California Berkeley เมื่อต้นศตวรรษ 2000 พบว่าสหรัฐอเมริกา มีการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine มากถึง 80 million pounds ในแต่ละปีเพื่อกำจัดวัชพืชในไร่ ข้าวโพด ข้าวฟาง จึงเกิดการปนเปื้อนของสาร atrazine อย่างกว้างขวางทั้งในน้ำ ใต้ดิน และน้ำผิวดิน และจากการศึกษามากมาย พบว่าสาร atrazine ไปรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อโดยเฉพาะฮอร์โมนชนิด estrogen และ testosterone ที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ของสัตว์ชนิดปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน และหนูในห้องทดลองด้วยและพบว่ามีผลต่อเด็กแรกเกิดน้ำหนักลดลงเมื่อได้รับ atrazine ในระยะตั้งครรภ์ การศึกษาครั้งแรกพบในกบ ปี 2002 พบว่ากบจะมีสองเพศในตัวเดียวกัน มีทั้งรังไข่ และอวัยวะเพศผู้ ในตัวเดียวกัน เมื่อได้รับ atrazine 0.1 ppb. เท่านั้น แม้ว่า U.S. EPA กำหนดให้มี atrazine ในน้ำดื่มได้ 3ppb. จึงทำให้จำนวนกบเพศผู้ลดน้อยลง และได้กบกะเทยมาแทน ได้เพศเมียมากยิ่งขึ้น เป็นผลเนื่องจากระบบ hormone ไม่สมดุล ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้ atrazine ถูกห้ามใช้ในประเทศยุโรปหลายประเทศได้แก่ ฝรั่งเศส สวีเดน เดนมาร์ก ฟินแลนด์ เยอรมัน ออสเตรีย และอิตาลี เนื่องจากพบว่ามีการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในน้ำดื่มมากกว่า 0.1 ppb. แต่ก็ยังมีบางประเทศที่ยังมีการใช้สารชนิดนี้ ได้แก่ สหราชอาณาจักร ไอร์แลนด์ เบลเยี่ยม และลักแซมเบิร์ท ในขณะที่สหรัฐยังคงใช้อยู่เช่นเดิม ในอัตราที่มากถึง 77 million pounds ในปี 2003 เนื่องจากU.S. EPA สรุปข้อมูลที่นำเสนอโดย Hayes และคณะว่ายังมีไม่เพียงพอ

ในปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยนำเข้าสารออกฤทธิ์ของ atrazine จำนวนมากกว่า 3,500 ตัน มีปริมาณมากเป็นอันดับ 7 ของสารกำจัดวัชพืชทั้งหมดที่นำเข้าประเทศ (รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี 2553) ดังนั้น กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร จึงได้จัดทำชุดโครงการวิจัยเพื่อศึกษาประเมินความเสี่ยงต่อการสัมผัสสารเคมี atrazine เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารเคมีที่ร่างกายได้รับ กับค่าความเป็นพิษของสารเคมีนั้นๆ เพื่อบ่งชี้ว่าปริมาณสารเคมีที่ได้รับมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้ใช้ และ ผู้บริโภคหรือไม่ ประกอบด้วยการศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่นในแหล่งปลูกอ้อยภายหลังการฉีดพ่น การสลายตัวและสารพิษตกค้างของ atrazine ในอ้อยภายหลังการฉีดพ่น เพื่อให้ได้ข้อมูลการประเมินความเสี่ยงของผู้ใช้สารพิษและของผู้บริโภคผลิตผลที่มีสารพิษตกค้าง เป็นข้อมูลสำหรับกรมวิชาการเกษตร ในการพิจารณาบริหารจัดการควบคุม

วัตถุมีพิษที่มีอันตราย เพื่อความเข้มงวดการใช้ การจำกัดการใช้ หรือการห้ามใช้ เป็นความปลอดภัยของผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แปลงทดลองอ้อย *(Saccharum officinarum)*
2. แผ่นผ้าฝ้ายขนาด 10x10 ตารางเซนติเมตร จำนวน 16 แผ่น ต่อผู้ฉีดพ่น 1 คน
3. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช atrazine ที่ใช้ฉีดพ่นในแปลงทดลองคือ บี เค แม็กซ-พรี 90% WG
4. เครื่องแก้ว volumetric flask, volumetric pipette, separatory funnel, Erlenmeyer flask, cylinder, beaker, round bottom flask, chromatographic column, filtering funnel, pipette, petri-dish, glass vial, disposable pasteur pipette, test tube
5. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ

5.1 สารเคมี analytical grade (AR) ได้แก่ acetone, ethyl acetate, acetonitrile, toluene, anh. sodium sulphate,sodium chloride, magnesium sulfate, PSA(Primary second amine)

5.2 สารเคมี pesticide grade (PR) ได้แก่ ethyl acetate, hexane

6. glass wool และ filter paper No.1
7. สารพิษมาตรฐาน atrazine ความบริสุทธิ์สูง
8. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เครื่องชั่งหยาบ และเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด homogenizer และ Blender เครื่องเขย่า (reciprocal shaker) เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator ตู้อบสารเคมี (digital oven) เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) เครื่องทำสูญญากาศ (Vacuum pump) เครื่องลดปริมาตร ชนิด Nitrogen Evaporator เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ตู้ดูดความชื้น (Desiccator) ตู้เย็นแช่แข็ง (Deep freezer) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ -20˚C เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
9. การวิเคราะห์สารพิษด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) พร้อม Auto injector และตัวตรวจวัดชนิด Electron capture detector (ECD) โดยปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง ดังนี้

Detector : Electron capture detector

Mode : Splitless

Column : Rtx –CL Pesticides capillary column

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 mm ความยาว 30 m สารเคลือบหนา 0.5 µm

Temperature : Injector 250˚C, Detector 300˚C

Oven : 80˚C (1 นาที) $\xrightarrow{20\ ^\circ c/\text{นาที}}$ 175˚C (4 นาที) $\xrightarrow{2\ ^\circ c/\text{นาที}}$ 215˚C (2 นาที)

$\xrightarrow{8\ ^\circ c/\text{นาที}}$ 250°C (5 นาที)

Volume injected : 1 ไมโครลิตร

วิธีการ

เลือกแปลงทดลองของเกษตรกรที่ปลูกเพื่อการค้า เหมาะสมสำหรับการทดลองที่ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น และมีการใช้สารพิษ atrazine เป็นประจำ ระยะการทดลองในเดือนมกราคม 2554 – มกราคม 2555



ภาพแปลงทดลองไร่อ้อย ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น

การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

1. แปลงทดลองอ้อย มีพื้นที่ขนาด 16 ไร่ ระยะระหว่างแถวปลูก 1 เมตร ระหว่างต้น 0.3 เมตร

2. เกษตรกรฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชเป็นระยะๆ สารกำจัดพืชที่ใช้เป็นประจำได้แก่ atrazine, ametryn และ 2,4- D ประมาณ 2-3 ครั้งต่อฤดูปลูก

3. กำหนดการฉีดพ่น atrazine โดยผู้ฉีดพ่น 4 คน จำนวน 3 ครั้ง การฉีดพ่นครั้งแรกเมื่ออ้อยอายุ 20 วัน ครั้งที่ 2 อายุ 3.5 เดือน และครั้งที่ 3 เมื่อ 6 เดือน อัตรา 900 มิลลิกรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ฉีดพ่นด้วยเครื่องยนต์สะพายหลัง และบันทึกเวลาการฉีดพ่นทุกครั้ง

4. การติดแผ่นผ้าบนร่างกายเกษตรกรผู้ฉีดพ่น ก่อนการฉีดพ่นทุกครั้ง ติดแผ่นผ้าฝ้าย ขนาด 10x10 ตารางเซนติเมตร บนเสื้อผ้าตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ หมวก แผ่นผ้าปิดจมูก อกเสื้อ ด้านในอกเสื้อ บ่า ศอก หลังเสื้อด้านในของหลังเสื้อ ต้นขา หน้าแข้ง และด้านในหน้าแข้ง

5. ก่อนเริ่มการฉีดพ่น atrazine ต้องเก็บตัวอย่างอ้อย ในแปลงทดลองมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง เพื่อเป็นค่า Base-line level หรือค่าต่ำสุดก่อนที่ตัวอย่างจะปนเปื้อนสารพิษ

6. หลังการฉีดพ่น atrazine เก็บตัวอย่างสิ่งต่างๆดังต่อไปนี้

6.1 ทันทีที่ฉีดพ่นเสร็จในแต่ละครั้งเก็บแผ่นผ้าที่ติดบนร่างกาย น้ำล้างมือ น้ำล้างเท้า ของผู้ฉีดพ่นนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกาย

6.2 เก็บตัวอย่างอ้อยเพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างที่ระยะเก็บเกี่ยว และนำไปหีบเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำอ้อย

วิธีการเก็บตัวอย่างแต่ละชนิด

1. การเก็บตัวอย่างแผ่นผ้าจากแต่ละส่วนของร่างกายแยกกันใส่ Erlenmeyer flask และปิดฝาขวด

2. การเก็บตัวอย่างน้ำล้างมือ น้ำล้างเท้าของเกษตรกรผู้ฉีดพ่น โดยการล้างมือ หรือเท้าด้วยน้ำประปา ครั้งละ 1 ลิตร แล้วแยกบรรจุใส่ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

3. การเก็บตัวอย่างอ้อย สุ่มเก็บจากทั้งแปลง โดยเก็บจากหลายๆ จุดรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง อ้อยจำนวน 20 ลำเป็น 1 ตัวอย่าง จำนวน 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่ง 10 ลำ ไปหีบเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างน้ำอ้อย จำนวน 1 ลิตรต่อตัวอย่าง

การเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างทุกชนิดหลังจากเก็บจากแปลงทดลอง จะเก็บในถุงพลาสติกหรือใส่ภาชนะที่เหมาะสม แล้วปิดให้สนิท พร้อมทั้งเขียนรายละเอียดกำกับให้ชัดเจนในแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ ชนิดตัวอย่าง วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง แล้วนำใส่ในถังน้ำแข็งโดยวางน้ำแข็งไว้ข้างล่างและข้างบนของตัวอย่างนำกลับมาตรวจวิเคราะห์หาข้อมูลต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษ atrazine

1. วิธีการตรวจวิเคราะห์ atrazine บนแผ่นผ้า

สกัดตัวอย่างแผ่นผ้า โดยใช้ mixer และ shaker ใช้ ethyl acetate เป็นสารสกัด กรองสารละลายผ่าน anh. Sodium chloride นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator ปรับปริมาตรให้แน่นอนด้วย hexane ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง GLC/ECD ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Recovery) ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2.5 นาโนกรัมต่อ ตารางเซนติเมตร ได้ผลระหว่าง 101-121% มีค่า LOQ 0.5 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2. วิธีการตรวจวิเคราะห์ atrazine ในอ้อย ใช้วิธีการของ QuEChERS, 2003 ดังนี้

ชั่งตัวอย่างอ้อย 10 กรัมใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetronitrile 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่า vortex mixture นาน 1 นาที เติม sodium chloride 1 กรัม และ magnesium sulfate 4 กรัม เขย่านาน 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 1.5 มิลลิลิตร ใส่ micro centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่ใส่ PSA 0.025 กรัม และmagnesium sulfate 0.15 กรัม เขย่านาน 30 วินาที นำไป centrifuge อีกครั้งนาน 1นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนบน 1 มิลลิลิตร ไปลดปริมาตร ด้วยแก๊สไนโตรเจน จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย hexane ใส่ vial นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Recovery) ที่ความเข้มข้น 0.025,0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ผลระหว่าง 76 – 95 % มีค่า LOQ 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3. การสกัด atrazine ในน้ำอ้อย (Furlani et al.2011)

เติม acetonitrile (AR) 20 มิลลิลิตร ลง ECQUVIN50CT (50 ml centrifuge tube, 8 กรัม anh. magnesium sulfate และ 2 กรัม sodium chloride) แล้ว ตวงน้ำอ้อยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงไป เขย่านาน 2 นาที นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่

4500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที (ทำใน centrifuge เย็น) ปิเปตสารละลายชั้นบนมา 9 มิลลิลิตร ลงใน centrifuge tube ที่มี 900 มิลลิกรัม anh. magnesium sulfate และ 300 มิลลิกรัม PSA อยู่แล้ว นำ centrifuge tube ไป vortex ประมาณ 10 วินาที เปิด centrifuge tube เติม toluene 3.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่า 1 นาที นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 4500 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ปิเปตสารละลายชั้นบนมา 2.0 มิลลิลิตร ลง glass test tube. ระเหยให้เกือบแห้งที่อุณหภูมิน้อยกว่า 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ไนโตรเจน. ปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิดหัวตรวจวัด ECD

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Recovery) ที่ความเข้มข้น 0.025,0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ผลระหว่าง 98 – 107% มีค่า LOQ 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนบนส่วนต่างๆ ของร่างกายผู้ฉีดพ่น และสารพิษตกค้างในอ้อยและน้ำอ้อย ไปวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ ประมวลข้อมูลการปนเปื้อนสารพิษบนร่างกายเพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสุขอนามัยจากการฉีดพ่นและจากการบริโภคโดยใช้หลักเกณฑ์การประเมิน Pesticide Risk Assessment ของ US.EPA (US.EPA,1999)

ระยะเวลา

เดือนตุลาคม 2553 –มกราคม 2555

สถานที่ดำเนินการ

แปลงทดลองเกษตรกร ที่ ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการศึกษาปริมาณสารพิษปนเปื้อนบนร่างกายผู้ฉีดพ่น atrazine ในแปลงปลูกอ้อย

ทำการฉีดพ่น atrazine จำนวน 3 ครั้ง ครั้งแรก เมื่อ อ้อย อายุ 20 วัน ครั้งที่ 2 อ้อย อายุ 3.5 เดือน และ ครั้งที่ 3 อ้อย อายุ 6 เดือน สูตร 90% WG อัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตรฉีดพ่นด้วยเครื่องยนต์สะพายหลังและบันทึกเวลาการฉีดพ่น เพื่อนำไปประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนบนตัวเกษตรกรผู้ฉีดพ่น เมื่อเสร็จสิ้นการฉีดพ่นนำแผ่นผ้าฝ้ายที่ติดบนตำแหน่งต่างๆ ของร่างกายคือที่ หัว จมูก บ่า ศอก หน้าอก หลัง ต้นขา หน้าแข้ง น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นไปสกัดหาสารพิษ atrazine ที่ปนเปื้อน ผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 ครั้ง ตรวจพบสารพิษบนแผ่นผ้า ดังนี้ การฉีดพ่นครั้งที่ 1 มีการปนเปื้อนมากบริเวณหลัง ต้นขา และ แข้ง ปริมาณระหว่าง 2,195.19 ถึง 4,265.42 ไมโครกรัมต่อ 100 ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 1) การฉีดพ่นครั้งที่ 2 ปนเปื้อนมากที่สุดบริเวณตั้งแต่ จมูก บ่า ศอก หลัง ต้นขา และแข้ง ปริมาณระหว่าง 1,287.94 ถึง 10,587.50 ไมโครกรัมต่อ 100 ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 2) การฉีดพ่นครั้งที่ 3 ปนเปื้อนมากบริเวณ จมูก หลัง ต้นขา และ แข้ง ปริมาณ 1,385.09 ถึง 2,436.02 ไมโครกรัมต่อ 100 ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 3)

ส่วนน้ำล้างมือและน้ำล้างเท้า ปนเปื้อนมากเมื่อฉีดพ่นครั้งที่ 2 อ้อยอายุ 3.5 เดือน ปริมาณระหว่าง 821.88 ถึง 4,533.40 ไมโครกรัมในน้ำล้างมือ และปริมาณระหว่าง 2,038.27 ถึง 4,457.88 ไมโครกรัมในน้ำล้างเท้า (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 วัน

บริเวณปนเปื้อน	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 1 เวลา 45 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 2 เวลา 54 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 3 เวลา 39 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 4 เวลา 10 นาที	ช่วงของปริมาณปนเปื้อน เวลา 10- 54 นาที
หมวก	409.18	602.45	144.09	136.29	136.29-602.45 L1
จมูก	956.21	216.69	330.19	228.21	216.69-956.21 L1
บ่า	142.44	408.72	269.65	88.32	88.32-408.72 L1 11.94-
อก-ใน	13.42	11.94	18.47	22.46	22.46 L1
อก-นอก	301.13	316.20	70.73	83.57	70.73-316.20 L1
ศอก	237.85	524.88	286.27	395.44	286.27-524.88 L1
หลัง-ใน	160.40	39.48	605.25	9.57	9.57-605.25 L1
หลัง-นอก	578.58	1,267.87	2,195.19	533.20	533.20-2,195.19 L1
ต้นขา	2,937.12	2040.41	874.08	921.24	874.08-2,937.12 L1
แข้งใน	71.38	157.47	76.38	74.52	71.38-157.47 L1
แข้งนอก	1,205.36	4,265.42	1,561.76	1,555.55	1,205.36-4,265.42 L1
น้ำล้างมือ	2,111.35	2,107.86	2,700.87	3,210.74	2,107.86-3,210.74 L2
น้ำล้างเท้า	1,076.46	1,798.32	664.68	842.92	664.68-1,798.32 L2

L1 = หน่วย µg/100cm^2 L2 = หน่วย µg

ตารางที่ 2. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

บริเวณปนเปื้อน	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 1 เวลา 1 ชม. 22 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 2 เวลา 1 ชม. 24 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 3 เวลา 1 ชม. 25 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 4 เวลา 1 ชม. 23 นาที	ช่วงของปริมาณปนเปื้อน
หมวก	95.49	17.09	50.43	42.49	17.09-95.49 L1
จมูก	87.05	65.07	131.05	2,137.81	65.07-2,137.81 L1
บ่า	510.13	122.75	245.68	1,287.94	122.75-1,287.94 L1
อก-ใน	25.95	37.58	12.70	16.49	12.70-37.58 L1
อก-นอก	184.36	209.54	198.15	243.69	184.36-243.69 L1
ศอก	1,522.95	771.11	469.30	4,621.38	469.30-4,621.38 L1
หลัง-ใน	3,477.46	353.05	43.96	3,444.89	43.96-3,477.46 L1
หลัง-นอก	6,817.96	3,980.34	676.64	10,587.50	676.64-10,587.50 L1
ต้นขา	5,771.19	3,631.33	2,241.93	2,245.84	2,241.93-5,771.19 L1
แข้งใน	6,204.11	5,707.56	5,953.13	6,125.08	5,707.56-6,204.11 L1
แข้งนอก	5,139.56	4,070.25	5,220.17	5,315.89	4,070.25-5,315.89 L1
น้ำล้างมือ	1,923.19	821.88	2,387.01	4,533.40	821.88-4,533.40 L2
น้ำล้างเท้า	2,200.62	3,965.94	2,038.27	4,457.88	2,038.27-4,457.88 L2

L1 = หน่วย µg/100cm^2 L2 = หน่วย µg

ตารางที่ 3. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และ น้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

บริเวณปนเปื้อน	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 1 เวลา 52 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 2 เวลา 32 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 3 เวลา 52 นาที	ปริมาณปนเปื้อน คนที่ 4 เวลา 38 นาที	ช่วงของปริมาณปนเปื้อน เวลา 32 – 52 นาที
หมวก	578.91	179.42	97.86	286.72	97.86-578.91 L1
จมูก	1,385.09	1,132.79	128.03	349.38	128.03-1,385.09 L1
บ่า	232.44	210.74	66.80	118.32	66.80-232.44 L1
อก-ใน	83.22	27.60	31.41	96.03	27.60-96.03 L1
อก-นอก	138.67	147.08	325.61	666.99	138.67-666.99 L1
ศอก	670.34	528.21	942.66	364.46	364.46-942.66 L1
หลัง-ใน	191.60	17.41	260.41	85.37	17.41-260.41 L1
หลัง-นอก	1,979.75	226.97	611.75	286.10	226.97-1,979.75 L1
ต้นขา	2,173.66	2,436.02	1,687.02	2,401.52	1,687.20-2,436.02 L1
แข้งใน	2,012.63	2,398.20	2,109.44	1,819.63	1,819.63-2,398.20 L1
แข้งนอก	1,994.76	2,299.59	1,919.45	2,274.41	1,919.45-2,299.59 L1
น้ำล้างมือ	263.71	2,732.33	252.42	645.60	252.42-2,732.33 L2
น้ำล้างเท้า	1,976.67	998.98	132.82	637.22	132.82-1,976.67 L2

L1 = หน่วย µg/100cm^2 L2 = หน่วย µg

ปริมาณ atrazine ที่ปนเปื้อนบนแผ่นผ้าจาก ส่วนต่างๆ ของร่างกาย รวมทั้งปนเปื้อนที่มือและเท้า เมื่อนำมาคำนวณ เป็นปริมาณสารพิษต่อพื้นที่ทั้งหมดของร่างกาย (U.S.EPA. 1987, 1992 Appendix 1 ถึง 12) ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ เพื่อประเมินเป็นปริมาณ atrazine ปนเปื้อนบนร่างกาย (Potential Exposure) ของแต่ละครั้งภายหลังการฉีดพ่น คิดเป็นการปฏิบัติงานตามปกติในแต่ละวันของแต่ละคนที่มีการฉีดพ่น พบว่ามีปริมาณ atrazine ปนเปื้อนดังนี้

ฉีดพ่นครั้งที่ 1 อ้อยอายุ 20 วัน ระหว่าง 0.1988 ถึง 0.4367 mg/kg bw/day ของน้ำหนักร่างกาย (ตารางที่ 4)
ฉีดพ่นครั้งที่ 2 อ้อยอายุ 3.5 เดือน ระหว่าง 2.0724 ถึง 4.0431mg/kg bw/day ของน้ำหนักร่างกาย (ตารางที่ 5)
ฉีดพ่นครั้งที่ 3 อ้อยอายุ 6 เดือน ระหว่าง 1.1796 ถึง 1.5610 mg/kg bw/day ของน้ำหนักร่างกาย (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4. ระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อน atrazine ต่อเกษตรกรภายหลังการฉีดพ่น ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 วัน

ผู้ฉีดพ่น คนที่	mg/kg bw/day	%Absorption	Absorbed Dose mg/kg bw/day (exposure)	NOAEL mg/kg bw /day	MOE = NOAEL÷ exposure	ระดับความเสี่ยง
1	0.4367	16.4	0.0716	4.1	57	Accept
2	0.2999	16.4	0,0492	4.1	83	Accept
3	0.4854	16.4	0.0796	4.1	52	Accept
4	0.1988	16.4	0.0326	4.1	126	Accept

ตารางที่ 5. ระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อน atrazine ต่อเกษตรกรภายหลังการฉีดพ่น ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ผู้ฉีดพ่น คนที่	mg/kgBW/day	%Absorption	Absorbed Dose mg/kg BW/day (exposure)	NOAEL mg/kg bw /day	MOE = NOAEL÷ exposure	ระดับ ความเสี่ยง
1	4.0431	16.4	0.6631	4.1	6	Risk
2	2.9623	16.4	0.4858	4.1	8	Risk
3	2.0724	16.4	0.3399	4.1	12	Accept
4	3,9366	16.4	0.6456	4.1	6	Risk

ตารางที่ 6. ระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อน atrazine ต่อเกษตรกรภายหลังการฉีดพ่น ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ผู้ฉีดพ่น คนที่	mg/kg bw /day	%Absorption	Absorbed Dose mg/kg bw /day (exposure)	NOAEL mg/kg bw /day	MOE = NOAEL÷ exposure	ระดับ ความเสี่ยง
1	1.5442	16.4	0.2532	4.1	16	Accept
2	1.5610	16.4	0.2560	4.1	16	Accept
3	1.1796	16.4	0.1935	4.1	21	Accept
4	1.2413	16.4	0.2036	4.1	20	Accept

นำปริมาณ atrazine ปนเปื้อนบนร่างกายไปประเมินหาปริมาณสารพิษที่ดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย (Absorption Dose) โดยผลงานวิจัยของ Ademola *et. al*., (1993) ศึกษาทดลอง in vitro พบว่าผิวหนังมนุษย์สามารถดูดซึมสาร atrazine ผ่านผิวหนังได้ 16.4% จากนั้นเปรียบเทียบกับค่า NOAEL ซึ่งเป็น ค่าสูงสุดของปริมาณสารพิษที่ใช้ในการทดลองที่ไม่ทำให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ทางพิษวิทยา กำหนดโดยใช้ค่า NOEL 4.1 mg/kg bw/day ที่ได้จากการทดลองความเป็นพิษระยะยาวในหนูขาวใหญ่ เป็นเวลานาน 1 ปี (NRA, 1997) แล้วคำนวณหาค่าขอบเกณฑ์ความปลอดภัยจากการได้รับสารพิษ (MOE: Margin of Exposure)

ค่า MOE = NOAEL ÷ Exposure

ขณะนี้ U.S. EPA กำหนดค่า MOE = 10 หรือมากกว่าเป็นขอบ เกณฑ์ความปลอดภัยที่ยอมรับได้จากการทดลองโดยตรงกับแต่ละคน การคำนวณพบว่า ค่าขอบเกณฑ์ความปลอดภัยจากการได้รับสารพิษ (MOE) ของผู้ฉีดพ่น ครั้งที่ 1 อ้อยอายุ 20 วัน มีค่า MOE สูง ตั้งแต่ 51-126 (ตารางที่ 4) ปนเปื้อน atrazine อยู่ในระดับยอบรับเสี่ยงได้ ส่วนการฉีดพ่นครั้งที่ 2 อ้อยอายุ 3.5 เดือน มีค่า MOE ต่ำ ระหว่าง 6-12 (ตารางที่ 5) ดังนั้นผู้ฉีดพ่นกลุ่มนี้มีการปนเปื้อนที่ถูกประเมินมีความเสี่ยงยอมรับไม่ได้ และการฉีดพ่นครั้งที่ 3 อ้อยอายุ 6 เดือน มีค่า MOE ระหว่าง 16 - 21 อยู่ในระดับที่เริ่มเสี่ยงจากการปนเปื้อน (ตารางที่ 6) Rosenheck *et al*., (1993) ทดสอบการปนเปื้อนของ atrazine บนร่างกายเมื่อฉีดพ่นด้วยวิธี hand gun sprayers พบการปนเปื้อน 0.0422 mg/kg bw/day มีค่า MOE สูง 97

ที่ยอมรับความเสี่ยงได้ เปรียบเทียบกับวิธี hand spreader พบการปนเปื้อน 0.548 mg/kg bw / day มีค่า MOE ต่ำ 7 เป็นความเสี่ยงที่ยอมรับไม่ได้

ผลการศึกษาการสลายตัวและพิษตกค้างของ atrazine ใน อ้อย

ระยะการเก็บเกี่ยวอ้อยเว้นช่วงห่างจากการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายนาน 6 เดือน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างอ้อย ตลอดทั้งแปลง ทดลอง 10 ตัวอย่าง เพื่อนำไปสกัดหาสารพิษตกค้าง atrazine ในต้นอ้อยและน้ำอ้อย ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ GC ชนิด ECD รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง น้ำอ้อยที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ภายหลังการหีบอ้อยคิดเป็นอัตรา 21.5% ของน้ำหนักต้นอ้อย ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างทั้งในต้นอ้อยและน้ำอ้อย ที่ระดับ LOQ ของต้นอ้อย 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม LOQ ของน้ำอ้อย 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งตรงกับรายงานของ Food & Drug Administration, 1993.สุ่มตรวจสารพิษของ atrazine จากอาหารหลายชนิดจำนวน 16,428 ตัวอย่าง ระหว่างปี ค.ศ.1991-1992 พบปริมารสารพิษตกค้างต่ำกว่า 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/mono73-8.pdf) เช่นเดียวกับรายงานของ Canadian National Surveillance ศึกษาในตัวอย่างอาหาร 1,075 ตัวอย่าง ในปี ค.ศ.1984-1989 ตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง atrazine โดยกำหนดค่า MRL ของ atrazine 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/atrazine/index-eng.php.) Furlani *et al.*,(2011) ตรวจสารกำจัดศัตรูพืช 7 ชนิด ได้แก่ trifluralin, atrazine, acetochlor, alachlor, endosulfan-alpha, endosulfan-beta,endosulfan- sulfate ที่อนุญาตให้ใช้ได้ในประเทศบราซิล โดยการวิเคราะห์จากตัวอย่างน้ำอ้อยที่สุ่มเก็บจากสถานที่จำหน่ายที่หีบขายสดขณะนั้น และผลิตภัณฑ์น้ำอ้อยสำเร็จรูปที่บรรจุในขวดแก้วแช่เย็นไว้อายุการเก็บไม่เกิน 1 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างระยะเก็บเกี่ยวอ้อย (September / October 2007) และระยะก่อนเก็บเกี่ยว (March/April 2007) จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างทั้ง 7 ชนิด รวมทั้ง atrazine ที่ระดับสูงกว่า LOD 0.04 mg/lของสาร atrazine

สรุปผลการทดลอง

การประเมินความเสี่ยงจากการใช้ atrazine สูตร 90% WG ในแปลงอ้อยด้วย อัตรา 900 กรัม ต่อน้ำ 200 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตลอดฤดูปลูก ภายหลังการฉีดพ่น พบ การปนเปื้อนบนร่างกาย เมื่อฉีดพ่นในระยะอ้อยอายุ 20 วัน วัชพืชอยู่ระหว่างเริ่มงอกภายหลังการปลูกอ้อย เนื่องจากมีการให้น้ำ ผู้ฉีดพ่นใช้เวลา 10-54 นาที การปนเปื้อนสารพิษ atrazine มีค่า MOE สูง ประเมินความเสี่ยงยอมรับได้ การฉีดพ่นอ้อย ระยะอายุ 3.5 เดือน เป็นช่วงฤดูฝน วัชพืชกำลังเจริญงอกงามและหนาแน่นมาก ใช้เวลาฉีดพ่นนาน 1 ชม. 22 นาที – 1 ชม. 24 นาที ผู้ฉีดพ่นจึงปนเปื้อนสารพิษในปริมาณสูงถึง 2.0724 – 4.0431 mg/kg bw/day ประเมินได้ค่า MOE ต่ำ ระหว่าง 6 -12 ผู้ฉีดพ่นจึงมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษ atrazine ส่วนการฉีดพ่น ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อยอายุ 6 เดือน ใบของอ้อยเริ่มปกคลุมผิวดินทำให้วัชพืชงอกบางส่วนเท่านั้น การฉีดพ่นใช้เวลาเพียง 32-52 นาที การปนเปื้อนสารพิษมีค่า MOE อยู่ในระดับยอมรับความเสี่ยงได้

ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ในอ้อย และ น้ำอ้อย ที่ระยะเก็บเกี่ยวซึ่งห่างจากการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายนาน 6 เดือน ตรวจไม่พบปริมาณตกค้าง ดังนั้นการบริโภคลำอ้อยและน้ำอ้อยจะไม่เกิดความเสี่ยง

ต่อการรับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย การฉีดพ่น atrazine แต่ละครั้งเป็นเวลานานนับชั่วโมงในแปลงปลูกอ้อยเพื่อกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นหนาแน่นในช่วงฤดูฝน เป็นความเสี่ยงปนเปื้อนสารพิษ atrazine เข้าสู่ร่างกาย เกษตรกรพึงระมัดระวังสวมใส่เสื้อผ้าปกคลุมให้มิดชิดระหว่างการฉีดพ่น และชำระล้างร่างกายทันที่ภายหลังการฉีดพ่นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจะได้ไม่เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เป็นข้อมูลแนวทางการศึกษาในการประเมินความเสี่ยงจากการใช้ atrazine ในไร่อ้อย
2. เป็นข้อมูลในการให้ความรู้แก่เกษตรกรผู้ฉีดพ่น atrazine
3. เป็นข้อมูลในการหาชุดป้องกันการสัมผัสรับสารพิษจากการใช้ atrazine
4. เป็นข้อมูลในการบริหารความเสี่ยงจากการใช้ atrazine
5. เป็นรูปแบบ หลักเกณฑ์ในการศึกษา การคำนวณ และ การประมวลข้อมูล สำหรับนำไปใช้ในการประเมินความเสี่ยงจากการใช้ atrazine ในพืชชนิดนั้นๆ
6. ถ่ายทอดความรู้จากการวิจัยโดยการเผยแพร่ในรายงานผลการวิจัยประจำแต่ละปี และรายงาน ประชุมวิชาการกรมวิชาการเกษตร
7. ผลิตเป็นสื่อการสอนการเรียนแก่นิสิตนักศึกษาสถาบันวิชาการที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี 2553 สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Ademola,J.I.,Sedik,L.I.,Wester,R.C.and Maibach,H.I. 1993 In vitro percutaneous absorption and metabolism in man of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamine-s-triazine (Atrazine) Arch Toxicol 67:85-91

Anastassiades,M.,Lehotay,S.J.,Stajnbaher,D., and Schenck,F.J.2003 Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction /partitioning “dispersive solid –phase extraction “for the determination of pesticide residuesin produce. J.AOAC Int,86,412-431.

Furlani,R.P.Z.,Marcilio,K.M.,Leme,F.M. and Tfouni,S.A.V. 2011 Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. Food Chemistry, 126,1283-1287.

Hayes T.B.,Khoury V.,Narayan A., Nazir M.,Brown T.,Adame L., Chan E., Buchholz D., Stueve T., and Gallipeau S. (2010) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS, vol. 107,no.10, pp. 4612 –4617

Hayes T.B.,Falso P.,Gallipeau S.and Stice M. 2010 The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist 's perspective. Journal of Experimental Biology –JEXP BIOL ,vol.213, no.6, pp. 921- 933 .

FAO/WHO. 2000. Codex Alimentarius Commission. Status of Codex Maximum Residue Limits for Residues of Pesticides in Food and Animal Feeds. pp. part 1-72.

NRA Atrazine Agricultural Assessment .National Registration Authority .1997 Canberra

Rosenheck,L.,Phillips,J.C.,and Selman, F.B. 1993 Worker mixer/loader and applicator exposure to atrazine. Ciba-Geigy Corporation (Ciba-Geigy Pritocol number 125-91)

The e-Pesticide Manual (15th Edition) 2009 Version 3.0 BCPC (British Crop Protection Council)

US. EPA. 1987.Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision K. Exposure: Re-entry Protection, US. EPA. Washington D.C

US. EPA. 1992.Dermal exposure assessment : principles and application, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C

US. EPA. 1999. The role of use - related Information in pesticide risk Assessment and risk management. Office of Pesticide Program, Item:6039 (June 29, 1999)

Appendix 1. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น คนที่ 1 ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 วัน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว (Surface area) cm^2**	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้า µg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย* µg**
หัว – หมวก	1300	409.18	1	8,875.02
จมูก		956.21		
อก – ใน	3550	13.42	0.0427	456.12
นอก		301.13		
หลัง- ใน	3550	160.40	0.2171	4,458.17
นอก		578.58		
บ่า	2910	142.44	0.1299	538.28
ศอก	1210	237.85	0.1299	373.73
ต้นขา	3820	2,937.12	0.0559	6,273.00
แข้ง – ใน	2380	71.38	0.0559	1,603.93
นอก		1,205.36		
มือ				2,111.35
Feet				1,076.46
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				25,766.06
เกษตรกรมีน้ำหนัก 59 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				0.4367 mg/kg bw/day

Appendix 2. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น คนที่ 2 ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 วัน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้า** µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย*µg**
หัว – หมวก	1300	602.45	1	5,324.45
จมูก		216.70		
อก – ใน	3550	11.94	0.0364	408.51
นอก		316.20		
หลัง- ใน	3550	39.48	0.0302	1,359.08
นอก		1,267.87		
บ่า	2910	408.72	0.0332	395.99
ศอก	1210	524.88	0.0332	211.45
ต้นขา	3820	2,040.41	0.0356	2,775.00
แข้ง – ใน	2380	157.47	0.0356	3,614.26
นอก		4,265.42		
มือ				2,107.86
เท้า				1,798.32
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				17,994.93
เกษตรกรมีน้ำหนัก 60 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				0.2999 mg/kg bw/day

Appendix 3. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น คนที่ 3 ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 วัน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area) cm^2	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย*** µg
หัว – หมวก	1300	144.10	1	3,082.91
จมูก		330.20		
อก – ใน	3550	18.47	0.2071	519.96
นอก		70.73		
หลัง- ใน	3550	605.25	0.2161	1,6842.60
นอก		2195.19		
บ่า	2910	269.65	0.2116	1,660.46

Appendix 3. (ต่อ) ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 3 ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 ว

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*** µg
ศอก	1210	286.27	0.2116	732.99
ต้นขา	3820	874.08	0.0414	1,380.92
แข้ง – ใน	2380	67.377	0.0414	1,537.25
นอก		1,561.76		
มือ				2,700.87
เท้า				664.68
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				29,122.63
เกษตรกรมีน้ำหนัก 60 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				0.4854 mg/kg bw/day

Appendix 4. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 4 ครั้งที่ 1 เมื่ออ้อย อายุ 20 วัน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย***µg
หัว – หมวก	1300	136.29	1	2,369.27
จมูก		228.21		
อก – ใน	3550	22.46	0.2118	628.50
นอก		83.57		
หลัง- ใน	3550	9.567	0.0176	333.64
นอก		533.20		
บ่า	2910	88.32	0.1147	294.90
ศอก	1210	395.44	0.1147	548.99
ต้นขา	3820	921.42	0.0457	1,608.72
แข้ง – ใน	2380	74.52	0.0457	1,692.41
นอก		1,555.55		
มือ				3,210.74
เท้า				842.92
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				11,530.10
เกษตรกรมีน้ำหนัก 58 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				0.1988 mg/kg bw/day

Appendix 5. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น คนที่ 1 ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย***µg
หัว – หมวก	1300	95.49	1	1,186.47
จมูก		87.05		
อก – ใน	3550	25.95	0.1234	807.53
นอก		184.36		
หลัง- ใน	3550	3,477.46	0.3378	81,752.50
นอก		6,817.96		
บ่า	2910	510.13	0.2306	3,422.87
ศอก	1210	1,522.95	0.2306	4,248.99
ต้นขา	3820	5,771.19	0.5469	120,574.14
แข้ง – ใน	2380	6,204.11	0.5469	66,900.42
นอก		5,139.56		
มือ				1,923.19
เท้า				2,200.62
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				283,016.74.
เกษตรกรมีน้ำหนัก 70 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				4.0431 mg/kg bw /day

Appendix 6. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่น คนที่ 2 ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of ody)	**พื้นที่ผิว** (Surface area) cm^2	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย*** µg
หัว – หมวก	1300	17.09	1	534.06
จมูก		65.07		
อก – ใน	3550	37.58	0.1539	1,128.74
นอก		206.54		

Appendix 6. (ต่อ) ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 2 ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm2	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้าμg/100cm2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หลัง- ใน	3550	353.05	0.0815	11,511.87
นอก		3,980.34		
บ่า	2910	122.75	0.1177	420.45
ศอก	1210	771.11	0.1177	1,098.26
ต้นขา	3820	3,631.33	0.5837	80,972.66
แข้ง – ใน	2380	5,707.56	0.5837	56,546.64
นอก		4,070.25		
มือ				821.88
เท้า				3,965.94
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				162,400.84
เกษตรกรมีน้ำหนัก 53 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				3.0642 mg/kg bw/day

Appendix 7. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 3 ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อน บนแผ่นผ้าμg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อน ที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หัว – หมวก	1300	50.43	1	1,179.58
จมูก		131.05		
อก – ใน	3550	12.70	0.0602	423.55
นอก		198.15		
หลัง- ใน	3550	43.96	0.0646	1,550.54
นอก		676.64		
บ่า	2910	245.68	0.0624	445.96
ศอก	1210	469.30	0.0624	354.23
ต้นขา	3820	2,241.93	0.5328	45,629.76
แข้ง – ใน	2380	5,953.13	0.5328	66,195.04
นอก		5,220.17		

Appendix 7. (ต่อ) ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 3 ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย***µg
มือ				2,387.01
เท้า				2,038.27
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				120,204.00
เกษตรกรมีน้ำหนัก 58 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				2.0724 mg/kg bw/day

Appendix 8. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 4 ครั้งที่ 2 เมื่ออ้อย อายุ 3.5 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้า**µg/100cm^2	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย***µg
หัว – หมวก	1300	42.49	1	14,171.99
จมูก		2,137.81		
อก – ใน	3550	16.49	0.0634	548.26
นอก		243.69		
หลัง- ใน	3550	3,444.89	0.2455	92,270.98
นอก		10,587.50		
บ่า	2910	1,287.94	0.1544	5,788.12
ศอก	1210	4,621.38	0.1544	8,635.84
ต้นขา	3820	2,245.84	0.5354	45,929.36
แข้ง – ใน	2380	6,125.08	0.5354	67,733.27
นอก		5,315.89		
มือ				4,533.40
เท้า				4,457.88
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				244,069.09
เกษตรกรมีน้ำหนัก 62 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				3.9366 mg/kg bw/day

Appendix 9. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 1 ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้าμg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หัว – หมวก	1300	578.91	1	18,006.17
จมูก		1,385.09		
อก – ใน	3550	83.22	0.3750	1,846.22
นอก		138.67		
หลัง- ใน	3550	191.60	0.0882	6,201.59
นอก		1,979.75		
บ่า	2910	232.44	0.2316	1,566.83
ศอก	1210	670.34	0.2316	1,878.89
ต้นขา	3820	2,173.66	0.5022	41,702.09
แข้ง – ใน	2380	2,012.63	0.5022	23,843.49
นอก		1,994.76		
มือ				263.71
เท้า				1,976.67
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				97,285.65
เกษตรกรมีน้ำหนัก 63 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				1.5442 mg/kg bw/day

Appendix 10. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 2 ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้าμg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หัว – หมวก	1300	179.42	1	8,529.38
จมูก		1,132.79		
อก – ใน	3550	27.60	0.1579	824.91
นอก		147.08		

Appendix 10. (ต่อ) ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 2 ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้าμg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หลัง- ใน	3550	17.41	0.0712	573.94
นอก		226.97		
บ่า	2910	210.74	0.1146	702.85
ศอก	1210	528.21	0.1146	732.50
ต้นขา	3820	2,436.02	0.5105	47,504.52
แข้ง – ใน	2380	2,398.20	0.5105	27,939.60
นอก		2,299.60		
มือ				2,732.33
เท้า				998.98
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				90,539.00
เกษตรกรมีน้ำหนัก 58 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				1.5610 mg/kg bw/day

Appendix 11. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 3 ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้าμg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หัว – หมวก	1300	97.86	1	1,468.25
จมูก		128.03		
อก – ใน	3550	31.41	0.0880	1,016.87
นอก		325.61		
หลัง- ใน	3550	260.41	0.2986	6,484.37
นอก		611.75		
บ่า	2910	66.80	0.1933	375.71
ศอก	1210	942.66	0.1933	2,204.56
ต้นขา	3820	1,687.02	0.5236	33,741.55
แข้ง – ใน	2380	2,109.44	0.5236	23,918.58
นอก		1,919.45		

Appendix 11. (ต่อ) ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และน้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 3 ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้าμg/100cm2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*μg**
มือ				252.42
เท้า				132.82
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				69,595.12
เกษตรกรมีน้ำหนัก 59 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				1.1796 mg/kg bw/day

Appendix 12. ปริมาณ atrazine บนแผ่นผ้าที่ปนเปื้อนบนร่างกาย น้ำล้างมือ และ น้ำล้างเท้าของผู้ฉีดพ่นคนที่ 4 ครั้งที่ 3 เมื่ออ้อย อายุ 6 เดือน

ตำแหน่งปนเปื้อน (Region of body)	**พื้นที่ผิว** (Surface area)cm^2	**ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้าμg/100cm^2**	Penetration factor*	**ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย*μg**
หัว – หมวก	1300	286.72	1	4,134.68
จมูก		349.38		
อก – ใน	3550	96.03	0.1259	2,980.12
นอก		666.99		
หลัง- ใน	3550	85.37	0.2298	2,334.17
นอก		286.10		
บ่า	2910	118.32	0.1778	612.31
ศอก	1210	364.46	0.1778	784.25
ต้นขา	3820	2,401.52	0.4444	40,773.75
แข้ง – ใน	2380	1,819.63	0.4444	24,058.96
นอก		2,274.40		
มือ				645.60
เท้า				637.22
รวมปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกายระหว่างการฉีดพ่นต่อวัน				84,669.52
เกษตรกรมีน้ำหนัก 62 kg จึงมีปริมาณสารพิษปนเปื้อนร่างกาย ต่อน้ำหนักตัว ต่อวัน				1.3656 mg/kg bw/day

*Penetration factor การคำนวณหาปริมาณสารพิษตกค้างบนเสื้อผ้าที่สวมแล้วมาสัมผัสร่างกาย

= residue on inner dosimeter ÷ (residue on outer + inner dosimeter)

*ปริมาณปนเปื้อนที่สัมผัสร่างกาย = พื้นที่ผิว ×ปริมาณปนเปื้อนบนแผ่นผ้า (outside) ×Penetration factor













ศึกษาการสลายตัวและสะสมสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ในดิน น้ำ และตะกอนในแหล่งปลูกพืชสวนและพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อย

Degradation and Accumulation of Triazine Herbicide in Soil, Water and Sediment : Atrazine After Sprayed on Sugarcane Plantation

ผกาสินี คล้ายมาลา ประกิจ จันทร์ติ๊บ วรวิทย์ สุจิรธรรม

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

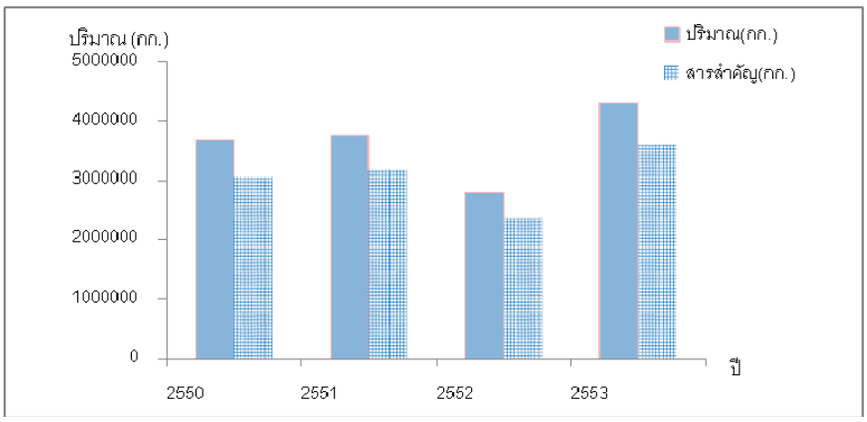
การประเมินความเสี่ยงภัยจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร โดยศึกษาการสลายตัวและสะสมสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ในดิน น้ำ และตะกอน ชนิด atrazine ในไร่อ้อย ทำการทดลองในแปลงปลูกอ้อยของเกษตรกรที่ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2555 โดยเกษตรกรใช้สารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG เมื่อพบวัชพืชในแปลงปลูกอ้อย และสภาพดินมีความชื้นเหมาะสม ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ฉีดพ่นด้วยเครื่องพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง จำนวน 3 ครั้งต่อฤดูปลูก ฉีดพ่นเมื่ออ้อย อายุ 20 วัน และก่อนวัชพืชงอก โดยพ่นซ้ำอีกครั้งหลังจากใส่ปุ๋ยกลบร่อง (อ้อยอายุได้ประมาณ 3.5 เดือน) และอ้อยอายุประมาณ 6 เดือนในอัตราเดิม หลังจากฉีดพ่นได้เก็บตัวอย่างดิน น้ำ ตะกอน และน้ำใต้ดิน ในบริเวณใกล้เคียงแปลงปลูกอ้อย เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง atrazine และ metabolites ในดินพบปริมาณ atrazine <0.02 - 4.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในน้ำพบปริมาณ <0.03 - 6.94 ไมโครกรัมต่อลิตร ในตะกอนพบปริมาณ <0.02 - 0.09 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และน้ำใต้ดิน พบปริมาณ 0.03 - 0.24 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าครึ่งชีวิต (half- life, $t_{1/2}$) ของสาร atrazine ในน้ำ เท่ากับ 22 วัน และในดิน เท่ากับ 115 วัน ในพื้นที่แปลงปลูกอ้อยมีความลาดเอียง และปริมาณน้ำฝนในช่วงของการเก็บตัวอย่างนับเป็นตัวแปรสำคัญในการวิจัยครั้งนี้ จึงพบความเข้มข้นของ atrazine ในแหล่งน้ำมีปริมาณสูง โดยอาจเกิดจากการชะละลายการไหลบ่าของน้ำจากบริเวณแปลงอ้อยที่มีการปนเปื้อนของ atrazine ในดินหลังฉีดพ่นสารลงสู่แหล่งน้ำ หรือซึมละลายไปกับน้ำในดินลงสู่แหล่งน้ำใต้ดิน atrazine เป็นสารที่มีศักยภาพในการปนเปื้อนลงสู่น้ำใต้ดินได้ ดังนั้น การฉีดพ่น atrazine ในแปลงอ้อยด้วยเครื่องพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลังตามอัตราและวิธีข้างต้น พบว่า เกษตรกรควรระมัดระวังอย่างยิ่งในการใช้สาร atrazine โดยความถี่ในการใช้สารในการกำจัดวัชพืชนี้ไม่ควรเกิน 3 ครั้ง เนื่องจากมีความเสี่ยงสูงต่อเกษตรกรผู้ฉีดพ่นสาร และส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารในสิ่งแวดล้อมรอบบริเวณได้ระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งควรมีการศึกษาวิจัยต่อไป

05-01-54-01-01-01-03-54

คำนำ

สารกำจัดวัชพืช atrazine อยู่ในกลุ่ม Triazine โดยมีสูตรทางเคมี คือ $C_8H_{14}ClN_5$ มีชื่อ IUPAC name ว่า 6-chloro-N-ethyl-N'-isopropyl-1, 3, 5-triazine-2, 4-diamine หรือ 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-1, 3, 5-triazine สลายตัวในน้ำ (surface water) จากปฏิกิริยา photolysis และ micro-organisms เป็นสารพวก N-alkylatiion และกลุ่ม chloro substituent ค่าครึ่งชีวิต (half-life) มากกว่า 100 วัน ที่ 20 องศาเซลเซียส และทั้ง photolysis และ microorganisms เกิดในดินด้วย โดยขึ้นกับอุณหภูมิ ความชื้น ค่า pH ของดิน ค่าครึ่งชีวิต (half-life) 20-50 วัน ที่ 20-25 องศาเซลเซียส ในบางประเทศตรวจพบ atrazine ในน้ำใต้ดิน ในระดับความเข้มข้น 0.01-6 ไมโครกรัมต่อลิตร ในประเทศไทย ตามรายงานการตรวจพบ atrazine ในแม่น้ำบางปะกง ปริมาณ 0.01-0.61 ไมโครกรัมต่อลิตร (ผกาสินี และคณะ, 2549) แม่น้ำเจ้าพระยา ปริมาณ 0.18 ไมโครกรัมต่อลิตร ในลุ่มแม่น้ำป่าสัก ปริมาณ 0.03–29.53 ไมโครกรัมต่อลิตร (มลิสา และคณะ, 2552 และ 2553) ในต่างประเทศตรวจพบ atrazine ในน้ำดื่ม (drinking water) 0.01-5 ไมโครกรัมต่อลิตร

ในการปลูกอ้อย ซึ่งเป็นพืชไร่หลักในการผลิตน้ำตาลของประเทศ พบว่า ปัญหาวัชพืชในการปลูกอ้อย โดยทั่วไปมี 2 ลักษณะ คือ ปัญหาวัชพืชที่เกิดมาจากการปลูกอ้อยในพื้นที่มีการไถเตรียมดินก่อนปลูก และปัญหาวัชพืชที่มีอยู่หรืองอกขึ้นมาใหม่ในแปลงอ้อยไว้ตอหลังเก็บเกี่ยวอ้อยแล้ว จึงต้องมีการควบคุมวัชพืชในอ้อย ทำได้ 2 วิธี คือ การควบคุมโดยไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช ได้แก่ การไถเตรียมดิน 1-2 ครั้งก่อนปลูกอ้อย การใช้วัสดุคลุมดินในกรณีอ้อยไว้ตอหลังเก็บเกี่ยวใช้ใบอ้อย หรือเศษพืชที่เหลือคลุมแปลงอ้อย การใช้แรงงานคนหรือเครื่องมือกล เช่น คราดสปริงติดท้ายรถไถ การปลูกพืชแซมระหว่างแถวปลูกอ้อย เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด ถั่วลิสง เป็นต้น และการควบคุมโดยใช้สารกำจัดวัชพืช เช่น atrazine, ametryn, diuron และ paraquat เป็นต้น (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2548) atrazine เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ก่อนอ้อยงอก (Pre-emergence herbicide) โดยแนะนำให้ใช้ในอัตรา 400–600 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ พ่นหลังจากปลูกอ้อย และก่อนวัชพืชงอก โดยพ่นซ้ำอีกครั้งหลังจากใส่ปุ๋ยกลบร่อง (อ้อยอายุได้ประมาณ 2 เดือน) ในอัตราเดิมแต่ในฤดูหนึ่งต้องใช้รวมกันไม่ควรเกิน 1,500 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ถ้าใช้เกินกว่านี้ จะมีปัญหาสารตกค้างของ atrazine ในน้ำใต้ดิน ที่สำคัญการใช้ atrazine ควบคุมวัชพืชก่อนวัชพืชงอกจะได้ผลดี ดินจะต้องมีความชื้น (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2544) สำหรับวัชพืชที่มีปัญหาในไร่อ้อย แบ่งได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ คือ พวกใบเลี้ยงเดี่ยว (monocots) หรือเรียกว่าใบแคบ, พวกใบกว้าง (dicots) และพวกกก (sedge) เช่น หญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colonum*) หญ้าตีนกาใหญ่ (*Eleusine verticillata*) แห้วหมู (*Cyperus rotandus*) ไมยราบหนาม (*Mimosa invisa*) โคกกระสุน (*Tribulus terrestris*) และผักเบี้ยหิน (*Trianthema portulacastrum*) เป็นต้น การเพิ่มของวัชพืชหลายชนิด ทำให้แนวโน้มการนำเข้าสาร atrazine ในปี 2553 มีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1. สถิติการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช atrazine จากปริมาณการนำเข้าและปริมาณสารสำคัญ (กิโลกรัม, กก.) ในระหว่างปี พ.ศ. 2550-2553

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง ได้แก่
   1.1 เครื่องมือเก็บตัวอย่างดิน (soil auger)
   1.2 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ และตะกอน ได้แก่ แครงตักน้ำและตะกอน
   1.3 ขวดพลาสติกใส่น้ำ
   1.4 ขวดแก้วใส่ตะกอน
   1.5 ถุงพลาสติกใส่ดิน
   1.6 เครื่องมือวัดคุณภาพน้ำ
   1.7 เครื่องที่มีระบบระบุตำแหน่งบนพื้นโลก (Global Positioning System; GPS)
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
   2.1 เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel, erlenmeyer flask, cylinder, beaker, round bottom flask, filtering funnel และ pipette เป็นต้น
   2.2 เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐาน ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette
   2.3 เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัด การเตรียมสารมาตรฐาน และปรับปริมาตรตัวอย่าง เช่น acetonitrile, ethyl acetate ชนิด analytical grade (AR) และ pesticide grade (PR)
   2.4 สารพิษมาตรฐาน atrazine ความบริสุทธิ์ 98.50% รวมทั้งสารเมตาบอไลท์ (metabolites) 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) ความบริสุทธิ์ 99.5% และ desisopropyl atrazine (DIA) ความบริสุทธิ์ 99.0%
   2.5 เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่งหยาบ, เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance), เครื่อง ultrasonic bath, เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator, เครื่องลดปริมาตร ชนิด nitrogen

evaporator, เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector (DAD) ที่ 220 นาโนเมตร (nm)

วิธีดำเนินการ

1. **การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง**

1.1 สำหรับการทดลองที่ ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น ขนาด 16 ไร่ ระบุพิกัดที่ N 16°28′ 11.7″, E 102°23′25.7″ เริ่มปลูกอ้อยในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2554 และเก็บเกี่ยวผลผลิต อ้อย เมื่ออายุประมาณ 12-13 เดือน ซึ่งมีแหล่งน้ำใกล้กับพื้นที่แปลงปลูกอ้อย และแหล่งน้ำใน โครงการอนุรักษ์และฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ ระบุพิกัดที่ N 16°28′22.0″, E 102°24′19.2″

1.2 การสำรวจพื้นที่ที่มีการใช้น้ำใต้ดินหรือน้ำบาดาลในการเกษตรและอุปโภคบริโภค

1.3 การเตรียมอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง นำขวดเก็บน้ำและขวดเก็บตะกอน ทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำและ acetone แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ส่วนดิน เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก เตรียมอุปกรณ์เก็บ ดิน แครงเก็บน้ำและตะกอน

1.4 การฉีดพ่นวัตถุมีพิษ การปลูกอ้อยและดูแลรักษาตามแบบของเกษตรกร

1.5 การเก็บตัวอย่างดิน น้ำ และตะกอน เก็บตัวอย่างก่อนการฉีดพ่น และภายหลังการฉีดพ่น

1.6 การเก็บตัวอย่างน้ำใต้ดิน (น้ำบาดาล)

2. **การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ**

2.1 การเตรียมตัวอย่างดิน

2.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างดินมีสิ่งอื่นๆ ปนมา เช่น เศษหิน เศษพืช ให้เก็บออกก่อนนำไปชั่งเพื่อทดสอบ

2.1.2 ชั่งตัวอย่างดิน (ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง) 20.0 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask และ 50.0 กรัม ใส่ลงใน Petri dish และบันทึกน้ำหนัก Petri dish

2.2 การหาความชื้นในตัวอย่างดิน

2.2.1 นำตัวอย่างดิน 50.0 กรัม ไปเข้าตู้อบ (Oven) โดยตั้งอุณหภูมิ 105 $\pm$ 5 °C นาน 24 ชั่วโมงนำตัวอย่างดินไปเข้าตู้อบ (Oven) อีกครั้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 105 $\pm$ 5 °C นาน 4 ชั่วโมง

2.2.2 ครบเวลา นำตัวอย่างดินออกจากตู้อบ และใส่ไว้ใน Dessicator จนเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

2.2.3 นำตัวอย่างดินไปชั่ง บันทึกน้ำหนักครั้งที่ 2

2.2.4 น้ำหนักของการอบที่สองครั้งจะต่างกันไม่เกิน 1% ถ้าต่างมากกว่านี้ จะต้องนำเข้าอบที่อุณหภูมิเดิมต่อจนน้ำหนักที่ชั่งได้แตกต่างกันไม่เกิน 1% นำไปคำนวณ % ความชื้น

2.3 การคำนวณ % ความชื้นดิน

2.3.1 $$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ}) \times 100}{(\text{น้ำหนักดินหลังอบ} - \text{น้ำหนัก Petri dish})}$$

โดย น้ำหนักดินก่อนอบ มาจาก น้ำหนัก Petri dish รวมกับ น้ำหนักดิน 50.0 กรัม

น้ำหนักดินหลังอบ มาจาก น้ำหนัก Petri dish รวมกับ น้ำหนักดินหลังอบที่ชั่งได้

2.3.2 น้ำหนักดินแห้ง (กรัม) = $\frac{\text{น้ำหนักดินเปียก} - (\text{น้ำหนักดินเปียก} \times \% \text{ ความชื้นดิน})}{100}$

2.4 การสกัดสารกำจัดวัชพืช atrazine ในตัวอย่างดิน/ตะกอน วิธีการตรวจวิเคราะห์ atrazine ในดิน และตะกอน ประยุกต์ใช้วิธี ultrasonic (Babic, S. et. al., 1998)

2.4.1 ตัวอย่างดิน 20 กรัม เติม ethyl acetate (AR) 75 มิลลิลิตร นำไปตั้งที่เครื่อง ultra sonic bath 25 นาที

2.4.2 ครบเวลา ยกลงตั้งทิ้งไว้ แล้วกรองผ่าน sodium sulphate

2.4.3 ล้างด้วย ethyl acetate (AR) 2 ครั้งๆละ 20 มิลลิลิตร

2.4.4 นำไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง Rotary evaporator ระเหยจนเกือบแห้ง

2.4.5 นำมาเปลี่ยน solvent เป็น acetonitrile / hexane (iso-octane) ใช้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ระเหยเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile และกรองผ่าน PTFE filter

2.5 วิธีการตรวจวิเคราะห์ atrazine ในน้ำ ใช้วิธี In house method (2007)

2.6 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นดิน นำตัวอย่างดินและตะกอนที่เก็บมา นำไปตากไว้ในที่ร่มจนมีความชื้นอยู่ในช่วง 10 – 20% จากนั้นนำไปชั่งในวันเวลาเดียวกันกับการชั่งตัวอย่างเพื่อสกัด และการคำนวณน้ำหนักตัวอย่างดินและตะกอนแห้ง

2.7 การคำนวณปริมาณสารพิษตกค้าง ในตัวอย่าง ดิน น้ำ และตะกอน ใช้สูตร

$$C = \frac{(R_x - B_0)}{A_0} \times \frac{V}{W} \times D$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง (น้ำ หน่วย ไมโครกรัมต่อลิตร ปลา พืชน้ำ ดิน และตะกอน หน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

R_x คือ Response (area/height) ของสารในตัวอย่าง

B_0 คือ intercept ของ calibration curve

A_0 คือ slope ของ calibration curve

V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) หรือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

D คือ dilution factor

2.8 การคำนวณค่าครึ่งชีวิต (half- life, $t_{1/2}$) จากสมการ exponential ใช้สูตร

half- life ($t_{1/2}$) = -0.693/b

เมื่อ b คือ slope ของ curve จากสมการ exponential

$$y = ae^{bx}$$

2.9 ประสิทธิภาพของวิธีการสกัด (% Recovery) ตามสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_{fortified}}$$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน Fortified sample

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน Sample blank

$C_{fortified}$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงใน Fortified sample

2.10 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector (DAD) ที่ 220 นาโนเมตร วิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลการทดลอง

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนมกราคม 2555

สถานที่ดำเนินการ

1. แปลงอ้อยที่ใช้ในการทดลองของเกษตรกร นายประสงค์ หวานไข่แก้ว ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

สภาพพื้นที่แปลงปลูกอ้อย เป็นที่ดอนมีความลาดชันปานกลาง มีแหล่งน้ำด้านท้ายแปลง การระบายน้ำดี เกษตรกรมีการใช้ปุ๋ยยูเรีย และสูตร 21-7-18 ผลการวิเคราะห์ดินพบว่า มีปฏิกิริยาดินเป็นกรดเล็กน้อย ค่า pH 6.6-6.8 เนื้อดิน เป็นดินร่วนปนดินเหนียว (Clay loam) ดินมีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง ปริมาณอินทรียวัตถุปานกลาง 0.97-1.71% ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ค่อนข้างต่ำ 7-23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณโพแทสเซียมสูง 126-204 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง atrazine ในตัวอย่างดิน น้ำ และตะกอน ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด Diode Array Detector (DAD) ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง atrazine ในตัวอย่างดินและตะกอน ที่ความเข้มข้น 0.08-0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า recovery เฉลี่ยระหว่าง 90-92% ส่วนในน้ำ ที่ความเข้มข้น 0.2-1.16 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่า recovery เฉลี่ยระหว่าง 84-98% ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำ ตะกอน น้ำใต้ดิน และเก็บตัวอย่างดินส่งตรวจความอุดมสมบูรณ์ของดินและวิเคราะห์สารพิษตกค้าง เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงก่อนการฉีดพ่น atrazine ในตัวอย่างดิน เก็บดิน 2 ระดับ ได้แก่ ดินบน ลึก 0-10 เซนติเมตร ตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย 0.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.74 มิลลิกรัมต่อ desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และดินล่าง ลึก 10-20 เซนติเมตร ตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย <0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างตะกอน ตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย <0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างน้ำตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย <0.03 และสารเมตาบอไลท์ ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 1.79-6.47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจไม่พบ desisopropyl atrazine (DIA) ดังตารางที่ 1 และ 2

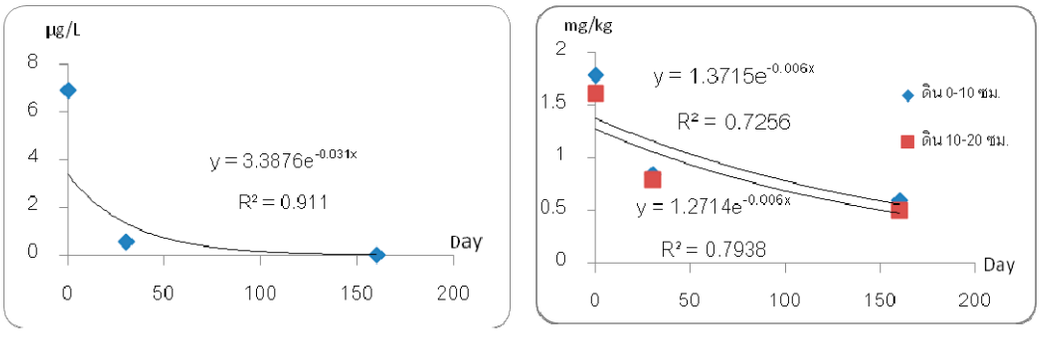
ได้เริ่มการปฏิบัติงานฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine ในแปลงทดลองอ้อย เมื่ออ้อยเริ่มมีวัชพืชขึ้นแซมกระจายทั่วไปในแปลง เนื่องจากมีฝนตก อ้อยกำลังเจริญแตกใบอ่อน สภาพดินมีความชื้นเหมาะสม เกษตรกรฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG ครั้งที่ 1 ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ถังแกลลอนขนาด 200 ลิตร รวมใช้ไป 4 ถังโดยมีผู้ฉีดพ่น 4 คน ด้วยเครื่องฉีดพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง ในขณะฉีดพ่นมีกระแสลมพัดจากทิศเหนือไปทิศใต้ ภายหลังการฉีดพ่น ได้สุ่มเก็บตัวอย่าง ดิน น้ำ และตะกอน ในแปลงอ้อย แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียงแปลง และบริเวณโครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดตามวิธีการของตัวอย่างแต่ละชนิด แล้วตรวจหาปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด DAD ที่ 220 นาโนเมตร (nm) ผลการวิเคราะห์ หลังฉีดพ่น 0, 1 และ 30 วัน ในตัวอย่างดิน ตะกอน น้ำตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย ดังในตารางที่ 1 และ 2

การฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG ครั้งที่ 2 ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ถังแกลลอนขนาด 200 ลิตร ในอัตราเดียวกัน รวมใช้ไป 4 ถังโดยมีผู้ฉีดพ่น 4 คน ด้วยเครื่องฉีดพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง ในขณะฉีดพ่นมีกระแสลมสงบ ภายหลังการฉีดพ่น 1 และ 34 วัน ได้สุ่มเก็บตัวอย่าง ดิน น้ำ และตะกอน ในแปลงอ้อย แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียงแปลง และบริเวณโครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่รวมทั้งเก็บตัวอย่างน้ำใต้ดิน (น้ำบาดาล) ในบริเวณอำเภอหนองเรือ นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดตามวิธีการของตัวอย่างแต่ละชนิด ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด DAD ที่ 220 นาโนเมตร (nm) ผลการวิเคราะห์ หลังฉีดพ่น 1 และ 34 วัน ในตัวอย่างดิน ตะกอน น้ำ และน้ำใต้ดิน ตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย ดังในตารางที่ 1 และ 2

การฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG ครั้งที่ 3 ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ถังแกลลอนขนาด 200 ลิตร ในอัตราเดียวกัน รวมใช้ไป 3 ถังโดยมีผู้ฉีดพ่น 4 คน ด้วยเครื่องฉีดพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง ในขณะฉีดพ่นมีกระแสลมจากทิศใต้ไปทิศเหนือ ภายหลังการฉีดพ่น 0, 28 และ 160 วัน ได้สุ่มเก็บตัวอย่าง ดิน น้ำ และตะกอนในแปลงอ้อย แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียงแปลง และบริเวณโครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ รวมทั้งเก็บตัวอย่างน้ำใต้ดิน (น้ำบาดาล) ในบริเวณอำเภอหนองเรือ นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดตามวิธีการของตัวอย่างแต่ละชนิด ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด DAD ที่ 220 นาโนเมตร (nm) ผลการวิเคราะห์ หลังฉีดพ่น 0, 28 และ 160 วัน ในตัวอย่างดิน ตะกอน น้ำและน้ำใต้ดิน ตรวจพบสารพิษตกค้าง atrazine เฉลี่ย ดังตารางที่ 1 และ 2

ตามมาตรฐานคุณภาพดินของประเทศไทย กำหนดค่ามาตรฐานสาร atrazine ในดิน ต้องไม่เกิน 22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2547) ส่วนค่ามาตรฐาน atrazine ในน้ำ ค่า Maximum Allowable Concentration (MAC) 5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร (µg/L) ในแหล่งน้ำเพื่อการประมง U.S.EPA ได้กำหนดค่า Maximum contaminant level (MCLs) ของ atrazine เท่ากับ 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) หรือ 3 ไมโครกรัมต่อลิตร (EPA, 2003 and ATSDR, 2006) และ WHO (2004) กำหนดค่า Guideline Value ได้ 0.002 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) หรือ 2 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำดื่ม (drinking-water) การปนเปื้อนของ atrazine ในน้ำต่อระบบนิเวศน์ สิ่งหนึ่งคือการปล่อยน้ำออกจากไร่อ้อยอาจกระทบต่อพืชน้ำ ในหนองบึงหรืออ่างเก็บน้ำ ในทัสมาเนียมีงานวิจัยว่า atrazine มีผลระยะยาวต่อสาหร่ายที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) ในสหรัฐฯ มีการศึกษาถึงผลกระทบทางตรงต่อสัตว์น้ำชนิดต่างๆ (aquatic animals) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) ปนเปื้อนในน้ำ (NRA., 1997) เนื่องจากสารนี้มีสมบัติคล้ายฮอร์โมนเพศที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบมีรายงานการเปลี่ยน

เพศจากกบเพศผู้ไปเป็นกบเพศเมียมากขึ้น โดย Tyrone Hayes และคณะผู้วิจัยของมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย เบอคเลย์ ศึกษาพบว่า ในน้ำที่มี atrazine ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร (µg/L, ppb) ส่งผลต่อการพัฒนาอวัยวะเพศของลูกอ๊อด (Tadpole) ทำให้เป็นกะเทย (hermaphrodile) ได้ กรณีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร จะลดขนาดของกล่องเสียง (larynx) ในเพศผู้ให้มีขนาดเท่าๆ กับของกบเพศเมีย ที่อาจกระทบต่อการจับคู่ผสมพันธุ์ของกบ (frog) ในช่วงฤดูใบไม้ผลิ (Cox.C, 2002)



ภาพที่ 2. การสลายตัวของ atrazine ในน้ำและดิน หลังการฉีดพ่น atrazine เพื่อกำจัดวัชพืชในอ้อย (การฉีดพ่นครั้งที่ 3)

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine และ metabolites ในดินและตะกอน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, mg/kg) หลังการฉีดพ่นวัชพืชในอ้อย

วันที่เก็บตัวอย่าง		ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษ (mg/kg)								
		ดินบน (1-10 cm)			ดินล่าง (10-20 cm)			ตะกอน		
		atrazine	DIA	DEA	atrazine	DIA	DEA	atrazine	DIA	DEA
4 พ.ย. 53	Control	<0.02	0	0	<0.02	0	0.21	<0.02	0.11	0
11 ม.ค. 54	Control	0.23	0.06	0.74	<0.02	0.38	0.07	<0.02	0.12	0.06
ฉีดครั้งที่ 1										
24 ก.พ. 54	Day 0	2.05	0.23	0.02	0.21	0.17	0.64	0.03	0	0.10
25 ก.พ. 54	Day 1	4.04	0.14	0.06	0.71	1.61	0.66	0.03	0	0.10
26 มี.ค. 54	Day 30	0.45	0.97	0.26	0.21	0.57	0.26	0.09	0.33	0.55
ฉีดครั้งที่ 2										
20 พ.ค. 54	Day 1	1.27	0.69	0.56	0.27	0.42	0.38	0.08	0.29	0.49
22 มิ.ย. 54	Day 34	0.46	0	0.68	0.10	0	0.86	<0.02	0.25	0.04
ฉีดครั้งที่ 3										
2 ส.ค. 54	Day 0	1.78	0.38	0.74	1.61	0.59	0.58	0.02	0	0.07
30 ส.ค. 54	Day 28	0.84	0	1.22	0.79	0	0.40	<0.02	0.07	0.17
8 ม.ค. 55	Day 160	0.59	0.28	1.38	0.50	0.19	1.06	0.05	0.05	0.70

หมายเหตุ LOD ของ atrazineในดินและตะกอน เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

LOQ ของ atrazineในดินและตะกอน เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ในการวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างน้ำใต้ดิน หรือน้ำบาดาล เพื่อเป็นการสำรวจการปนเปื้อนของ atrazine ลงสู่น้ำใต้ดินด้วย จากการสอบถามข้อมูลจากสำนักทรัพยากรน้ำบาดาลเขต 4 ขอนแก่น พบว่าชนิดหินในเขตอำเภอหนองเรือเป็นชนิดกรวด/ทราย (Gravel/Sand) ความลึกโดยเฉลี่ย (Average Depth of Aquifer, meter) เท่ากับ 10-20 เมตร ระดับน้ำปกติเฉลี่ย (Average Static Water Level, meter) และชนิดหินทราย/หินทรายแป้ง, หินดินดาน (Sandstone/Siltstone/Shale) ความลึกโดยเฉลี่ย 30-50 เมตร ระดับน้ำปกติเฉลี่ย 4-12 เมตร น้ำใต้ดินหรือน้ำบาดาลจะเกิดในบริเวณที่เป็นรอยต่อระหว่างชั้นหิน หรือโซนที่เป็นหินผุ ความลึกเฉลี่ยของชั้นน้ำบาดาลประมาณ 30-40 เมตร น้ำใต้ดินบางพื้นที่มีคุณภาพดี สามารถนำไปผลิตเป็นน้ำดื่มได้ เช่น ที่โรงน้ำแข็งกิจวารี น้ำมีลักษณะทางกายภาพ ดังนี้ ค่า pH เท่ากับ 7.5 ความขุ่น เท่ากับ 0.7 เอ็นทียู (NTU) สี 0 เพลตินัม-โคบอลต์ คุณลักษณะทางเคมี พบแร่ธาตุ เช่น เหล็ก, แมงกานีส, ทองแดง, สังกะสี, ซัลเฟต, คลอไรด์ และฟลออไรด์ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำดื่ม

การคำนวณค่าครึ่งชีวิต (half- life, $t_{1/2}$) ของสาร atrazine ในน้ำ ดิน ในการทดลองซึ่งคำนวณจากข้อมูลความเข้มเฉลี่ยที่ตรวจพบในการฉีดพ่นครั้งที่ 3 โดยเก็บตัวอย่างหลังฉีดพ่น 0, 30 และ 160 วัน นำมาคำนวนการสลายตัวหลังการฉีดพ่น ได้ค่า half-life ของ atrazine ในน้ำ เท่ากับ 22 วัน และในดิน เท่ากับ 115 วัน

ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine และ metabolites 2 ชนิด คือ desisopropyl atrazine และ desethyl atrazine ในน้ำและน้ำใต้ดิน (ไมโครกรัมต่อลิตร, µg/L) หลังการฉีดพ่นวัชพืชในอ้อย

วันที่เก็บตัวอย่าง		ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษ (µg/L)					
		น้ำ			น้ำใต้ดิน		
		atrazine	DIA	DEA	atrazine	DIA	DEA
4 พ.ย. 54	Control	<0.03	0	6.47			
11 ม.ค. 54	Control	<0.09	0	1.79			
ฉีดครั้งที่ 1							
24 ก.พ. 54	Day 0	2.69	2.60	2.47			
26 มี.ค. 54	Day 30	0.73	11.95	0			
ฉีดครั้งที่ 2							
20 พ.ค. 54	Day 1	2.19	4.63	7.27	0.05	0	0
22 มิ.ย. 54	Day 34	0.86	0	4.95	0.03	0	0
ฉีดครั้งที่ 3							
2 ส.ค. 54	Day 0	6.94	2.89	0.43	0.03	0	0
30 ส.ค. 54	Day 30	0.56	1.50	2.42	0.24	0.25	1.24
8 ม.ค. 55	Day 160	<0.03	0.82	0.16			

หมายเหตุ LOD ของ atrazine ในน้ำ เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

LOQ ของ atrazine ในน้ำ เท่ากับ 0.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 3. พิกัดจุดเก็บตัวอย่างน้ำใต้ดิน และค่าเฉลี่ยของดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำใต้ดิน

waypoint	Position	Temp.(°C)	pH	TDS	EC (µS)
waypoint 1	บ้านหนองแวง N 16° 29' 03.7'', E102° 20' 32.4''	29.1	6.9	378	805
waypoint 2	บ้านหว้า N 16° 30' 22.5'', E102° 21' 10.7''	29.3	6.8	326	697
waypoint 3	บ้านหนองกุง N 16° 28' 46.8'', E102° 22' 38.2''	28.9	7.2	423	898
waypoint 4	บ้านนาเปือย N 16° 29' 45.1'', E102° 22' 47.6''	29.3	7.0	596	1,270
waypoint 5	บ้านโนนหินแห่ N 16° 30' 15.6'', E102° 20' 41.4''	28.9	6.9	382	814
waypoint 6	วัดสระทอง บ้านโนนคูณ	28.6	7.4	485	1,032
waypoint 7	โรงน้ำแข็งกิจวารี บ้านกุดกว้าง	28.9	6.8	412	872

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากผลการทดลองหลังการฉีดพ่น atrazine สูตร 90% WG เพื่อกำจัดวัชพืชในแปลงอ้อย พบว่า มีสารตกค้างในดิน น้ำ และสารนี้มีศักยภาพในการปนเปื้อนลงสู่น้ำใต้ดินได้โดยขึ้นกับปริมาณความชื้นในดิน ส่วนในตะกอนพบปริมาณต่ำๆ ในสภาพไร่อ้อยการสลายตัวของ atrazine จะเป็นไปอย่างช้าๆ ดังนั้นการใช้ atrazine ในการกำจัดวัชพืชควรมีความระมัดระวัง และไม่ควรใช้เกิน 3 ครั้ง กรณีการใช้ในพื้นที่ปลูกอ้อยที่มีความลาดเอียง อาจมีการชะละลายสารพิษที่ปนเปื้อนในดินลงสู่แหล่งน้ำบริเวณนั้น ระหว่างการทดลองมีฝนตกตั้งแต่ต้นปีและกลางปีมีพายุนกเต็น จึงอาจเกิดการชะละลายสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในดินจากบริเวณที่มีการใช้สารกำจัดวัชพืชเคลื่อนย้ายลงสู่แหล่งน้ำได้ การศึกษานี้จึงบ่งชี้สภาวะของสิ่งแวดล้อมในขณะนี้ว่าเกิดการปนเปื้อนของสารพิษลงสู่แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง ในสหรัฐอเมริกามีการใช้ atrazine ในปริมาณมากเช่นกัน แต่ถูกควบคุมด้วยการจัดให้อยู่ในสารกลุ่ม Restricted-use pesticide (RUP) กำกับดูแลภายใต้กฎหมายทั้งการจำหน่ายและการใช้โดยผ่านการรับรองในรูปแบบของ the applicator's certification ตั้งแต่ พ.ศ.2533 (ค.ศ.1990) เป็นต้นมา (ATSDR, 2003) สำหรับประเทศไทย ควรมีการเฝ้าระวังการเคลื่อนย้ายเปลี่ยนแปลงของสาร atrazine ในสิ่งแวดล้อม ที่อาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในอนาคตอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเพิ่มมาตรการเข้มงวดต่อการใช้สารกำจัดวัชพืช เช่น การขึ้นทะเบียนผู้ใช้สารกำจัดวัชพืช จัดฝึกอบรม และถ่ายทอดความรู้ด้านการใช้สารกำจัดวัชพืชแก่ร้านค้าจำหน่ายวัตถุมีพิษการเกษตร รวมถึงเกษตรกรผู้ใช้อย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะการใช้ในพื้นที่ผลิตพืชเศรษฐกิจของประเทศ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและมีประโยชน์ต่อการศึกษาด้านผลกระทบของวัตถุมีพิษการเกษตร ถ่ายทอดความรู้แก่นักศึกษา นักวิจัยในหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
3. เป็นข้อมูลของสารกลุ่มเฝ้าระวังของกรมวิชาการเกษตรเพื่อที่ใช้ในการบริหารความเสี่ยง
4. เผยแพร่ในหนังสือรายงานประจำปี และการประชุมวิชาการ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายประสงค์ หวานไข่แก้ว เกษตรกรแปลงปลูกอ้อย ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น ผอ.สาทิตย์ แพพันธ์ขวัญเจริญ ผอ.ส่วนบริหารจัดการน้ำบาดาล สำนักทรัพยากรน้ำบาดาลเขต 4 อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ที่กรุณาให้ข้อมูลของน้ำบาดาลเขตอำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี ที่ได้กรุณาช่วยตรวจตัวอย่างดิน เจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา ที่กรุณาให้คำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ที่ช่วยในการเก็บ สกัด และวิเคราะห์ตัวอย่าง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2548. คำแนะนำการป้องกันกำจัดวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืชปี 2547. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 133 น.

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. 2547. ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 (พ.ศ.2547) เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน. *ใน* ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 121 ตอนพิเศษ ตุลาคม 2547.

ผกาสินี คล้ายมาลา, ปรีชา ฉัตรสันติประภา และ พงศ์ศรี ใบอดุลย์. 2549. การสำรวจสารพิษตกค้างในแม่น้ำบางปะกง. *ใน* ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2549. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร.

มลิสา เวชยานนท์, สิริพร เหลืองสุชนกุล และ ประกิจ จันทร์ติ๊บ. 2552. การสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรม : แม่น้ำเจ้าพระยา. *ใน* ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2552. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร.

มลิสา เวชยานนท์, สิริพร เหลืองสุชนกุล และ ประกิจ จันทร์ติ๊บ. 2553. การสะสมสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรม : ลุ่มน้ำป่าสัก. *ใน* ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร.

สถาบันวิจัยพืชไร่. 2544. เอกสารวิชาการ การป้องกันกำจัดศัตรูอ้อย. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. 104 น.

ATSDR. 2006. Interaction Profile for: Atrazine, Desethylatrazine, Diazinon, Nitrate, and Simazine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Atlanta, Georgia, U.S.A.

Babic, S., Petrovic, M. and Kastelan-Macan., K. 1998. Ultrasonic solvent extraction of Pesticides from soil. Journal of Chromatography Analysis. vol. 823 :1-2, Oct. 1998: 3-9.

Cox.C.2002. The weed killer Atrazine Feminize Frogs.

J. of Pesticide Reform. Vol 22:2 (8-9).

Cox, C. 2002. The Weed Killer Atrazine : Feminize Frogs. Journal of Pesticide Reform. Vol. 22 : 2 (8 - 9).

EPA. 2003. Toxicological Profile for Atrazine. U.S. Department of Health and Human Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. Atlanta, Georgia, U.S.A.

FAO/WHO. 2006. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Pesticide Residues 3 – 8 April 2006. Thirty – eight Session. Hotel Vila Gale, Fortaleza, Brazil.

Hornsby, A.G., R.D.Wauchope, and A.E. Herner. 1995. Pesticide Properties in the Environment. Springer-Verlag, New York, NY. 227 pp.

In house method. 2007. Base on Organochlorine and Organophosphorus Pesticide. General Multiresidue Method. AOAC Official Method 970.52 (1995) กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

NRA. 1997. Review Summary on: The NRA review of Atrazine. The National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. Canberra, Australia.

TNO. 1993. Standard Operation Procedure in Soil and Water. Institute of Nutrition and Food Research (TNO). Zeist. The Netherlands.

WHO.2004 Guidelines for drinking-water Guality. 3rd ed. Vol.1.

Recommendations. Georgia World Health Organization.

WHO. 2004. Guidelines for Drinking-water Quality. 3rd ed. vol. 1. Recommendations. World Health Organization. Geneva. Switzerland.

WHO. 2010. The WHO Recommended Classification of Pesticide by Hazard and Guidelines to Classification. 2009. International Programme on Chemical Safety (IPCS) and Inter-organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

ศึกษาผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งปลูกพืชสวนและพืชไร่ : ชนิด atrazine ในไร่อ้อย

Impact of Triazine Herbicide to Aquatic organism : Atrazine After Sprayed on Sugarcane Plantation

ผกาสินี คล้ายมาลา เอกราช สิทธิมงคล วรวิทย์ สุจิรธรรม

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

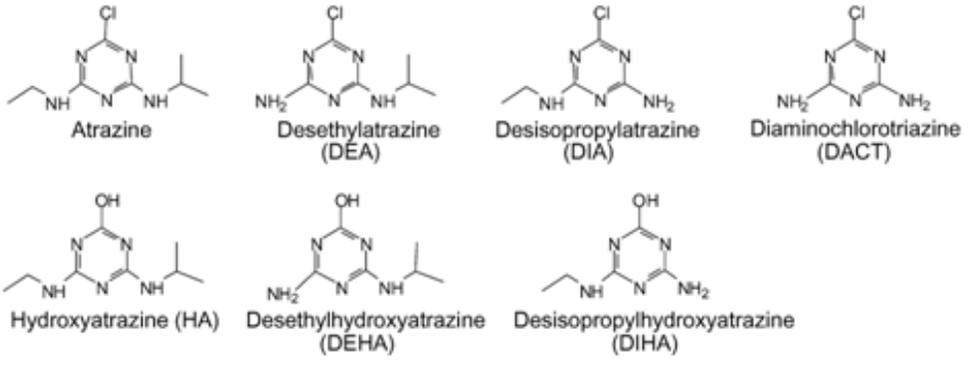
งานวิจัยเพื่อศึกษาผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Triazine ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งปลูกอ้อย ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง ชนิด atrazine รวมทั้งสารเมตาบอไลท์ (metabolites) 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) และ desisopropyl atrazine (DIA) ในตัวอย่างปลาและผักบุ้ง ที่ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณใกล้เคียงกับแปลงทดลอง ในเขตอำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีการปลูกอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนมกราคม 2555 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง atrazine และ metabolites ในตัวอย่างปลาและผักบุ้ง ใช้วิธี Anastassiades *et al*., 2003 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ชนิด Diode Array Detector (DAD) ที่ 220 นาโนเมตร ในปลาได้ค่า recovery เฉลี่ยระหว่าง 82-98% ส่วนในผักบุ้ง ได้ค่า recovery เฉลี่ยระหว่าง 89-91% เมื่อมีการเก็บตัวอย่างปลาและผักบุ้ง ก่อนระยะเวลาที่เกษตรกรมีการฉีดพ่น atrazine เพื่อกำจัดวัชพืชในแปลงอ้อย ตรวจพบสารพิษตกค้างของ atrazine ใช้เป็นค่าอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ ตัวอย่างปลาและผักบุ้งทุกตัวอย่างจะมีการตรวจพบสารพิษตกค้างของ atrazine และบางตัวอย่างมีสารพิษตกค้างของ metabolites ในปริมาณที่ไม่เกินค่ากำหนดให้มีในเนื้อปลา

คำนำ

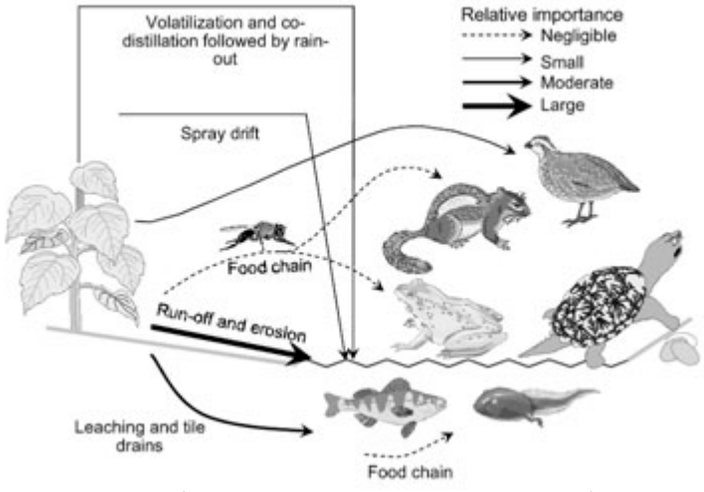
สารกำจัดวัชพืช atrazine ออกฤทธิ์โดยขัดขวางการส่งผ่านอิเลคตรอน ในขบวนการสังเคราะห์แสงของพืช photosystem II complex ใน Chloroplast ยับยั้ง carbondioxide fixation การสร้าง ATP และ $NADPH_2$ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื้อเยื่อและเม็ดสีถูกทำลาย ขาดอาหารจนเหี่ยวแห้งตายไป atrazine มีความเป็นพิษ moderately toxic ถึง slightly toxic กับปลาหลายชนิด ค่อนข้าง less toxic ต่อพวก aquatic invertebrates แต่ highly toxic ต่อ aquatic vascular plants และพวกสาหร่าย (Brassard, C., *et al*., 2003) เมื่อมีการใช้สาร

05-01-54-01-01-01-04-54

กำจัดวัชพืช นอกจากจะกำจัดวัชพืชแล้ว มีโอกาสที่สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มิใช่เป้าหมายในการกำจัดจะได้รับผลกระทบจากการใช้สารนี้ด้วย ดังภาพที่ 2 เป็น pathway การได้รับ atrazine จาก Route of exposure ต่างกันของสิ่งมีชีวิต ในการศึกษาของ syngenta บ่งชี้ว่า atrazine มีผลต่อ endocrine process ในปลากระพงน้ำจืด (largemouth bass) *Micropterus salmoides* เมื่อทดสอบด้วย atrazine (97.1% purity) ความเข้มข้น 25, 35, 50,75 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) นาน 20 วัน เปรียบเทียบกับ commercial grade atrazine (42.1% purity) ความเข้มข้น 100ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อ plasma estradiol ในเพศเมีย ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อ 11-ketotestosterone ในเพศผู้ โดยความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) ไม่เกิดผลกระทบใดๆ (Solomon, K.R., *et al*., 2008) ในสภาพไร่ที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่จะไม่มีแหล่งน้ำที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกัน แต่ในพื้นที่แปลงทดลองในงานวิจัยนี้ ได้เลือกแปลงอ้อยที่มีแหล่งน้ำเป็นบึงขนาดใหญ่อยู่ด้านท้ายแปลง และมีส่วนของพื้นที่โครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ที่อยู่บริเวณใกล้กัน ในระหว่างการทดลองมีฝนตกตั้งแต่ต้นปีและกลางปีมีพายุนกเต็น จึงอาจเกิดการชะล้างสารพิษจากที่ปนเปื้อนอยู่ในดินจากบริเวณที่มีการใช้สารกำจัดวัชพืชเคลื่อนย้ายลงสู่แหล่งน้ำได้อีกทางหนึ่ง



ภาพที่ 1. โครงสร้างของ atrazine และ metabolites [ที่มา: Solomon, K.R., *et al*., (2008)]



ภาพที่ 2. Route of Exposure สู่สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ของสาร atrazine [ที่มา: Solomon, K.R., *et al*., (2008)]

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างปลา ได้แก่ กระชอนตักตัวอย่างปลา, ถังพลาสติกใส่ปลา และถุงพลาสติก
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง ได้แก่
   2.1 เครื่องมือตรวจวัดคุณภาพน้ำ
   2.2 เครื่องที่มีระบบระบุตำแหน่งบนพื้นโลก (Global Positioning System; GPS)
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
   3.1 เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel, Erlenmeyer flask, cylinder, beaker, round bottom flask, filtering funnel และ pipette เป็นต้น
   3.2 เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐาน ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette
   3.3 เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัด การเตรียมสารมาตรฐาน และปรับปริมาตรตัวอย่าง เช่น acetonitrile, ethyl acetate ชนิด analytical grade (AR) และ pesticide grade (PR)
   3.4 สารพิษมาตรฐาน atrazine ความบริสุทธิ์ 98.50% รวมทั้งสารเมตาบอไลท์ (metabolites) 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) ความบริสุทธิ์ 99.5% และ desisopropyl atrazine (DIA) ความบริสุทธิ์ 99.0%
   3.5 เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่งหยาบ, เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance), เครื่องปั่นตกตะกอน ชนิด Centrifuge, เครื่องปั่นชนิด homogenizer, เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator, เครื่องลดปริมาตรชนิด nitrogen evaporator และเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด Diode Array Detector (DAD)

วิธีดำเนินการ

1. **การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง**
   1.1 การเตรียมแปลงทดลอง จากการสำรวจแปลงในพื้นที่ต่างๆ เลือกแปลงอ้อยที่มีความเหมาะสมสำหรับการทดลองที่ ตำบลกุดกว้าง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น ขนาด 16 ไร่ เริ่มปลูกอ้อยในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2554 และเก็บเกี่ยวผลผลิตอ้อย เมื่ออายุประมาณ 12-13 เดือน
   1.2 การเก็บตัวอย่างปลาและพืชน้ำคือ ผักบุ้ง ก่อนเริ่มการฉีดพ่น เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก
   1.3 การฉีดพ่นวัตถุมีพิษ การปลูกอ้อยและดูแลรักษาตามแบบของเกษตรกร
2. **การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ**
   2.1 สกัดสารพิษตกค้างของ atrazine ในตัวอย่างปลาและผักบุ้ง ใช้วิธี Anastassiades, *et al*., (2003)
   2.2 การคำนวณปริมาณสารพิษตกค้าง ในตัวอย่างปลาและผักบุ้ง ใช้สูตร

$$C = \frac{(R_x - B_0)}{A_0} \times \frac{V}{W} \times D$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง (ปลา พืชน้ำ หน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

R_x คือ Response (area/height) ของสารในตัวอย่าง

B_0 คือ intercept ของ calibration curve

A_0 คือ slope ของ calibration curve

V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) หรือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

D คือ dilution factor

2.3 ประสิทธิภาพของวิธีการสกัด (% Recovery) ตามสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_{fortified}}$$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน Fortified sample

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน Sample blank

$C_{fortified}$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงใน Fortified sample

2.4 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด Diode Array Detector (DAD) ที่ 220 นาโนเมตร วิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผลการทดลอง

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนมกราคม 2555

สถานที่ดำเนินการ

1. แหล่งน้ำในบริเวณอำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการเก็บตัวอย่างปลาและผักบุ้ง เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และเป็นใช้เป็นค่าอ้างอิงก่อนการฉีดพ่น atrazine เพื่อกำจัดวัชพืชในแปลงอ้อย ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างของ atrazine ทั้งในตัวอย่างปลาและผักบุ้ง การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง atrazine ในตัวอย่างปลาและผักบุ้ง โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด Diode Array Detector (DAD) ในปลาที่ความเข้มข้น 0.10 - 0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า recovery เฉลี่ยระหว่าง 82-98% ส่วนในผักบุ้งที่ความเข้มข้น 0.10 - 0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า recovery เฉลี่ยระหว่าง 89-91%

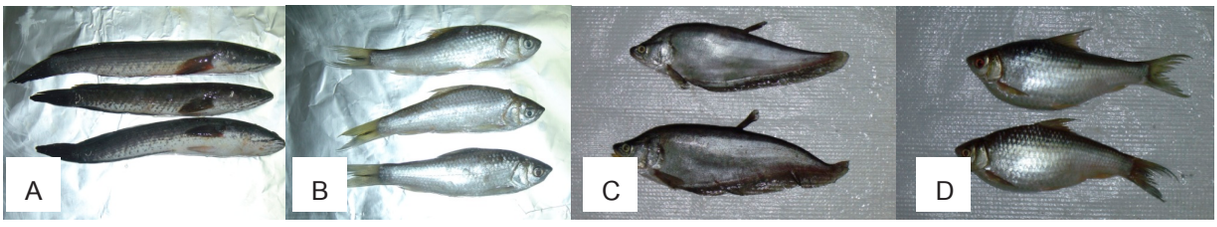
เมื่ออ้อยเริ่มมีวัชพืชขึ้นแซมกระจายทั่วไปในแปลง เนื่องจากมีฝนตกอ้อยกำลังเจริญแตกใบ ยังไม่สูงมากนัก สภาพดินมีความชื้นเหมาะสม เกษตรกรจึงฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG ครั้งที่ 1 ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ถังแกลลอนขนาด 200 ลิตร รวมใช้ไป 4 ถัง โดยมีผู้ฉีดพ่น 4 คน ด้วยเครื่องฉีดพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง ในขณะฉีดพ่นมีกระแสลมพัดจากทิศเหนือไปทิศใต้ หลังการฉีดพ่น 0 วัน ได้สุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่โครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ และแหล่งน้ำบริเวณ อำเภอหนองเรือ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด DAD ในตัวอย่างปลา 4 ชนิด ได้แก่ ปลาสร้อย, ปลากระสูบ, ปลากระดี่ และปลาแขยง พบสาร atrazine เฉลี่ย ระหว่าง 0.46-0.51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย ระหว่าง 0-0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย ระหว่าง 0.74-0.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจไม่พบสารเมตาบอไลท์ทั้ง

2 ชนิด หลังการฉีดพ่น 30 วัน ได้ตัวอย่างปลา 2 ชนิด ได้แก่ ปลาช่อน และปลาแขยง พบสาร atrazine เฉลี่ย ระหว่าง 0.50-0.76 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) ตรวจไม่พบ desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย ระหว่าง 0.74-0.54 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจไม่พบสารเมตาบอไลท์ทั้ง 2 ชนิด

การฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG ครั้งที่ 2 ในอัตรา 900 กรัมต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ถังแกลลอนขนาด 200 ลิตร ในอัตราเดียวกัน รวมใช้ไป 4 ถังโดยมีผู้ฉีดพ่น 4 คน ด้วยเครื่องฉีดพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง ในขณะฉีดพ่นมีกระแสลมสงบ หลังการฉีดพ่น 0 วัน ได้สุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่โครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ และแหล่งน้ำบริเวณ อำเภอหนองเรือ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด DAD ในตัวอย่างปลา 3 ชนิด ได้แก่ ปลากระสูบ, ปลาตะเพียน และปลานาง พบสาร atrazine เฉลี่ย ระหว่าง 0.34-0.36 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย ระหว่าง 0.16-0.95 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจไม่พบ desisopropyl atrazine (DIA) ในตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.54 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.99 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังการฉีดพ่น 34 วัน ได้ตัวอย่างปลา 1 ชนิด ได้แก่ ปลากระสูบ พบสาร atrazine เฉลี่ย 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจพบสารเมตาบอไลท์ desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.93 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไม่พบสารเมตาบอไลท์

สำหรับการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine 90% WG ครั้งที่ 3 ในอัตรา 900 กรัม ต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ถังแกลลอนขนาด 200 ลิตร ในอัตราเดียวกัน รวมใช้ไป 3 ถังโดยมีผู้ฉีดพ่น 4 คน ด้วยเครื่องฉีดพ่นแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง ในขณะฉีดพ่นมีกระแสลมจากทิศใต้ไปทิศเหนือ หลังการฉีดพ่น 0 วัน ได้สุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่โครงการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำบ้านหนองไผ่ และแหล่งน้ำบริเวณอำเภอหนองเรือ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ชนิด DAD ในตัวอย่างปลา 1 ชนิด ได้แก่ ปลากระสูบ พบสาร atrazine เฉลี่ย ระหว่าง 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ ได้แก่ desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.93 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังการฉีดพ่น 30 วัน ได้ตัวอย่างปลา 8 ชนิด ได้แก่ ปลาตอง, ปลากด, ปลาบู่, ปลาสร้อย, ปลาอีไท้, ปลาแขยง, ปลาเซียม และปลานาง พบสาร atrazine เฉลี่ย 0.12-0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย ระหว่าง 0-0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ยระหว่าง 0-3.74 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังการฉีดพ่น 160 วัน ไม่มีตัวอย่างปลา ตัวอย่างผักบุ้งพบสาร atrazine เฉลี่ย 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสารเมตาบอไลท์ 2 ชนิด ได้แก่ desisopropyl atrazine (DIA) เฉลี่ย 0.85 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม desethyl atrazine (DEA) เฉลี่ย 0.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ในการเก็บตัวอย่างปลาและผักบุ้งจากพื้นที่แหล่งน้ำธรรมชาติ ที่อยู่ในบริเวณแหล่งปลูกอ้อยขนาดใหญ่ พบว่าการปนเปื้อนของสาร atrazine มีความสัมพันธ์กับช่วงเวลาที่เกษตรกรมีการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช คือช่วงต้นฤดูปลูกอ้อยและฤดูฝน



ภาพที่ 3. ปลาบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ A.ปลาช่อน B.ปลาสร้อย C.ปลาตอง และ D.ปลาตะเพียน

ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine และ metabolites ในปลาและผักบุ้ง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, mg/kg) หลังการฉีดพ่นในอ้อย

วันที่เก็บตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษ (mg/kg)					
	ปลา			ผักบุ้ง		
	atrazine	DIA	DEA	atrazine	DIA	DEA
4 พ.ย. 53 Reference						
C1 ปลากระดี่ (*Trichogaster microlepis*)	0.29	0	0	0.27	0	0
C2 ปลาหมอ (*Anabas testudineus*)	0.29	0	0			
C3 ปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*)	0.36	0	0			
C4 ปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*)	0.06	0	0			
11 ม.ค. 54 Reference						
C1 ปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*)	0	0	0	0	0	0
C2 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)	0	0	0			
C3 ปลาชิว (*Luciosoma bleekeri*)	0	0	0			
ฉีด atrazine ครั้งที่ 1						
24 ก.พ. 54 Day 0						
F1 ปลาสร้อย (*Henicorhynchus siamese*)	0.47	0.74	0	0.27	0	0
F2 ปลากระสูบ (*Hampala dispar* Smith)	0.50	0.79	0			
F3 ปลากระดี่ (*Trichogaster microlepis*)	0.46	0.75	0.38			
F4 ปลาแขยง (*Mystus wolffii*)	0.51	0.27	0.17			
26 มี.ค. 54 Day 30						
F1 ปลาแขยง (*Mystus wolffii*)	0.76	0.74	0	0.27	0	0
F2 ปลาช่อน (*Channa striatus*)	0.50	0.43	0			
ฉีด atrazine ครั้งที่ 2						

ตารางที่ 2. (ต่อ) ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine และ metabolites ในปลาและผักบุ้ง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, mg/kg) หลังการฉีดพ่นในอ้อย

วันที่เก็บตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยปริมาณสารพิษ (mg/kg)					
	ปลา			ผักบุ้ง		
	atrazine	DIA	DEA	atrazine	DIA	DEA
20 พ.ค. 54 Day 0						
F1 ปลากระสูบ (*Hampala dispar* Smith)	0.36	0	0.95	0.40	0.99	0.54
F2 ปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*)	0.34	0	0.16			
F3 ปลานาง (*Phalacronotus apogon*)	0.35	0	0.24			
22 มิ.ย. 54 Day 34						
F1 ปลากระสูบ (*Hampala dispar* Smith)	0.30	0	0	0.26	0	0
30 ก.ค. 54 Day 60				0.23	0.29	0.27
ฉีด atrazine ครั้งที่ 3						
2 ส.ค. 54 Day 0						
F1 ปลากระสูบ (*Hampala dispar* Smith)	0.25	0.93	0	0.23	0.29	0.27
30 ส.ค. 54 Day 28						
F1 ปลาตอง (*Notopterus notopterus*)	0.20	0.78	0.30	0.21	0.68	0.08
F2 ปลากด (*Hemibagrus nemurus*)	0.18	0.46	0			
F3 ปลาบู่ (Oxyeleotris marmoratus)	0.17	0	0			
F4 ปลาสร้อย (*Henicorhynchus siamese*)	0.19	0.20	0			
F5 ปลาอีไท้ (Osteochilus hasselti)	0.20	0.82	0			
F6 ปลาแขยง (*Mystus wolffii*)	0.17	0.74	0			
F7 ปลาเซียม (Ompok Krattensis)	0.20	0.19	0			
F8 ปลานาง (*Phalacronotus apogon*)	0.12	0.07	0			
8 ม.ค. 55 Day 160	NC	NC	NC	0.07	0.85	0.29

หมายเหตุ NC คือ Not collect sample ไม่เก็บตัวอย่าง

atrazine เป็นสารที่ low oral, dermal toxicity และ very low inhalation toxicity, slightly eye irritation ในกระต่าย, skin sensitizer ในหนูตะเภา (guinea pig) แต่ไม่ทำให้เกิด skin sensitization ในมนุษย์ และไม่เป็น skin irritant ในหนูและกระต่าย จากการศึกษา repeat dose ในสัตว์ทดลอง พบว่า atrazine ทำให้สัตว์ทดลอง มีน้ำหนักลดลง (reduce body weight) ลดการกินอาหาร (reduce food intake) ทั้งในเพศผู้ (male) และเพศเมีย (female) รวมทั้งเพิ่มอาการของเนื้องอกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมีย เนื่องจากมีความต่างกันของสรีรวิทยาและต่อมไร้ท่อในมนุษย์และสัตว์ฟันแทะ การเลือกค่า NOEL (No Observe effect level) ที่ต่ำที่สุดสำหรับการประเมินความเสี่ยงจากการใช้สารและสุขภาพของผู้ใช้ โดยคำนึงถึงค่าทางพิษวิทยา เช่น short-term repeat dose, sub chronic, chronic, reproductive and development studies โดยได้ค่า NOAEL เท่ากับ 0.5

มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (mg/kg/day) ซึ่งขึ้นกับการเกิดเนื้องอกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูเพศเมีย เมื่อมีการให้ในปริมาณ 2.8 - 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน (mg/kg bw/d) ใน 2 - year rat dietary study เพื่อนำค่า NOAEL ไปคำนวณหาค่า ADI (Acceptable diary intake) โดยค่า NOEL ที่เลือกมีความสัมพันธ์กับการรับสัมผัสจากการใช้สาร (Occupational exposure) สำหรับค่า ADI (Acceptable Daily Intake) ที่จะนำมาใช้ในการคำนวณผลกระทบต่อสุขภาพจากการรับสัมผัสทางการบริโภคปลาและผักบุ้งที่มีการปนเปื้อนสาร atrazine เลือกใช้ค่า ADI เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (mg/kg bw) (JMPR, 2007) เมื่อพิจารณาจากข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ที่พบสูงสุดในปลาแขยง (*Mystus wolffii*) 0.76 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณสารพิษตกค้าง atrazine ที่พบสูงสุดในผักบุ้ง 0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถนำไปประเมินความเสี่ยงจากการบริโภคปลาสุกและผักบุ้งดิบในแต่ละวันของผู้บริโภคเปรียบเทียบกับค่า ARfD (Acute Reference dose) หรือ ADI (Acceptable Daily Intake) ที่มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง กำหนดค่า ARfD ของ atrazine เท่ากับ 0.100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (IUPAC. 2011) โดยประเมินการได้รับสัมผัส จากสมการพื้นฐาน

$$\text{การได้รับสัมผัสทางการบริโภค (dietary intake)} = \frac{\text{ระดับการปนเปื้อนสารพิษ x ปริมาณการบริโภค}}{\text{น้ำหนักตัวผู้บริโภค}}$$

ในผู้บริโภคคนไทยน้ำหนักตัวเฉลี่ย 53.5 กิโลกรัม หากประเมินการบริโภคปลาสุกและผักบุ้งดิบที่พิจารณาจากการบริโภคระดับสูงที่ 97.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าเท่ากับ 62.40 และ 10.00 กรัมต่อคนต่อวัน (มกอช., 2549) จะทำให้ได้ผลการคำนวณค่าการได้รับสารพิษ (intake) สูงสุด เมื่อคำนวณแล้วพบว่า ผู้บริโภคปลาสุก จะได้รับสารพิษ 0.886 กรัมต่อคนต่อวัน สูงกว่าค่า RfD และ ARfD จัดว่ามีความเสี่ยงในการบริโภค และ ผักบุ้งดิบจะได้รับสารพิษ 0.075 กรัมต่อคนต่อวัน สูงกว่าค่า RfD แต่ต่ำกว่าค่า ARfD จัดว่ามีความเสี่ยงยอมรับได้ ถ้าเปรียบเทียบกับค่า ARfD (Acute Reference dose) ที่มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง กำหนดค่า ARfD ของ atrazine เท่ากับ 0.100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (IUPAC. 2011) ค่า Maximum Residue Level (MRL) ในอ้อย เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มกอช., 2551) และ EU MRLกำหนดไว้ในผักและผลไม้ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อพิจารณาค่า bio-concentration factor (BCF) ของ atrazine เท่ากับ 4.3 ซึ่งจัดว่ามีศักยภาพต่ำที่จะสะสมในสิ่งมีชีวิต (Low potential) และค่า Bioaccumulation potential อยู่ในระดับต่ำ (Low) ข้อมูลที่มีในขณะนี้ยังไม่เพียงพอว่า atrazine มีศักยภาพสะสมในร่างกายหรือทำให้ในมนุษย์และสัตว์เป็นมะเร็งหรือไม่ แต่หน่วยงาน A Cancer Assessment Review Committee (CARC) ของสหรัฐฯที่มี Environmental Protection Agency (EPA) ให้การสนับสนุนการวิจัย ระบุว่าไม่น่าจะก่อมะเร็ง และ The International Agency for Research on Cancer (IARC) จัด atrazine ไว้ใน Group 3 ไม่ก่อมะเร็งในมนุษย์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากผลการทดลองหลังการฉีดพ่น atrazine สูตร 90% WG ในไร่อ้อย สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มิใช่เป้าหมายในการกำจัดอาจได้รับผลกระทบจากสารนี้ จากการศึกษาในต่างประเทศมีข้อมูลว่า atrazine มีศักยภาพต่ำต่อการสะสมในสิ่งมีชีวิต แต่จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของระบบฮอร์โมนร่างกายสิ่งมีชีวิตได้ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส กรณีการใช้ในพื้นที่ปลูกอ้อยที่มีความลาดเอียง อาจมีการชะละลายสารพิษที่ปนเปื้อนในดินลงสู่แหล่งน้ำบริเวณนั้น การศึกษานี้จึงบ่งชี้สภาวะของสิ่งแวดล้อมในขณะนี้ว่าเกิดการปนเปื้อนของสารพิษลงสู่แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง ควรระวังในการบริโภคปลาที่มีสารพิษตกค้าง เนื่องจากมีความเสี่ยงในการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย สหรัฐอเมริกามีการใช้ atrazine ในปริมาณมากเช่นกัน แต่ถูกควบคุมด้วยการจัดให้อยู่ในสารกลุ่ม restricted-use pesticide (RUP) กำกับดูแลภายใต้กฎหมายทั้งการจำหน่ายและการใช้โดยผ่านการรับรองในรูปแบบของ the applicator's certification ตั้งแต่ พ.ศ. 2533 (ค.ศ.1990) (ATSDR, 2003) ประเทศไทยจึงควรมีการเฝ้าระวังการเคลื่อนย้ายของ atrazine ในสิ่งแวดล้อม ที่อาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในอนาคตอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเพิ่มมาตรการเข้มงวดการใช้สารกำจัดวัชพืช เช่น การขึ้นทะเบียนผู้ใช้สารกำจัดวัชพืช ฝึกอบรม และถ่ายทอดความรู้ด้านการใช้สารกำจัดวัชพืชแก่ร้านค้าจำหน่ายวัตถุมีพิษการเกษตร รวมถึงเกษตรกรผู้ใช้อย่างเป็นระบบ โดยเฉพาะการใช้ในพื้นที่ผลิตพืชเศรษฐกิจของประเทศ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำที่มิใช่เป้าหมายในการกำจัด
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและมีประโยชน์ต่อการศึกษาด้านผลกระทบของวัตถุมีพิษการเกษตร ถ่ายทอดความรู้แก่นักศึกษา นักวิจัยในหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
3. เป็นข้อมูลของสารกลุ่มเฝ้าระวังของกรมวิชาการเกษตรเพื่อที่ใช้ในการบริหารความเสี่ยง
4. เผยแพร่ในหนังสือรายงานประจำปี และการประชุมวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

มกอช. 2549. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย Food Consumption Data for Thailand ปี 2549. สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มกอช. 2551. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 9002-2551: สารพิษตกค้าง : ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์. www.acfs.go.th [พ.ย. 2552].

Anastassiades, M., S.L. Lehotay, D. Stajbaher, and F.J. Schenck. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/ Partitioning and Dispersive solid-phase Extraction for Determination of Pesticide Residues in Produce. J..AOAC. 86:2, 412-431.

ATSDR. 2003. Toxicological Profile for Atrazine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Atlanta, Georgia, U.S.A.

ATSDR. 2006. Interaction Profile for: Atrazine, Desethylatrazine, Diazinon, Nitrate, and Simazine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Division of Toxicology /Toxicology Information Branch. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Atlanta, Georgia, U.S.A.

Brassard, C., Gill, L., Stavola A., Lin, J. and Turner, L. 2003. Atrazine Analysis of Risks Endangered and Threatened Salmon and Steelhead Trout. Policy and Regulatory Services Branch and Environmental Field Branch Field and External Affairs Division and Environmental Fate and effects Division.

IUPAC. 2011. Agrochemical Information : Atrazine (Ref. G 30027) http://www.sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/43.htm

JMPR. 2007. Pesticide Residue in Food : 2007. Toxicological Evaluations. Sponsored Jointly by FAO and WHO, with the Support of the International Progamme on Chemical Safety/Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residue in Food and the Environment and WHO Core Assessment Group. Geneva, Switzerland. 18-27nSeptember 2007.

Solomon, Keith R., Carr, James A., Du Preez, Louis H., Giesy, John P., Kendall, Ronald J., Smith, Ernest E. and Van der Kraak, Glen J. 2008. Effect of Atrazine on fish, Amphibians and Aquatic Reptiles: A Critical Review, Critical Reviews in Toxicology, 38: 9, 721-772.

การสะสมและการแพร่กระจายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมแหล่งปลูกส้มพื้นที่สูงภาคเหนือ

Accumulation and Distribution of Pesticide Residues in Tangerine Orchard Environment in Northern Upland Agricultural Area

ภิญญา จุลินทร วิภา ตั้งนิพนธ์ ประกิจ จันทร์ติ๊บ เอกราช สิทธิมงคล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ศึกษาการสะสมและการแพร่กระจายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมพื้นที่สูงภาคเหนือ ในแหล่งปลูกส้มในเขตอำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และบริเวณแหล่งน้ำใกล้เคียง ระหว่างเดือนกันยายน 2553 ถึงเดือนกรกฎาคม 2554 สำรวจและเก็บตัวอย่างทุก 3 เดือน รวม 4 ครั้ง เป็นตัวอย่างส้ม 16 ตัวอย่าง น้ำ 73 ตัวอย่าง และดิน 59 ตัวอย่าง เพื่อหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่สะสมอยู่ในสวนส้ม และแพร่กระจายจากสวนส้มลงสู่แหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง โดยตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดแมลง 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Organochlorines, Organophosphorus, Pyrethroids, Carbamates และ Nitroguanidine nicotinoid สารป้องกันกำจัดโรคพืช 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Benzimidazole และกลุ่ม Acylalanine และสารกำจัดวัชพืชชนิด paraquat

ผลการวิเคราะห์พบสารพิษตกค้างในส้มทั้ง 16 ตัวอย่าง เกินค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRLs) ของสหภาพยุโรป (EU) ทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของสารพิษที่เกินค่า MRLs ได้แก่ carbaryl, carbofuran, carbendazim, cypermethrin, ethion, fenitrothion, malathion, methomyl profenofos, triazophos และ 3-hydroxy carbofuran มีปริมาณระหว่าง 0.018 ถึง 5.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบสารพิษตกค้างในดินทุกตัวอย่างคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด ชนิดของสารพิษที่พบมี 26 ชนิด ปริมาณที่พบมีค่าระหว่าง <0.01 ถึง 26.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบกลุ่ม Organophosphorus มากที่สุดคิดเป็น 98.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณที่พบมีค่า <0.01 ถึง 4.72 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตัวอย่างน้ำพบสารพิษตกค้างคิดเป็น 98.6 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด ชนิดของพิษที่พบมี 25 ชนิด ปริมาณที่พบมีค่าระหว่าง <0.01 ถึง 144.6 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยพบ paraquat มากถึงร้อยละ 42.5 มีปริมาณ 0.73 ถึง 144.60 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนสารพิษตกค้างที่พบในน้ำต่ำกว่าค่าความเป็นพิษต่อปลา และสัตว์น้ำ (Median Lethal Concentration, LC_{50}) จึงปลอดภัยต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค

คำนำ

ส้มเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในภาคเกษตรกรรม ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกส้มเปลือกล่อนประมาณ 350,000 ไร่ เป็นพื้นที่การผลิตในภาคเหนือตอนบน 45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ปลูกมากที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ สำหรับจังหวัดเชียงใหม่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด ประมาณ 100,000 ไร่ มีเกษตรกรผู้ปลูกมากกว่า 5,000 ราย เป็นเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ GAP มากกว่า 3,800 ราย มูลค่าการผลิตประมาณ 4,500 ล้านบาท ผลผลิตรวมปีละ 8 แสนตัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการปลูกเพื่อการบริโภคภายในประเทศถึง 99 เปอร์เซ็นต์

พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่บริเวณลำน้ำฝาง ในเขตอำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ มีลักษณะเป็นที่ราบลุ่ม มีภูเขาล้อมรอบ มีปริมาณฝนตกมาก อากาศเย็นชื้น เหมาะสำหรับการปลูกส้มมากที่สุด ปัจจุบันเป็นแหล่งปลูกขนาดใหญ่ของประเทศไทย สำหรับส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคมากที่สุดพันธุ์หนึ่งนั้น มีพื้นที่ปลูกมาก และมีคุณภาพของผลผลิตดีที่สุดอยู่ที่อำเภอ ฝาง แม่อาย และไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ แต่เนื่องจากในแต่ละปี มีการผลิตส้มหลายรุ่น เพื่อให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดปี ทำให้ต้นส้มถูกกระตุ้นให้มีการแตกยอดอ่อนหลายรุ่น จึงมีแมลงศัตรูส้มเข้ามาทำลายหลายชนิดในทุกระยะการเจริญเติบโต ศัตรูที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยไฟพริก ไรแดงอาฟริกัน เพลี้ยไก่แจ้ส้ม ซึ่งเป็นแมลงพาหะ นำเชื้อ bacterial like ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง (โรคใบเหลืองต้นโทรม) อาการใบอ่อน มีสีเหลือง ใบเล็กชี้ตั้งขึ้น การแตกยอดใหม่ลดลง เกิดการตายแห้งจากปลายกิ่ง ผลเล็กร่วง ต้นทรุดโทรม และตายในที่สุด โรคสนิมส้ม ทำให้เปลือกผลส้มมีตำหนิผลผลิตเสียหาย นอกจากนี้ยังมีโรครากเน่า และโคนเน่า เนื่องจากมีการระบาดของศัตรูพืชตลอดทั้งปี เกษตรกรจึงต้องใช้สารป้องกันกำจัดแมลงและไรในปริมาณมากและบ่อยครั้ง จึงเกิดปัญหาติดตามมาหลายประการ เช่นแมลงศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมี การทำลายศัตรูธรรมชาติที่มีประโยชน์ ทำให้เกิดการระบาดเพิ่มขึ้นของศัตรูพืชชนิดใหม่ เกิดการสะสมสารพิษในสภาพแวดล้อมและในผลผลิต นอกจากนั้นลักษณะของภูมิประเทศของอำเภอฝางและแม่อายเป็นพื้นที่แอ่งกระทะ เมื่อเกษตรกรฉีดพ่นสารเคมีแต่ละครั้ง จะทำให้กลิ่นสารเคมีอบอวลอยู่เป็นเวลานาน ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของราษฎรจากการได้รับกลิ่นหรือสัมผัสสารเคมีต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทั้งหมดนี้นำไปสู่ปัญหาความขัดแย้งระหว่างราษฎรที่ได้รับผลกระทบจากการฉีดพ่นสารเคมีกับผู้ประกอบการสวนส้ม

กลุ่มอนุรักษ์ลุ่มน้ำฝาง 3 อำเภอ คือ อำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ จึงร้องเรียนต่อคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนแห่งชาติถึงความเดือดร้อนจากการประกอบกิจการสวนส้ม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มอบหมายให้กรมวิชาการเกษตรโดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรเข้าตรวจสอบ ติดตามปัญหาผลกระทบการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแหล่งปลูกส้ม ที่เกิดแก่ราษฎร โดยเฉพาะในเขตอำเภอฝางและแม่อาย ดำเนินการศึกษาข้อมูลการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสวนส้ม การสะสมและปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งปลูกส้ม และแหล่งน้ำสาธารณะในบริเวณใกล้เคียง ผลกระทบจากการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม อยู่ในระดับที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมหรือไม่ เพื่อจะได้ดำเนินการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นให้ลดน้อยลง หรือหมดไป ช่วยให้เขตเกษตรกรรมใหญ่ของประเทศ สามารถอยู่ร่วมกับชุมชนในท้องถิ่นได้อย่างยั่งยืนและปลอดภัย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว

เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel, beaker, cylinder, Erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for auto sampler, pipette, ขวดปริมาตร และ glass funnel เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน ได้แก่ auto pipette volumetric pipette และ volumetric flask class A

2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ

2.1 สารเคมีชนิด analytical grade สำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่าง ได้แก่ silica gel, SPE C18 500 มิลลิกรัม ขนาด 6 มิลลิลิตร, SPE florisil 500 มิลลิกรัม ขนาด 6 มิลลิลิตร, anhydrous sodium sulfate (anh. Na_2SO_4), acetone, dichloromethane, ethyl acetate และ hexane

2.2 สารเคมีชนิด pesticide grade และ HPLC grade ได้แก่ acetone, acetonitrile, ethyl acetate, hexane, water, isopropanol, methanol และ iso-octane

2.3 สารพิษมาตรฐาน pesticide grade

2.3.1 กลุ่ม Organochlorines 21 ชนิด ประกอบด้วย aldrin, alpha BHC, alpha endosulfan, beta BHC, beta endosulfan, cis chlordane, dicofol, dieldrin, endosulfan sulfate, endrin, gamma BHC, heptachlor, heptachlor epoxide, o,p'-DDE, o,p'-DDT, o,p'-TDE, p,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'-TDE, tetradifon และ trans chlordane

2.3.2 กลุ่ม Organophosphorus 21 ชนิด ประกอบด้วย azinphos ethyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, diazinon, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, ethoprophos, fenthion, fenitrothion, malathion, methidathion, monocrotophos, parathion methyl, pirimiphos methyl, profenofos, triazophos, methamidophos, omethoate และ phosalone

2.3.3 กลุ่ม Pyrethroids 7 ชนิด ประกอบด้วย bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, lambda cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate และ permethrin

2.3.4 กลุ่ม Carbamates 11 ชนิด ประกอบด้วย 3-keto carbofuran, 3-OH carbofuran, carbaryl, carbofuran, fenobucarb, methomyl, metolcarb, isoprocarb, methiocarb, iprodione และ promecarb

2.3.5 กลุ่ม Bipyridilium 1 ชนิด ประกอบด้วย paraquat

2.3.6 กลุ่ม Benzimidazole 1 ชนิด ประกอบด้วย carbendazim

2.3.7 กลุ่ม Acylalanine 1 ชนิด ประกอบด้วย metalaxyl

2.3.8 กลุ่ม Nitroguanidine nicotinoid 1 ชนิด ประกอบด้วย imidacloprid

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 5 ตำแหน่ง เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด separatory funnel shaker เครื่อง shaker Homogenizer เครื่อง food processor เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator เครื่องลดปริมาตรชนิด nitrogen evaporator ตู้อบสารเคมี เครื่องทำสุญญากาศ (vacuum pump) ตู้ดูดความชื้น (desiccator) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ตู้เย็นอุณหภูมิ 5 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส ตู้แช่ (Freezer) อุณหภูมิ – 20 $\pm$ 5 องศาเซลเซียส และเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ของบริษัท Agilent Technology รุ่น HP 6890 พร้อมหัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) และ Electron Capture Detector (ECD) และเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Agilent Technology รุ่น 1100 Series และเครื่อง Spectrophotometer ของบริษัท Perkin Elmer รุ่น EZ 201

4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

ได้แก่ soil auger แครงทำด้วย stainless steel และขวดพลาสติกชนิด polypropylene พร้อมฝาปิดสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ ช้อนทำด้วย stainless steel และถุงพลาสติกพร้อมยางรัด สำหรับเก็บตัวอย่างดิน และส้ม ถังแช่เย็นรักษาสภาพตัวอย่างในระหว่างขนส่ง

วิธีการ

1. การสำรวจพื้นที่และกำหนดจุดเก็บ

1.1 สำรวจพื้นที่เกษตรกรรมการทำสวนส้มของเกษตรกรของอำเภอฝาง และอำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ โดยศึกษาข้อมูลจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ (ฝาง) และสอบถามข้อมูลการใช้สารพิษในสวนส้มเกษตรกร กำหนดจุดเก็บตัวอย่างโดยเลือกพื้นที่ที่ทำการเกษตรกรรมการทำสวนส้ม โดยใช้ระบบกำหนดตำแหน่งพื้นโลกด้วยดาวเทียม (Global Positioning System; GPS) ในปี 2553-2554 ได้สำรวจสวนส้มรวมทั้งสิ้น 20 จุด ได้แก่

1.1.1 อำเภอฝาง 8 จุด ได้แก่ ตำบลม่อนปิ่น 7 จุด และตำบลเวียง 1 จุด

1.1.2 อำเภอแม่อาย 12 จุด ได้แก่ ตำบลแม่นาวาง 8 จุด ตำบลแม่สาว 1 จุด ตำบลท่าตอน 3 จุด

1.2 สำรวจเส้นทางไหลของแม่น้ำฝางตลอดทั้งสายโดยเริ่มจากต้นน้ำมาวในอำเภอฝาง ไหลผ่านแหล่งเกษตรกรรมของอำเภอฝาง และอำเภอแม่อาย ลงสู่แม่น้ำกก เพื่อกำหนดจุดเก็บตัวอย่างน้ำ รวมทั้งสิ้น 5 จุด ได้แก่

1.2.1 อำเภอฝาง 1 จุด ได้แก่ ตำบลม่อนปิ่น

1.2.2 อำเภอแม่อาย 4 จุด ได้แก่ ตำบลแม่นาวาง 3 จุด และตำบลท่าตอน 1 จุด

2. ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และส้ม

เก็บตัวอย่างน้ำและดินทุกๆ 3 เดือน ระหว่างเดือนกันยายน 2553 ถึงกรกฎาคม 2554 รวม 4 ครั้ง ครั้งแรกเป็นช่วงฤดูฝน เดือนกันยายน 2553 ครั้งที่ 2 ช่วงฤดูหนาว เดือนธันวาคม 2553 ครั้งที่ 3 ช่วงฤดูหนาว เดือนกุมภาพันธ์ 2554 และครั้งที่ 4 ช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม 2554 ตัวอย่างส้มสุ่มเก็บช่วงเดียว เดือนธันวาคม เพียง 1 ครั้ง ได้ตัวอย่างน้ำ 73 ตัวอย่าง ดิน 59 ตัวอย่าง และส้ม 16 ตัวอย่าง

3. การเก็บ และเตรียมตัวอย่าง

3.1 ตัวอย่างน้ำ กำหนดจุดสำหรับสุ่มเก็บ ใช้แครงสุ่มตักตัวอย่างน้ำให้ทั่วพื้นที่กำหนด ให้เต็มขวดปริมาตร 4 ลิตร ถ้าน้ำมีลักษณะใสสะอาด สามารถนำมาสกัดได้ทันที แต่ถ้ามีความขุ่นหรือสกปรก ให้กรอง เพื่อแยกสิ่งปนเปื้อนออกก่อนการตรวจวิเคราะห์

3.2 ตัวอย่างดิน ใช้ soil auger สุ่มเก็บดินจากแปลงส้มโดยใช้วิธีเส้นทแยงฟันปลาให้ได้ตัวอย่างละปริมาณ 1 กิโลกรัม ผึ่งในถาดที่อุณหภูมิห้อง ให้มีความชื้นประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ แล้วทุบให้ละเอียด ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบและหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

3.3 ตัวอย่างส้ม สุ่มเก็บทั่วทั้งต้นที่ระดับสูง กลาง และต่ำ ทั้งในและนอกทรงพุ่ม ให้ได้ตัวอย่างละประมาณ 2 กิโลกรัม ปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปทดสอบ

4. การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน

เตรียม stock standard solution ของสารพิษแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น ประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม Intermediate standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสม ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมของแต่ละกลุ่มให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.01-2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. วิธีการสกัดตัวอย่าง

5.1 การสกัดสารพิษในน้ำ

5.1.1 กลุ่ม Organochlorines และกลุ่ม Pyrethroids (AOAC, 1999)

ตวงน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติม hexane (AR) 100 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ separatory funnel shaker นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไข hexane ชั้นบนกรองผ่าน sodium sulfate anhydrous ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ปริมาตร hexane (AR) ครั้งละ 50 มิลลิลิตร เก็บชั้นของ hexane กรองรวมกัน ล้าง separatory funnel ด้วย hexane (AR) 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิดหัวตรวจวัด ECD

5.1.2 กลุ่ม Organophosphorus, Carbamates, Benzimidazole, Acylalanine และ Nitroguanidine nicotinoid (AOAC, 1995)

ใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับวิธีการสกัดสารพิษกลุ่ม Organochlorines และกลุ่ม Pyrethroids ในน้ำ ในข้อ 5.1.1 แต่จะเปลี่ยนในส่วนของสารเคมีที่ใช้ในการสกัดจาก hexane เป็น ethyl acetate และนำสารสกัดที่ได้ฉีดเครื่อง GC ชนิดหัวตรวจวัด FPD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Organophosphorus และฉีดเครื่อง HPLC ชนิดหัวตรวจวัด DAD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Carbamates, Benzimidazole, Acylalanine และ Nitroguanidine nicotinoid

5.1.3 สารกำจัดวัชพืช paraquat

เตรียม cation exchange resin 5 กรัม ในน้ำ เทลงบิวเรตล้างด้วยน้ำ 50 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร มาปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

1 N ใส่ตัวอย่าง ตามด้วยน้ำ, กรดไฮโดรคลอลิก 2 N, น้ำ, แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.5% และน้ำ ตามลำดับ อย่างละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นชะเก็บด้วย สารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมคลอไรด์ 50 มิลลิลิตร ตรวจวิเคราะห์ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400, 398, 396 และ 394 นาโนเมตร ตามลำดับ

5.2 การสกัดสารพิษในดิน

5.2.1 การหาความชื้นในดิน (Back C.A., 1965)

ชั่งและบันทึกน้ำหนัก petri dish และชั่งตัวอย่างตะกอนใส่ใน petri dish นี้ 50 กรัม นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างตะกอนพร้อม petri dish และอบต่ออีกประมาณ 3-4 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักครั้งที่ 2 ถ้าน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง แตกต่างกันไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าน้ำระเหยออกจากตัวอย่างหมดแล้ว ถ้ามากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ต้องอบต่อ 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักแตกต่างกันไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นและน้ำหนักตะกอนแห้ง

5.2.2 วิธีการสกัด

ชั่งดิน 20 กรัม เติม ethyl acetate (AR) 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker นาน 5 ชั่วโมง กรองผ่าน sodium sulfate anhydrous ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย ethyl acetate 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง กรองผ่าน sodium sulfate anhydrous รวมกัน นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร ดูดสารสกัด 1 มิลลิลิตร ใส่ vial for auto sampler ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด FPD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Organophosphorus ฉีดเครื่อง HPLC เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Carbamates, Benzimidazole, Acylalanine และ Nitroguanidine nicotinoid ส่วนสารสกัดที่เหลือ 1 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้งด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด ECD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Organochlorines และกลุ่ม Pyrethroids

5.2.3 สารกำจัดวัชพืช paraquat ในดิน

ชั่งดิน 25 กรัม ใส่ round bottom flask เติมน้ำ 65 มิลลิลิตร, sulfuric acid 18 M 35 มิลลิลิตร, octanol 1 มิลลิลิตร และลูกแก้ว 10 เม็ด นำไป reflux 5 ชั่วโมง แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองที่เคลือบด้วย celite 5 กรัม จากนั้นนำไป clean up ด้วย cation exchange resin ตรวจวิเคราะห์ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400, 398, 396 และ 394 นาโนเมตร ตามลำดับ

5.3 การสกัดสารพิษในส้ม (Steinwandter H, 1985)

ชั่งส้ม 25 กรัม เติม acetone AR 50 มิลลิลิตร sodium chloride 8 กรัม และ dichloromethane 40 มิลลิลิตร ปั่น 2 นาที รินสารละลายใสใส่ลงในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม sodium sulfate 2 ช้อนโต๊ะ ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วกรองผ่าน sodium sulfate ให้ได้ 50 มิลลิลิตร รินสารละลายลงใน round bottom flask ล้าง cylinder ด้วย acetone PR 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate PR ให้ได้ 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย 2 มิลลิลิตร ใส่ vial นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษกลุ่ม Organophosphorus ด้วยเครื่อง GC-FPD ดูดสารละลาย 2 มิลลิลิตร กรองผ่าน filter membrane 0.2 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษกลุ่ม Carbamates, Benzimidazole, Acylalanine และ Nitroguanidine nicotinoid ด้วยเครื่อง HPLC ดูดสารละลาย 4 มิลลิลิตร ใส่ vial ลดปริมาตรจนเกือบแห้ง แล้วเติม hexane:

dichloromethane (4:1) 2 มิลลิลิตร แล้ว clean up นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษกลุ่ม Organochlorines และกลุ่ม Pyrethroids

6. การเตรียมเครื่อง GC และ HPLC

ตัวอย่างน้ำ ดิน และส้มที่สกัดได้นำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารพิษ

6.1 เครื่อง Gas Chromatograph หัวตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD) ใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Organochlorines และกลุ่ม Pyrethroids ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

mode : splitless

GLC column : DB 1701 capillary, ความยาว 30 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร, สารเคลือบหนา 0.25 ไมโครเมตร

temperature : injector = 230 °C, detector = 300 °C

oven program : 80 °C (1 นาที) $\xrightarrow{20\ ^\circ C/นาที}$ 220 °C (2 นาที) $\xrightarrow{1\ ^\circ C/นาที}$ 235 °C (1 นาที) $\xrightarrow{20\ ^\circ C/นาที}$ 240 °C (1 นาที) $\xrightarrow{25\ ^\circ C/นาที}$ 265 °C (12 นาที) $\xrightarrow{20\ ^\circ C/นาที}$ 280 °C (8 นาที)

carrier gas : helium flow 1.4 มิลลิลิตร/นาที

make up gas : nitrogen flow 30 มิลลิลิตร/นาที

injection volume : 1 ไมโครลิตร

6.2 เครื่อง Gas Chromatograph หัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) ใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Organophosphorus ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

Mode : splitless

GC column : DB 1701 capillary, ความยาว 30 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร, สารเคลือบหนา0.25 ไมโครเมตร

temperature : injector = 230 °C, detector = 250 °C

oven program : 80 °C (1 นาที) $\xrightarrow{20\ ^\circ C/นาที}$ 194 °C (1 นาที) $\xrightarrow{2\ ^\circ C/นาที}$ 197 °C (1 นาที) $\xrightarrow{5\ ^\circ C/นาที}$ 200 °C (1 นาที) $\xrightarrow{1\ ^\circ C/นาที}$ 210 °C (2 นาที) $\xrightarrow{0.5\ ^\circ C/นาที}$ 212 °C (1 นาที) $\xrightarrow{30\ ^\circ C/นาที}$ 260 °C (17 นาที)

carrier gas : helium flow 1.2 มิลลิลิตร/นาที

make up gas : nitrogen flow 60 มิลลิลิตร/นาที

ignite gas : H_2 110 มิลลิลิตร/นาที, Air 150 มิลลิลิตร/นาที

injection volume : 1 ไมโครลิตร

6.3 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector (DAD) ใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Carbamates, Acylalanine และ Nitroguanidine nicotinoid

Wavelength : 220 นาโนเมตร

Column : Eclipse XDB-C18 ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 5 ไมโครเมตร

Flow rate : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

Mobile Phase : Water : acetonitrile = 65:35

Temperature : 30 องศาเซลเซียส

Volume injectioned : 10 ไมโครลิตร

6.4 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector (DAD) ใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Benzimidazole

Wavelength : 280 นาโนเมตร

Column : ZORBAX SB-C18 ความยาว 150 มิลลิเมตร
เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 5 ไมโครเมตร

Flow rate : 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

Mobile Phase : Water : acetonitrile = 80:20

Temperature : 40 องศาเซลเซียส

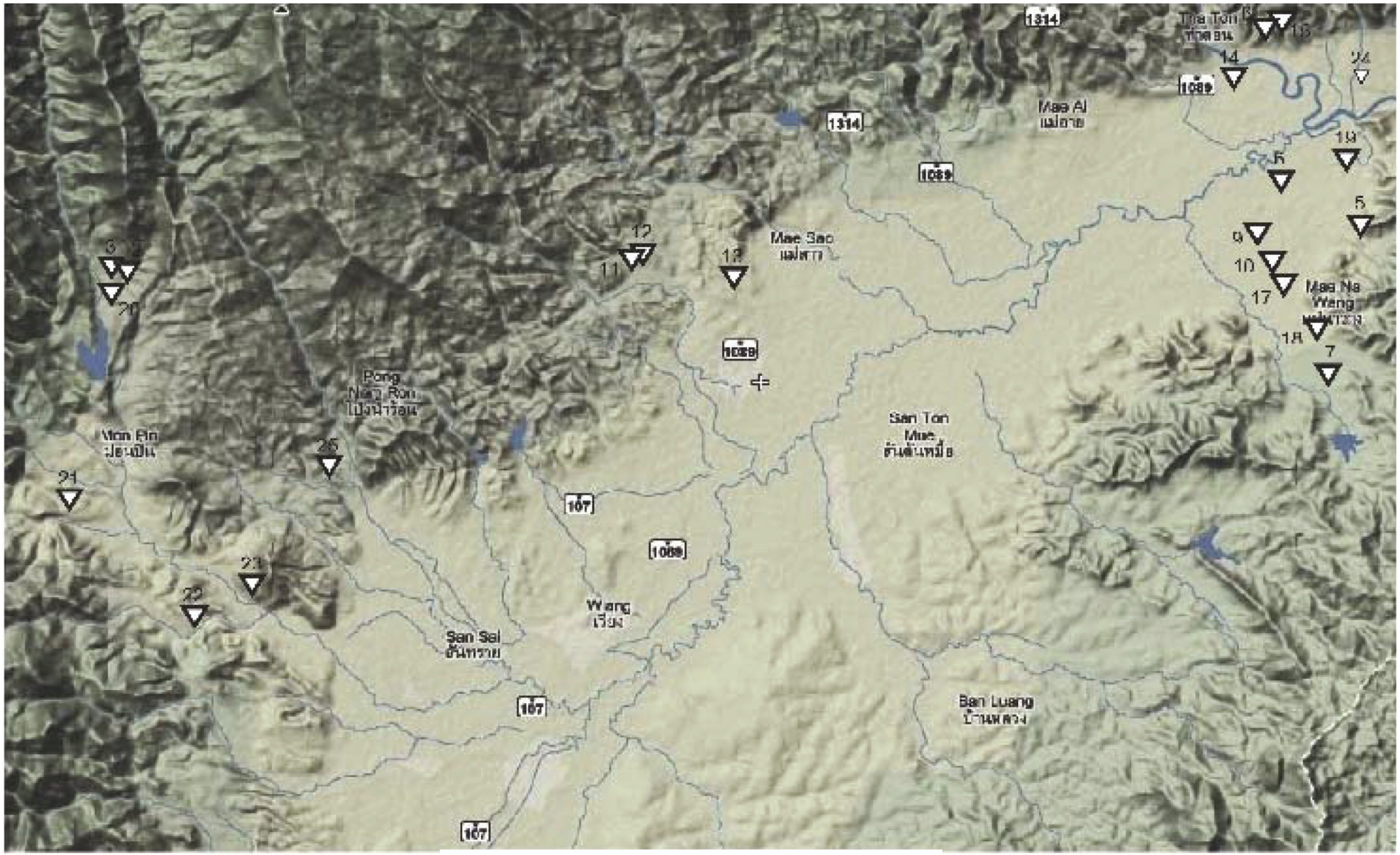
Volume injectioned : 25 ไมโครลิตร

ระยะเวลา

เดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2554

สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และสวนส้มของเกษตรกรในอำเภอแม่อาย และอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างโดยใช้ระบบ GPS

ตารางที่ 1 ที่ตั้งของจุดเก็บตัวอย่าง ใช้ระบบกำหนดตำแหน่งพื้นโลกด้วยดาวเทียม (Global Positioning System; GPS)

จุดที่	ชื่อ - สกุล	ที่ตั้ง	พิกัดภูมิศาสตร์	ตัวอย่าง		
				ดิน	น้ำ	ส้ม
1	นายเอื้อน ดวงตำ	บ.ม่วงชุม บ้านเลขที่ 83 ม.10 ต.ม่อนปิน อ. ฝาง	-	√	√	-
2	นายสุนทร สุกัญญา	บ.ลาน บ้านเลขที่ 62 ม.1 ต.ม่อนปิน อ. ฝาง	N20 00 18.9 E99 05 55.1	√	√	√
3	-	น้ำมาว ในสวนส้มผ่านกลางสวนส้มคุณสุนทร (ต้นน้ำมาว) อ. ฝาง	N20 00 18.9 E99 05 55.1	-	√	-
4	นายอุทัย ดวงน้อย	บ.ใหม่ร่องไคร้ บ้านเลขที่ 120 ม. 17 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	-	√	√	-
5	-	บ่อห้วยร่องไคร้ ม.17 บ.ห้วยร่องไคร้ ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N20 01 05.5 E99 23 39.4	-	√	-
6	-	บ่อน้ำประปาหมู่บ้าน ม.17 บ.ห้วยร่องไคร้ ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N20 01 18.0 E99 22 42.6	-	√	-
7	นางชุลีพร จารุศิริวัฒน์	บ.ห้วยหลวง บ้านเลขที่ 236 ม.13 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N19 59 05.1 E99 23 26.5	√	√	√
8	-	ลำห้วยสาธารณะ ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	-	-	√	-
9	สวนกฤษดา เกียรติสมาน	บ.ท่าปูพัฒนา บ้านเลขที่ 127 ม.11 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N20 00 20.8 E99 22 42.3	√	√	√
10	นายธีรยุทธ สุธรรม	บ.ท่าปู 185 ม.11 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N20 00 09.9 E99 22 47.1	√	√	√
11	นายณัฐวัตร ทฤษฎี	บ.ห้วยมวง 173 ม.8 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N20 00 25.9 E99 13 35.4	√	√	√
12	นายณัฐวัฒน์ ศรีทองกุล	บ.ต้นหนุน 21 ม.5 ต.เวียง อ. ฝาง	N19 57 43.7 E99 09 28.2	√	√	√
13	น.ส.ศณิสา บุญรัตน์	153 ม.16 ต.แม่สาว อ. แม่อาย	N20 00 04.2 E99 14 44.2	√	√	√
14	นายอารี มาบางครุ	122 ม.3 ต.ท่าตอน อ. แม่อาย	N20 02 59.3 E99 21 41.0	√	√	√
15	นายเกรียงศักดิ์ ศรีวิชัย	บ.ห้วยน้ำเย็น ซ.3 33 ม.4 ต.ท่าตอน อ. แม่อาย	N20 03 34.4 E99 22 44.0	√	√	√
16	-	แม่น้ำกก ม.4 ต.ท่าตอน อ. แม่อาย	N20 03 25.3 E99 22 39.8	-	√	-
17	นายดี ทันสา	112 หมู่ 16 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N19 59 58.0 E99 22 54.3	√	√	√
18	นางจารุณี นายสมชาติ เมืองวิลัย	บ.ใหม่ร่องไคร้ 29 หมู่ 17 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N19 59 57.6 E99 22 53.6	√	√	√
19	นายเลิศศักดิ์ อินทนนท์	19 หมู่ 17 ต.แม่นาวาง อ. แม่อาย	N20 01 34.3 E99 23 31.7	√	√	√
20	นางสุคำ กันทะอินทร์	บ.ม่วงชุม 22/1 หมู่ 10 ต.ม่อนปิ่น อ. ฝาง	N20 00 19.1 E99 05 55.1	√	√	√
21	นายบุณเลิศ ปิ่นตา	บ.ม่วงชุม หมู่ 10 ต.ม่อนปิ่น อ. ฝาง	N19 56 32.1 E99 05 18.9	√	√	√
22	นายแสวง หิรัญชัย	139 หมู่ 6 ต.ม่อนปิ่น อ. ฝาง	N19 55 35.2 E99 07 09.1	√	√	√
23	นายเชาว์ พัฒนพงค์	21/5 หมู่ 10 ต. ม่อนปิ่น อ. ฝาง	N19 56 08.7 E99 07 35.9	√	√	√
24	สวน TAP Thai agro plantec co.ltd.	ต. ท่าตอน อ. แม่อาย	N20 03 20.3 E99 23 96.2	√	√	-
25	นายปั๋นแก้ว ว่องไว	77/2 หมู่ 6 ต. ม่อนปิ่น อ. ฝาง	N19 57 56.7 E99 09 43.7	√	√	-

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และส้ม ในช่วงเดือนกันยายน ธันวาคม 2553 และเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม 2554 รวมตัวอย่างที่สุ่มเก็บทั้งหมด 148 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างน้ำ 73 ตัวอย่าง ดิน 59 ตัวอย่าง และส้ม 16 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 8 กลุ่ม แบ่งเป็นสารกำจัดแมลง 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Organochlorines 21 ชนิด กลุ่ม Organophosphorus 21 ชนิด กลุ่ม Pyrethroids 7 ชนิด กลุ่ม Carbamates 11 ชนิด กลุ่ม Nitroguanidine nicotinoid 1 ชนิด สารป้องกันและกำจัดโรคพืช 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Benzimidazole 1 ชนิดและกลุ่ม Acylalanine 1 ชนิด และสารกำจัดวัชพืช 1 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Bipyridilium 1 ชนิด

ผลการตรวจวิเคราะห์พบสารพิษตกค้างในตัวอย่างส้ม 16 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษตกค้างทั้งหมดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ p,p'–DDE และ tetradifon ปริมาณ <0.01 และ <0.01–1.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ กลุ่ม Organophosphorus จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ chlorpyrifos ethyl, ethion, fenitrothion, malathion, methamidophos, pirimiphos methyl, profenofos และ triazophos ปริมาณ <0.01-0.21, <0.01–2.55, 0.05, <0.01–0.26, <0.01, 0.06, 0.02–0.68 และ <0.01–0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ กลุ่ม Pyrethroids จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่ cypermethrin และ lambda cyhalothrin ปริมาณ 0.01–2.58 และ <0.01–0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่ม Carbamates จำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ carbaryl, carbofuran, 3–OH carbofuran, methomyl และ promecarb ปริมาณ 1.22, 0.75, 0.05–0.98, 0.03–5.190 และ 0.30–0.82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ และกลุ่ม Nitroguanidine nicotinoid จำนวน 4 ตัวอย่าง ชนิด imidacloprid ปริมาณ 0.06–1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารป้องกันและกำจัดโรคพืชกลุ่ม Benzimidazole จำนวน 8 ตัวอย่าง ชนิด carbendazim ปริมาณ 0.16–4.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

ตัวอย่างน้ำ 73 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพิษตกค้าง 72 ตัวอย่าง คิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ สารพิษที่ตรวจพบเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ endosulfan sulfate และ tetradifon ปริมาณ 0.02-0.04 และ <0.01–0.11 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ กลุ่ม Organophosphorus จำนวน 59 ตัวอย่าง ได้แก่ chlorpyrifos ethyl, diazinon, dimethoate, EPN, ethion, malathion, pirimiphos methyl, profenofos และ triazophos ปริมาณ 0.01-0.78, 0.02-0.03, 0.03-0.30, 0.02-0.04, <0.01–2.21, 0.01-0.03, 0.01-0.06, 0.03-0.07 และ 0.02-0.24 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ กลุ่ม Pyrethroids จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ cypermethrin ปริมาณ 0.03–0.12 ไมโครกรัมต่อลิตร กลุ่ม Carbamates จำนวน 52 ตัวอย่าง ได้แก่ carbaryl, carbofuran, 3 – keto carbofuran, fenobucarb, isoprocarb, methomyl, metolcarb, และpromecarb ปริมาณ 0.10–0.22, 0.14–0.37, 0.16–5.16, 0.70–1.20, 40.83, 0.24–16.14, 0.46–24.84 และ <0.01–15.80 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ กลุ่ม Nitroguanidine nicotinoid จำนวน 17 ตัวอย่าง ชนิด imidacloprid ปริมาณ 0.03–3.41 ไมโครกรัมต่อลิตร สารป้องกันและกำจัดโรคพืชกลุ่ม Acylalanine จำนวน 4 ตัวอย่าง ชนิด metalaxyl ปริมาณ 0.36–4.77 ไมโครกรัมต่อลิตรและกลุ่ม Benzimidazole จำนวน 19 ตัวอย่าง ชนิด carbendazim ปริมาณ 0.26–32.02 ไมโครกรัมต่อลิตร และตรวจพบสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Bipyridilium จำนวน 31 ตัวอย่าง ชนิด paraquat ปริมาณ 0.73 – 144.60 ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)

ตัวอย่างดิน 59 ตัวอย่างตรวจพบสารพิษตกค้างทั้งหมดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม Organochlorines จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้แก่ alpha endosulfan, beta endosulfan, endosulfan sulfate, o,p'–DDE, p,p'–DDE, p,p'-DDT และ tetradifon ปริมาณ <0.01, <0.01, <0.01–0.04, 0.02–0.08, <0.01–0.01, 0.03 และ <0.01–0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ กลุ่ม Organophosphorus จำนวน 58 ตัวอย่าง ได้แก่ chlorpyrifos ethyl, dimethoate, ethion, malathion, monocrotophos, profenofos และ triazophos ปริมาณ <0.01-0.26, <0.01, <0.01–4.72, <0.01–0.07, <0.01, <0.01–0.12 และ <0.0–0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ กลุ่ม Pyrethroids จำนวน 34 ตัวอย่าง ได้แก่ cypermethrin และ lambda cyhalothrin ปริมาณ <0.01–1.62 และ <0.01–0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่ม Carbamates จำนวน 35 ตัวอย่าง ได้แก่ carbaryl, carbofuran, 3 – keto carbofuran, fenobucarb, methomyl, และ promecarb ปริมาณ 0.04–0.37, 0.37–1.01, <0.01–0.54, 0.29–0.58, 0.01–0.26 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ กลุ่ม Nitroguanidine nicotinoid จำนวน 28 ตัวอย่าง ชนิด imidacloprid ปริมาณ <0.01–3.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารป้องกันและกำจัดโรคพืชกลุ่ม Acylalanine จำนวน 5 ตัวอย่าง ชนิด metalaxyl ปริมาณ 0.05–1.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและกลุ่ม Benzimidazole จำนวน 29 ตัวอย่าง ชนิด carbendazim ปริมาณ 0.02–26.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจพบสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Bipyridilium จำนวน 33 ตัวอย่าง ชนิด paraquat ปริมาณ 0.06 – 2.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างส้ม ในพื้นที่สูงภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่

จำนวน		ชนิดของสารพิษ	ปริมาณ	ค่า EU MRLs	ค่า Codex MRLs	% ที่เกินค่า
ทั้งหมด	ตรวจสอบ		มก. / กก.	มก. / กก.	มก. / กก.	EU MRLs
16	16 (100%)	Organochlorines (9) [1/]				
		p,p' - DDE (2)	< 0.01	-	-	-
		tetradifon (8)	< 0.01 – 1.58	2	-	0
		Organophosphorus (16)	< 0.01 – 0.21	0.3	1	0
		chlorpyrifos ethyl (12)	< 0.01 – 3.86	0.01	-	94 (15) [2/]
		ethion (16)	0.05	0.01	-	6 (1)
		fenitrothion (1)	0.02 – 0.68	0.05	-	19 (3)
		profenofos (6)	< 0.01	0.01	0.5	0
		methamidophos (1)	< 0.01 – 0.26	0.02	7	6 (1)
		malathion (2)	< 0.01 – 0.32	0.01	-	6 (1)
		triazophos (2)	0.06	1	-	0
		pirimiphos methyl (1)				

จำนวน		ชนิดของสารพิษ	ปริมาณ	ค่า EU MRLs	ค่า Codex MRLs	% ที่เกินค่า
ทั้งหมด	ตรวจสอบ		มก. / กก.	มก. / กก.	มก. / กก.	EU MRLs
		Pyrethroids (13)				
		cypermethrin (13)	0.01 – 2.58	2	2	6 (1)
		lambda cyhalothrin (7)	< 0.01 – 0.05	0.2	0.2	0
		Carbamates (14)				
		3-OH carbofuran (5)	0.05 – 0.981	0.3	0.5	19 (3)
		promecarb (5)	0.30 – 0.821	-	-	-
		methomyl (3)	0.03 – 5.190	0.02	1	19 (3)
		carbaryl (1)	1.22	0.05	15	6 (1)
		carbofuran (1)	0.75	0.3	0.5	6 (1)
		Nitroguanidine nicotinoid(4) imidacloprid (4)	0.06 – 1.00	1	1	0
		Benzimidazole (8)				
		carbendazim (8)	0.16 – 4.08	0.5	1	31 (5)

หมายเหตุ : ( ) [1/] จำนวนตัวอย่างที่พบสารกลุ่ม/ชนิดนี้

( ) [2/] จำนวนตัวอย่างที่พบเกินค่า MRLs

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างน้ำในพื้นที่สูงภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่

จำนวน		ชนิดของสารพิษ	ปริมาณ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	LC_{50}
ทั้งหมด	ตรวจพบ			
73	72 (99%)	Organochlorines (5) [1/]		
		endosulfan sulfate (2)	0.02 – 0.04	1.4 μg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		tetradifon (4)	< 0.01 – 0.11	> 10 mg/L, (3 hrs.) carp
		Organophosphorus (59)		
		chlorpyrifos ethyl (34)	0.01 – 0.78	0.003 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		ethion (57)	< 0.01 – 2.21	0.049 mg/L, (96hrs.) rainbow trout
		EPN (3)	0.02 – 0.04	0.21 mg/L, rainbow trout
		pirimiphos methyl (7)	0.01 – 0.06	1.4 mg/L, (48 hrs.) mirror carp
		dimethoate (3)	0.03 – 0.30	6.0 mg/L, bluegill sunfish
		profenofos (7)	0.03 – 0.07	0.08 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		diazinon (2)	0.02 – 0.03	2.6-3.2 mg/L, (96 hrs.) rainbow
		malathion (7)	0.01 – 0.03	trout

จำนวน		ชนิดของสารพิษ	ปริมาณ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	LC_{50}
ทั้งหมด	ตรวจพบ			
		triazophos (2)	0.02 – 0.24	0.1 mg/L, (96 hrs.) bluegill sunfish 5.6 mg/L, (96 hrs.) carp
		Pyrethroids (5)		
		cypermethrin (5)	0.03 – 0.12	0.0020-0.0028 mg/L, (96 hrs.) brown trout
		permethrin (2)	0.01 – 0.03	1.8 μg/L, (96 hrs.) bluegill sunfish
		Carbamates (52)		
		metolcarb (2)	0.46 – 24.84	Low toxicity to fish
		methomyl (41)	0.24 – 16.14	0.9 mg/L, (96 hrs.) bluegill sunfish
		carbaryl (7)	0.10 – 0.22	4.38 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		promecarb (10)	< 0.01 – 15.80	0.3 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		3 – keto carbofuran (3)	0.16 – 5.16	-
		carbofuran (3)	0.14 – 0.37	0.24 mg/L, (96 hrs.) bluegill sunfish
		isoprocarb (1)	40.83	4.2 mg/L, (48 hrs.) carp
		fenobucarb (2)	0.70 – 1.20	-
		Nitroguanidine nicotinoid (17)	0.03 – 3.41	237 mg/L, (96 hrs.) golden orfe
		imidacloprid (17)		
		Acylalanine (4)		
		metalaxyl (4)	0.36 – 4.77	>100 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		Benzimidazole (19)		
		carbendazim (19)	0.26 – 32.02	2.3 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout
		Bipyridilium (31)		
		paraquat (31)	0.73 – 144.60	32 mg/L, (96 hrs.) rainbow trout

หมายเหตุ : ( ) [1/] จำนวนตัวอย่างที่พบสารกลุ่ม/ชนิดนี้

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างดิน ในพื้นที่สูงภาคเหนือ

จำนวน		ชนิดของสารพิษ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ทั้งหมด	ตรวจพบ		
59	59 (100%)	Organochlorines (31) [1/]	
		alpha endosulfan (3)	< 0.01
		beta endosulfan (1)	< 0.01
		endosulfan sulfate (7)	< 0.01 – 0.04
		o,p' - DDE (8)	0.02 – 0.08
		p,p' - DDE (12)	< 0.01 – 0.01
		tetradifon (16)	< 0.01 – 0.40
		p,p' - DDT (1)	0.03
		Organophosphorus (58)	
		chlorpyrifos ethyl (41)	< 0.01 – 0.26
		dimethoate (1)	< 0.01
		ethion (57)	< 0.01 – 4.72
		profenofos (10)	< 0.01 – 0.12
		triazophos (5)	< 0.01 – 0.01
		malathion (2)	< 0.01 – 0.07
		monocrotophos (1)	< 0.01
		Pyrethroids (34)	
		cypermethrin (34)	< 0.01 – 1.62
		lambda cyhalothrin (3)	< 0.01 – 0.03
		Bipyridilium (33)	
		paraquat (33)	0.06 – 2.69
		Carbamates (35)	
		carbaryl (6)	0.04 – 0.37
		carbofuran (3)	0.37 – 1.01
		methomyl (15)	0.01 – 0.26
		3 – keto carbofuran (4)	< 0.01 – 0.54
		fenobucarb (2)	0.29 – 0.58
		promecarb (1)	0.20
		Acylalanine (5)	

จำนวน		ชนิดของสารพิษ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ทั้งหมด	ตรวจพบ		
		metalaxyl (5)	0.05 – 1.70
		Nitroguanidine nicotinoid (28)	
		imidacloprid (28)	< 0.01 – 3.13
		Benzimidazole (29)	
		carbendazim (29)	0.02 – 26.16

หมายเหตุ : ( ) [1/] จำนวนตัวอย่างที่พบสารกลุ่ม/ชนิดนี้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสำรวจแหล่งปลูกส้มของเกษตรกรในเขตอำเภอฝางและแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ ผลการวิเคราะห์พบสารพิษตกค้างในส้มทั้ง 16 ตัวอย่าง เกินค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRLs) ของสหภาพยุโรป (EU) ทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของสารพิษที่เกินค่า MRLs ได้แก่ carbaryl, carbofuran, carbendazim, cypermethrin, ethion, fenitrothion, malathion, methomyl, profenofos, triazophos และ 3-hydroxy carbofuran มีปริมาณระหว่าง 0.02 ถึง 5.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเฉพาะ ethion พบเกินค่า MRLs มากที่สุดถึง 94 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด รองลงมา carbendazim พบเกินค่า MRLs จำนวน 31 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด สำหรับปริมาณสารพิษตกค้างที่พบในน้ำต่ำกว่าค่าความเป็นพิษต่อปลา และสัตว์น้ำ (Median Lethal Concentration, LC_{50}) จึงปลอดภัยต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค เกษตรกรที่ได้รับการรับรองแหล่งผลิต (GAP) แล้ว ทราบถึงสารเคมีที่ห้ามใช้ ใช้สารเคมีที่แนะนำตามโครงการเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) และเว้นช่วงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ปลอดภัยก่อนจำหน่าย แต่บางสวนมีพื้นที่ปลูกส้มขนาดใหญ่ และมีการฉีดพ่นสารเคมีโดยเครื่อง Air Blast ซึ่งฟุ้งกระจายเป็นบริเวณกว้างเกือบทุกวัน และใช้สารเคมีที่มีกลิ่นเหม็นรุนแรง เช่น dimethoate, profenophos เป็นต้น จึงมีกลิ่นสารเคมีตกค้างอบอวลอยู่เป็นเวลานาน ส่วนสวนส้มที่ได้ปรับลดการใช้สารเคมี และใช้วิธีการห่อผล ไม่ค่อยเกิดปัญหาการร้องเรียนจากชุมชน

กรมวิชาการเกษตรได้ให้แนวทางและคำแนะนำแก่เกษตรกรผู้ปลูกส้ม ด้วยการจัดให้มีการให้ความรู้แก่เกษตรกรอย่างสม่ำเสมอ จัดให้มีการพบปะเพื่อแลกเปลี่ยนความคิดเห็นระหว่างเกษตรกรและนักวิชาการ ให้ระหว่างความรู้ความเข้าใจในเรื่องสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ถูกต้อง เช่น แนะนำไม่ให้ใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลานาน ซึ่งจะช่วยลดการสร้างความต้านทานของแมลงศัตรูส้มได้ทางหนึ่ง ดังนั้น ผู้ปลูกส้มควรมีความรู้เกี่ยวกับการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูส้มมากกว่าหนึ่งกลุ่ม เพื่อนำมาใช้สลับกัน โดยใช้หลักเกณฑ์การสลับสารกำจัดแมลงที่ทีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกันสลับกัน เช่นกลุ่มคาร์บาเมท และกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เป็นสารยับยั้งการสร้างเอนไซม์คลอรีนเอสเทอเรส ไม่ควรนำมาใช้สลับกันโดยเฉพาะสารกำจัดศัตรูพืชที่ต้องเฝ้าระวัง คือ carbofuran และ methomyl ที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์และสิ่งแวดล้อม ต้องห้ามใช้ในสวนส้ม ควรใช้สารกลุ่มอื่น เช่นกลุ่มนีโอนิโคตินอยด์ (Neonicotinoid) ซึ่งเป็นสารเสริมฤทธิ์/ขัดขวาง

สารนิโคตินิคอะซิติลคอรีน หรือกลุ่มไพรีทรอยส์ (Pyrethroids) เป็นสารขัดขวางสมดุลของโซเดียม และเมื่อมีความจำเป็นต้องใช้สารเคมี ให้สุ่มตรวจแมลงศัตรูพืชก่อนฉีดพ่น เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมี ฉีดพ่นสารเคมีที่ถูกต้องกับชนิดของศัตรูส้ม และแนะนำให้ลดการใช้สารเคมีที่มีกลิ่นเหม็นรุนแรง และใช้สารพิษกลุ่มอื่นที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียง เช่นกลุ่มนีโอนิโคตินอยด์แทน

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เผยแพร่ในหนังสือรายงานประจำปี และการประชุมวิชาการของหน่วยงาน
2. เป็นคำแนะนำหรือถ่ายทอดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูส้มแก่เกษตรกร

เอกสารอ้างอิง

ศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ รายงาน"สำรวจการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงและไรศัตรูส้มของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง และ อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่" เอกสารประกอบการบรรยาย การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องอนาคตส้มไทย 20 พ.ค. 2553 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร เชียงใหม่

Back C.A. 1965. “Method of soil analysis: part I physical and mineralogical properties”. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Organochlorine Pesticides in Water, Gas Chromatographic Method. AOAC Official Method 990.06, 1999.

Organophosphorus Pesticide. General Multiresidue Method. AOAC Official Method 970.52, 1995.

Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min on-line Method for Extraction and Isolating Pesticide Residues and industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem. 322: 752-754.

Douglas Hartley and Hamish Kidd, Unwin Bbrother, The Agrochemical Handbook Third Edition Limited, Nottingham England, 1991.

http://extoxnet.orst.edu/pips/ethion.htm

http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAll.jsp?Rec_Id=PC35877&Taxa_Group=Fish

ผลกระทบของสารพิษกลุ่ม Organophosphorus และ Carbamate ต่อ Biotransformation enzymes ในสัตว์น้ำ และ Chlorophyll content ในพืชน้ำ : กลุ่ม Organophosphorus ชนิด Chlorpyrifos

Impact of Organophosphorus; Chlorpyrifos on Biotransformation enzymes in aquatic fauna and Chlorophyll content macrophyte

สิริพร เหลืองสุชนกุล ผกาสินี คล้ายมาลา

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาผลกระทบของสารพิษกลุ่ม organophosphorus ชนิด chlorpyrifos ในสัตว์น้ำ และพืชน้ำโดยดำเนินการทดลองในปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus* และสาหร่ายหางกระรอก สกุล *Hydrilla verticillata (L.F.) Royle* พบว่ามีค่า 96-h LC_{50} เท่ากับ 0.1053 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลการทดลองสารพิษ chlorpyrifos ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน (0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะจำลองเดียว พบว่าการสะสมของสารพิษ chlopyrifos ในปลาตะเพียนขาว และสาหร่ายหางกระรอกจะเพิ่มขึ้นแปรผันตามการลดลงของสารพิษในน้ำ ในขณะที่ตะกอนมีแนวโน้มการสะสมเพิ่มขึ้นความเข้นข้นระดับต่ำ และจะคงที่ความเข้มข้นระดับกลางและสูง สารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง activity ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดย Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD) และ Acetylcholinesterase (ACHE) จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตั้งแต่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ต่ำๆ แต่ Glutathione-*S*-transferase (GST) จะเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ปริมาณสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เท่านั้น ผลกระทบของ chlorpyrifos ต่อสาหร่ายหางกระรอกพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์จะเปลี่ยนแปลงแปรผันตามระดับความเข้มข้น โดยความเข้มข้นสารพิษ cholrpyrifos ที่มากกว่า 0.96515 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสังเกตุเห็นผลกระทบที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน คือ การตายของเซลล์สาหร่าย และการแตกยอดของเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น ผลกระทบของสารพิษ chlorpyrifos ในสภาวะระบบนิเวศจำลองต่อปลาตะเพียนขาวและสาหร่ายหางกระรอก จะน้อยกว่าผลกระทบของสารพิษ chlorpyrifos ที่ทดลองในสภาวะจำลองเดียว (single specie test) ทั้งผลกระทบที่เกิดขึ้นในสภาวะระบบนิเวศนั้นมีปัจจัยซับซ้อนดังนั้นการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase และ Acetylcholinesterase จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมเพราะสามารถตรวจหาผลกระทบในกรณีที่มีสารพิษปริมาณน้อยๆ ได้

รหัสโครงการ 03-06-54-05-04-04-01-54

คำนำ

ปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ถูกต้อง หรือใช้ในปริมาณมากเกินกำหนด มากกว่าหนึ่งชนิด หรือใช้เป็นระยะเวลายาวนานเกินไปนั้น ผลจากปัญหาที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม เช่น สัตว์น้ำ พืชน้ำ และสาหร่าย ในรูปแบบที่แตกต่าง เช่น ความเป็นพิษจากการสะสมสารพิษ (Bioaccumulation) การถ่ายทอดสารพิษ (Biomagnifications) ในห่วงโซ่อาหารในลำดับต่างๆ ไปสู่ผู้บริโภคขั้นสูงคือมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาหร่ายหรือพืชน้ำซึ่งเป็นผู้ผลิตขั้นต้น และปลาที่ใช้เป็นอาหารหรือปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นต้น รวมทั้งผลกระทบที่เกิดขึ้นกับผู้บริโภคพืชและสัตว์น้ำที่มีสารพิษตกค้างด้วย

การตรวจหาผลกระทบของสารพิษในสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันนอกจากการตรวจหาปริมาณการสะสมของสารพิษตกค้างแล้วยังมักใช้เทคนิคการตรวจวัดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกระบวนการเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษ (Biotransformation) (Deniele Werck-Reichhart. 2001; Milan, 2001; Ron van der Oost, 2003) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อชนิดต่อสารพิษที่สิ่งมีชีวิตได้รับ เช่น ปลา ซึ่งได้มีรายงานพบว่าชนิดของสารพิษที่ได้รับจะกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome-P450 (CYP1A) (Ron van der Oost, 2003) ในขณะที่การตรวจหาผลกระทบในพืชน้ำ และสาหร่าย มักนิยมใช้วิธีการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชน้ำ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่ายและสารพิษส่วนมากมักมีผลกระทบต่อกลไก Phosphorylation ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) โดยวัดจากปริมาณคลอโรฟิลล์ a และ b (PAN Huiyun *et al.*, 2009 และการสังเกตุการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของพืชน้ำ (Michael, 1994; PAN Huiyun, 2009)

chlorpyrifos จัดเป็นสารพิษอยู่ในกลุ่ม organophosphorus และใช้ในปัจจุบันอย่างแพร่หลาย มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมแม้ว่าจะสลายตัวได้ไวในธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามยังคงขาดข้อมูลความจำเพาะของการเกิดพิษที่แน่ชัด (lack of target specificity) ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำในสภาวะที่มีความซับซ้อน ดังนั้นในทำการทดลองครั้งนี้จึงเพื่อศึกษาผลกระทบของ chlorpyrifos ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำได้แก่ ปลา (ปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus*) และพืชน้ำ (สาหร่ายหางกระรอก สกุล *Hydrilla verticillata (L.F.) Royle*) ภายใต้สภาวะที่มีปัจจัยซับซ้อนทางด้านกายภาพ (น้ำและตะกอน) และชีวภาพ (ปลาและสาหร่าย) โดยใช้วิธีการตรวจวัดดัชนีชีวภาพสัมผัส (Biomarker of exposure) ได้แก่ การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ Acetylcholinesterase (ACHE) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารพิษกลุ่ม organophosphorus และการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ในกลุ่ม Biotransformation enzymes ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 เช่น เอนไซม์ Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) และเอนไซม์ Glutathione-S-Transferse (GST) ในปลาตะเพียนขาว และการหาผลกระทบที่เกิดขึ้นในพืชน้ำด้วยการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ และสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์ของพืชน้ำที่ผิดปกติ และการหาค่าการสะสมสารพิษในสิ่งมีชีวิต (Bioconcentration factor, BCF value)

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาผลของสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส; chlorpyrifos สิ่งมีชีวิตในน้ำ ภายใต้สภาวะระบบนิเวศจำลอง
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดพิษ (Adverse effects) ของสารพิษกลุ่ม organophosphorus ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ
3. เพื่อศึกษาหาตัวชี้วัดทางพิษวิทยาที่เหมาะสมสำหรับสารพิษ chlorpyrifos

ผลที่คาดว่าจะได้

ข้อมูลทางพิษวิทยาของ chlorpyrifos ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ และข้อมูลการถ่ายทอดสารพิษ chlorpyrifos และทำนายความสัมพันธ์ของการเกิดพิษวิทยาและปริมาณความเข้มข้นสารพิษ

วิธีดำเนินการ

1. สารเคมี

1. Ethyl acetate A.R. grade และP.R. grade
2. Acetonitrile
3. Acetone
4. Sodium sulphate
5. Sodium hydrogencarbonate
6. Sodium hydrogenphosphate
7. Potassium nitrate
8. Ammonium dihydrogen phosphate
9. di-Potassium hydrogen phosphate
10. Potassium dihydrogen phosphate
11. Ethoxy resorufin
12. ß-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH)
13. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)
14. Glutathione reduced(GSH)
15. Acetylthiocholine iodide
16. 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)
17. Bio-Quan solution
18. BSA standard protien
19. Primary Secondary Amine (PSA)
20. Glycerol
21. chlorpyrifos; technical trade (91%)

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

2.1 Gas chromatograph accessories ได้แก่ column, liner, o-ring, septum, injection syringe

2.2 spectrophometer และ spectrofluorometer accessories ได้แก่ cuvette, 96-well plate

2.3 Micropipette และpipette tips

2.4 ตู้เลี้ยงปลา และตู้เลี้ยงสาหร่าย

2.5 หลอดปั่นตกตะกอน ขนาด 1.5, 15, 50 มิลลิลิตร

2.6 เครื่องแก้ว ได้ บีกเกอร์ กระบอกตวง กรวยกรอง หลอดทดลอง ขวดทดลอง

2.7 ลูกปลานิล

2.8 สาหร่ายหางกระรอก

3. เครื่องมือ

3.1 Gas chromatograph ชนิดตัวตรวจวัด Flame Photometric Detector (FPD)

3.2 Rotary evaporator

3.3 N_2 – evaporator

3.4 Deep freezer

3.5 Homogenizer

3.6 Spectrophometer

3.7 Spectrofluorometer

3.8 Ultracentrifuge

4. วิธีการทดลอง

4.1 การทดลองเพื่อหาสภาวะและปัจจัยในการทดลอง ได้แก่

4.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ อ้างอิงและดัดแปลงวิธีการจาก APHA *et al.*, 2009

4.1.2 ปัจจัยความสมบูรณ์ของปลาตะเพียนขาวทดลอง (condition factors) อ้างอิงและดัดแปลงวิธีการจาก Muhammad , 2003

4.1.3 ค่า Bioconcentration factor (BCF value) อ้างอิงวิธีคำนวณจาก Holfman *et al.*,1995

4.1.4 ค่าการปลดปล่อย (Leaching) และการสลายตัว (Degradation) ของสารพิษ chlorpyrifos ในตะกอน และน้ำ อ้างอิงและดัดแปลงวิธีการจาก Standard Guide for chemical Fate in Site-Specific Sediment/Water Microcosms (ASTM, 2008)

4.1.5 ค่าความเข้มข้นของ chlorpyrifos ที่ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายหางกระรอกลดลงร้อยละ 50 ภายในเวลา 7 วัน (7day-EC_{50}) อ้างอิงและดัดแปลงวิธีการจาก APHA *et al.*, 2009

4.1.6 ค่าความเข้มข้นของ chlorpyrifos ที่ทำให้จำนวนปลาตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 96 ชั่วโมง (96-LC_{50}) อ้างอิง และดัดแปลงวิธีการจาก Standard Guide for Conduction Acute Toxicity Test on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (ASTM, 2008)

4.2. การทดสอบความเป็นพิษของ chlorpyrifos ต่อปลา พืชน้ำ และสาหร่าย ในสภาวะระบบนิเวศจำลองโดยใช้ ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ ต่ำ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร), กลาง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 3 วัน วางแผนการทดลองแบบ complete Randomized Dezign CRD ขนาดหน่วยทดลอง 6x3 โดยวิธีการทดสอบมีดังนี้

4.2.1 ทดสอบสารพิษ chlorpyrifos กับสาหร่าย โดยใช้สาหร่ายจำนวน 10ท่อน บันทึกข้อมูลในรูปของอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การสะสมสารพิษ และจลศาสตร์ของสารพิษ chlorpyrifos ในน้ำ และในพืชน้ำ

4.2.2 ทดสอบ chlorpyrifos กับปลา โดยใช้ปลาจำนวน 5 ตัวบันทึกข้อมูลในรูปของการแปลงเปลี่ยนพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงของ specific enzymes การสะสมสารพิษ และจลศาสตร์ของสารพิษ chlorpyrifos ในน้ำ และในปลา

4.3 การตรวจวิเคราะห์

4.3.1 การสกัด Chlorpyrifos ในตะกอน น้ำ ปลา พืชน้ำ และสาหร่าย

4.3.1.1 การสกัดสารพิษในน้ำ ปรับปรุงจากวิธีการของ TNO, 1993

ตวงน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม ethyl acetate (AR) 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยมือนาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้นบนซึ่งเป็นชั้น ethyl acetate กรองผ่าน sodium sulfate anhydrous เก็บใน round bottom flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ชั้นล่างเป็นชั้นของน้ำ เติม ethyl acetate (AR) 25 มิลลิลิตรและนำไปเขย่าด้วยมือ นาน 3 นาที ไขเก็บชั้น ethyl acetate กรองผ่าน sodium sulfate anhydrous เก็บรวมกับครั้งแรก เมื่อกรองเสร็จแล้วกลั้ว (rinse) separatory funnel ด้วย ethyl acetate (AR) 10 มิลลิลิตรอีกครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิดหัวตรวจวัด FPD

4.3.1.2 การสกัดสารพิษในตะกอน

4.3.1.2.1 การหาความชื้นในตะกอน

ตัวอย่างตะกอนที่นำมาตรวจวิเคราะห์จะต้องคำนวณเปอร์เซนต์ความชื้นตามวิธีการ (Back C.A., 1965) เพื่อนำไปลบน้ำหนักตัวอย่างตะกอนที่มีความชื้นจะได้น้ำหนักตะกอนแห้งสุทธิ สำหรับใช้คำนวณในขั้นตอนการหาปริมาณสารพิษ ซึ่งจะแบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งสำหรับคำนวณเปอร์เซนต์ความชื้นพร้อมๆ กับแบ่งไปทำการสกัด โดยชั่งและบันทึกน้ำหนัก petri dish และชั่งตัวอย่างตะกอนใส่ใน petri dish นี้ 50 กรัม นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปใส่ใน desiccators ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างตะกอนพร้อม petri dish และนำตัวอย่างอบต่ออีกประมาณ 3-4 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักครั้งที่ 2 ถ้าน้ำหนักที่หายไปจากการอบครั้งที่ 1 และ 2 แตกต่างกันไม่เกิน 1 เปอร์เซนต์ แสดงว่าน้ำระเหยออกจากตัวอย่างหมดแล้ว ถ้ามากกว่า 1 เปอร์เซนต์ จะต้องนำไปอบต่ออีก 3 - 4 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักที่หายไปแตกต่างกันไม่เกิน 1 เปอร์เซนต์ จึงจะนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นและน้ำหนักตะกอนแห้ง (ภาคผนวกสูตร)

4.3.1.2.2 วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม ethyl acetate (AR) 75 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำไปเขย่าด้วย shaker นาน 5 ชั่วโมง กรองสารสกัดผ่าน sodium sulfate anhydrous ใส่ใน round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย ethyl acetate 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง กรองสารสกัดผ่าน sodium sulfate anhydrous เก็บใน round bottom flask ใบเดิม นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร ดูดสารสกัด 1 มิลลิลิตร ใส่ vial for auto sampler ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเครื่อง GC ชนิด FPD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

4.3.1.3 การสกัดสารพิษในสาหร่ายหางกระรอก ปรับปรุงจาก วิธีการของ Anastassides M. (2003)

ชั่งตัวอย่างสาหร่ายหางกระรอกบดละเอียด 5 กรัม ใส่ลงในหลอดตกตะกอน ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetonitrile 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติม magnesium sulphate 2 กรัม และ sodium chloride 0.5 กรัม เขย่าด้วย vortex 1 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารสะลายใสด้านบน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ใส่ PSA 12.5 มิลลิกรัม และ magnesium sulphate 75 มิลลิกรัม เขย่าด้วย vortex 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารสะลายใสด้านบน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตรด้วย ethyl acetate (PR)

4.3.1.4 การสกัดสารพิษในเนื้อปลา ใช้วิธีการของ FEEI SUN (2000)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบด 10 กรัม ใส่ขวดปริมาตร 125 มิลลิลิตร เติม acetonitrile 50 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้ เครื่อง homogenizer 1 นาที กรองผ่านกระดาษกรองด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum pump) ใส่ใน Erlenmeyer flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย acetonitrile 100 มิลลิลิตร ตวงแบ่งสารสกัด 50 มิลลิลิตร ใส่ใน round bottom flask นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้งเติม acetonitrile 15 มิลลิลิตร นำไปขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) โดย ใช้ Solid Phase Extraction; SPE ชนิด C18 ต่อกับ SPE ชนิด florisil ที่บรรจุเพิ่มด้วย anh. sodium sulfate 2 กรัม เป็นคอลัมภ์สำหรับขจัดสิ่งปนเปื้อน ล้างคอลัมภ์ด้วย acetonitrile 6 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างใส่คอลัมภ์และปรับอัตราการไหล 3 หยดต่อวินาที ใส่ใน graduated tube ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์กลุ่ม organophosphorus โดยใช้เครื่อง GC ชนิด FPD

4.3.2 การสกัดคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายหางกระรอกใช้วิธี Trichromatic method Zlesceri *et al*., 1998) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ชั่งสาหร่าย 0.1 กรัม เติม 90% acetone (w/w)เย็น ที่มี 5% Na_2CO_3 (w/v) ประมาณ 1-2 หยด บดละเอียดด้วย hand homogenizer หลังบดละเอียดแล้ว ปรับปริมาตรสารละลายคลอโรฟิลล์เป็น 10 มิลลิลิตร 90% acetone (v/v) ที่มี 5% Na_2CO_3 (w/v) และนำสารละลายดังกล่าวไป centrifuge ที่ความเร็ว 4000

รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 647 และ 664 นาโนเมตร

4.3.3 การสกัดเอนไซม์โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.3.3.1 ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ GST และEROD

นำชิ้นตับปลาที่จะสกัดมาล้างด้วยสารละลาย physiological saline pH 7.4 เพื่อล้างเลือดและสิ่งสกปรกอื่นๆ จากนั้นชั่งตัวอย่างก่อนสกัด 0.5 กรัม นำชิ้นตัวอย่างที่ชั่งแล้วมาบดในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังบดนำไปปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายดังกล่าวออกเป็น 2 ส่วน โดย

- ส่วนที่ 1 centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสด้านบนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจวัดเอนไซม์ GST
- ส่วนที่ 2 centrifugeด้วยความเร็ว 43,000 g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสไปด้านบนไป centrifuge ต่อด้วยความเร็ว 100,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสด้านบนทิ้งไป เติมสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่เติม 20% glycerol (v/v) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส ก่อนนำตรวจวัดเอนไซม์ EROD

4.3.3.2 ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ AChE

นำสมองปลาที่จะสกัดมาล้างด้วย สารละลาย physiological saline pH 7.4 เพื่อล้างเลือดและสิ่งสกปรกอื่นๆ จากนั้นชั่งตัวอย่างก่อนสกัด แล้วนำชิ้นตัวอย่างที่ชั่งแล้วมาบดใน สารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังบดนำไปปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 100,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ดูดสารละลายใสด้านบนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจวัดเอนไซม์

4.3.4 การตรวจวัดปริมาณ Chlorpyrifos ในตะกอน น้ำ ปลา และสาหร่ายหางกระรอก โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

4.3.4.1 เครื่อง Gas Chromatograph หัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) ใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphorus ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

Detector : Flame Photometrric Detector

Mode : splitless

GC column : column DB 1701 capillary, 30 m x 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness

temperature : injector = 230 °C, detector = 250 °C

oven program : 80 °C (1 นาที) $\xrightarrow{20\ ^\circ C/\text{นาที}}$ 194 °C (1 นาที) $\xrightarrow{2\ ^\circ C/\text{นาที}}$ 197 °C (1 นาที) $\xrightarrow{5\ ^\circ C/\text{นาที}}$ 200 °C (1 นาที) $\xrightarrow{1\ ^\circ C/\text{นาที}}$ 210 °C (2 นาที) $\xrightarrow{0.5\ ^\circ C/\text{นาที}}$ 212 °C (1 นาที) $\xrightarrow{30\ ^\circ C/\text{นาที}}$ 260 °C (17 นาที)

carrier gas : helium flow 1.2 มิลลิลิตร/นาที

make up gas : nitrogen flow 60 มิลลิลิตร/นาที

ignite gas : H_2 110 มิลลิลิตร/นาที, Air 150 มิลลิลิตร/นาที

injection volume : 1 ไมโครลิตร

4.3.5 การตรวจวัด activity ของเอนไซม์ ในปลาโดยใช้เทคนิคทาง Spectrophotometry และ Spectrofluorometry

4.3.5.1 ขั้นตอนการตรวจวัดเอนไซม์

- วัด EROD อ้างอิงและปรับปรุงจากวิธีของ Pohl และ Fouts (1980) โดยทำปฏิกิริยากันโดยเติมสารละลาย PBS buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร และ สารละลาย ethoxyresorufin ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 20 ไมโครลิตร และสารละลายที่สกัดจากตับ 20 ไมโครลิตร และเริ่มต้นปฏิริยาโดยเติมสารละลาย NADPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร วัดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Spectrofluorometer ที่ emission wavelength 585 นาโนเมตร และ excitation wavelength 550 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสวัดปฏิริยา ทุก 1 นาที นาน 10 นาที ส่วน blank และ calibration curve ใช้ สารละลาย PBS buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ สารละลาย resorufin แทนสารสกัดจากตับ

- วัด GST อ้างอิงวิธีการของ Habig *et al*., (1974) โดยทำปฏิกิริยากันโดยเติมสารละลาย PBS buffer pH 6.5 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ 90 ไมโครลิตร และสารละลาย CDNB ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ 10 ไมโครลิตร และสารละลาย GSH ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ 20 ไมโครลิตร และเริ่มต้นปฏิริยาโดยเติมสารสกัดจากตับ 50 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วจึงเริ่มวัดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Spectrophotmeter (Plate reader) ใช้ความยาวคลื่น 340 วัดปฏิริยาทุก 1 นาที นาน 5 นาที

- วัด AChE อ้างอิงและปรับปรุงจากวิธีของ Ellman *et al*., (1961) โดยทำปฏิกิริยากันโดยเติมสารละลาย PBS buffer pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 75 ไมโครลิตร และเสารละลาย DTNB ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ 25 ไมโครลิตร และสารละลาย Acetylcholine iodide ความเข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ 25 ไมโครลิตร และเริ่มต้นปฏิริยาโดยเติมสารละลายที่สกัดจากสมอง 25 ไมโครลิตร วัดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Spectrophotmeter (Plate reader) ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส วัดปฏิริยาทุก 1 นาที นาน 5 นาที

- วัด โปรตีน ด้วยวิธี Biuret โดยทำปฏิกิริยากันระหว่างสารละลาย BioQuant (Mercks) และสารสกัดโปรตีนที่เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อย่างน้อย 5 ระดับ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จึงเริ่มวัดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Spectrophotmeter (Plate reader) ใช้ ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร

4.3.6 การตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชน้ำ โดยใช้เทคนิคทาง UV-Spectrophotometry โดยตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ที่ความยาวคลื่น 630 647 และ 664 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

4.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติได้แก่ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Two way ANOVA)

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการทดลอง

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 ปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus*

ลูกปลาตะเพียนขาวที่ซื้อมาใช้ในการทดลองจะมีความยาวเฉลี่ย 3.5 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 1.45 กรัม หลังนำมาเลี้ยงปรับสภาพก่อนทดลองหนึ่งเดือน ลูกปลาจะมีความยาวเฉลี่ย 7.1 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 4.88 กรัม รวมอายุลูกปลาก่อนทดลองเท่ากับ 8 สัปดาห์ และมีค่า condition factor เท่ากับ 0.82-0.88 ตลอดการเพาะเลี้ยงลูกปลาตะเพียนขาว จะเปลี่ยนน้ำในตู้เพาะเลี้ยงปลาทุกๆ 5 วัน ให้อ๊อกซิเจนในน้ำตลอดเวลา ให้ความเข้มแสง 2300-2500 ลักซ์ วันละ 8 ชั่วโมง ให้อาหารวันละหนึ่งมื้อด้วยอาหารปลาสำเร็จรูปชนิดลอยน้ำ (ซึ่งได้ทำการตรวจวิเคราะห์แล้วไม่พบสารพิษตกค้าง) และน้ำที่ใช้เลี้ยงลูกปลาจะต้องมีค่า pH ระหว่าง 6.5 - 8.5 อุณหภูมิ 30±5 องศาเซลเซียส ค่าไนเตรทไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าคลอรีนไม่เกิน 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความกระด้างทั่วไป (general hardness) ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ค่าความกระด้างชั่วคราว (carbonate hardness) อยู่ระหว่าง 50 ถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 1 ลูกปลาตะเพียนขาว อายุ 2 เดือน



ภาพที่ 2 สาหร่ายหางกระรอกที่ใช้ในการทดลอง

1.2 พืชน้ำ

1.2.1 สาหร่ายหางกระรอก *Hydrilla verticillata (L.F.) Royle*

สาหร่ายหางกระรอกที่นำมาใช้ในการทดลอง จะเก็บมาจากแหล่งน้ำบริเวณพื้นที่ทำการเกษตร โดยตัดเฉพาะส่วนยอดความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร มาล้างน้ำให้สะอาด และนำมาเลี้ยงใน อาหารเลี้ยง Soil extract medium นานหนึ่งสัปดาห์ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น

แตกต่างกัน เพื่อคัดเลือกหาอาหารเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายหางกระรอกมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งพบว่า อาหารเลี้ยง Hoaglan's medium ครึ่งสูตร ทำให้สาหร่ายหางกระรอกมีการเจริญเติบโตดีที่สุด จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงชนิดนี้ในการทดสอบ chlorpyrifos กับ สาหร่ายหางกระรอก รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ปัจจัยและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายหางกระรอก *H. verticillata (L.F.) Royle*

ปัจจัย	รายละเอียด			
pH	6.7±0.5			
ความเข้มแสง	2330 ลักซ์			
ปริมาณแสง	8 ชั่วโมง ต่อวัน			
อุณหภูมิ	30±5 องศาเซลเซียส			
การให้อ๊อกซิเจน	ใช้วิธีเขย่า flask ด้วยมือวันละ 1 ครั้ง			
ชนิดอาหารเลี้ยง	FHM	HHM	SEM	HHM+SEM
อัตราการเจริญสัมพัทธ์ (Relative growth rate (%)) ต่อ 3 สัปดาห์	22.02	116.90	69.29	40.29

หมายเหตุ :

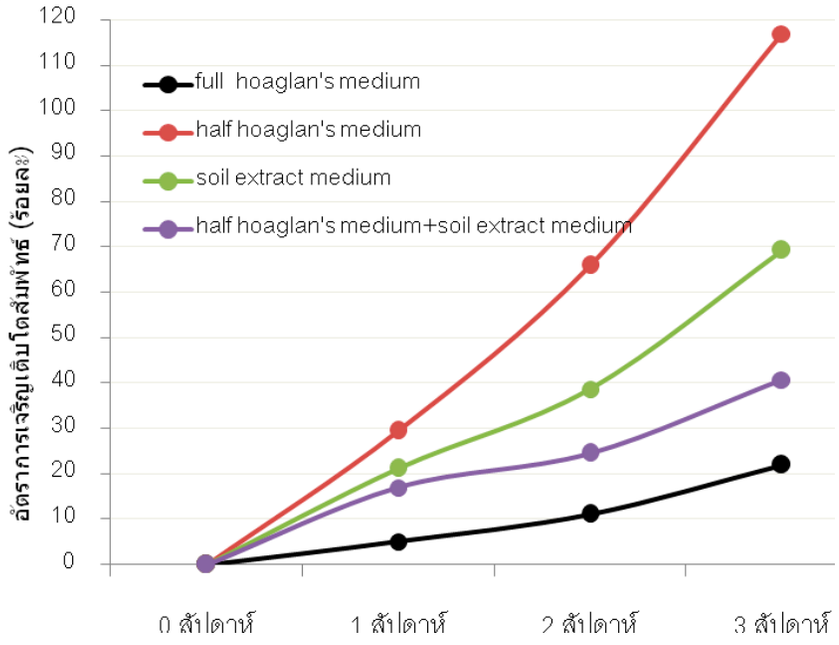
FHM = อาหารเลี้ยง Hoaglan's medium เต็มสูตร (Full Hoaglan's medium)

HHM = อาหารเลี้ยง Hoaglan's medium ครึ่งสูตร (Half Hoaglan's medium)

SEM = อาหารเลี้ยง Soil extract medium (Soil extract medium)

HHM+SEM = อาหารเลี้ยง Hoaglan's medium ครึ่งสูตร + อาหารเลี้ยง

(Soil extract medium = Half Hoaglan's medium + Soil extract medium)



ภาพที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative growth rate (%))ของสาหร่ายหางกระรอก สกุล *H. verticillata (L.F.) Royle* เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่แตกต่างกัน

1.3 ค่าการปลดปล่อย (Leaching) และการสลายตัว (Degradation) ของสารพิษคลอไพรีฟอสในตะกอน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

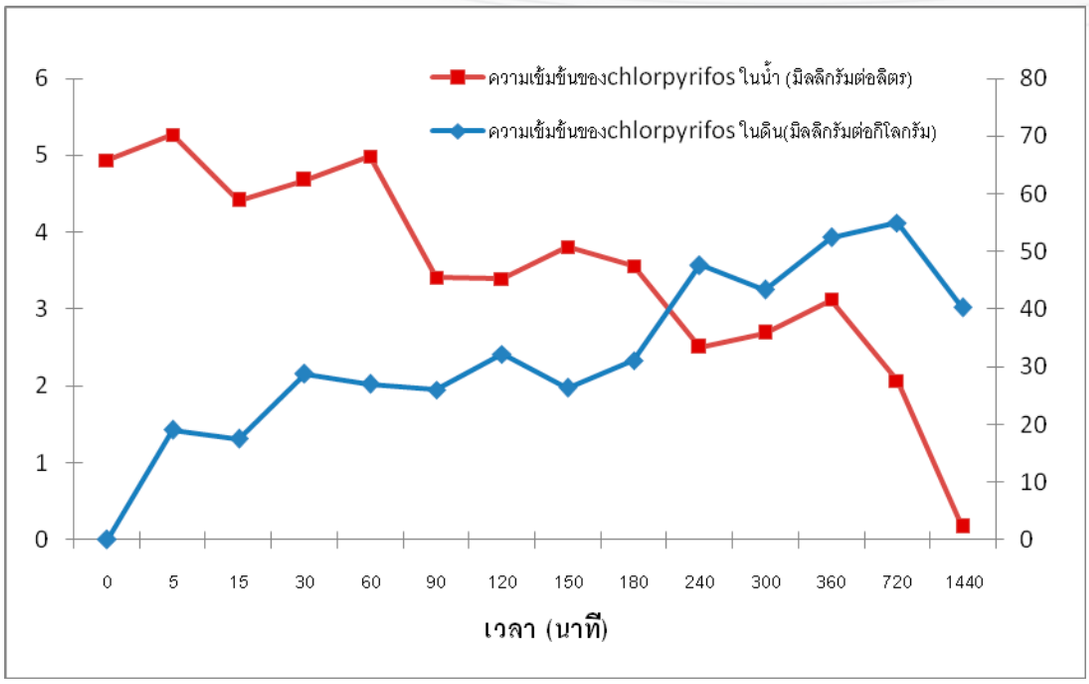
ตารางที่ 2. แสดงค่าการปลดปล่อย (Leachability) ของสารพิษ chlorpyrifos จากตะกอนและการสลาย (Degradation) ของ สารพิษ chlorpyrifos ในน้ำ

พารามิเตอร์	ผลการทดลอง
Leachability	ตะกอนหยาบ* : การจับและปลดปล่อยสารพิษ chlorpyrifos ผกผันกับระดับความเข้มข้น (recovery เฉลี่ย = 94.5%)
	ตะกอนละเอียด** : มีการจับและปลดปล่อยสารพิษ chlorpyrifos คงที่ (recovery เฉลี่ย = 77.52%)
Degradation***	-การคงทนของสารพิษ chlorpyrifos ในน้ำที่อุณหภูมิปกติ ประมาณ 3 วัน (มลิสา และคณะ, 2551) -การคงทนของสารพิษ chlorpyrifos ในตะกอนที่อุณหภูมิปกติ จะลดลงเฉลี่ย 29.2 % โดยการลดลงของ chlorpyrifos จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของสารพิษ chlorpyrifos ในน้ำ เท่ากับ 52.28% แสดงให้เห็นว่า สารมีการสลายตัวไป โดยประมาณ 19 %

* size particle อยู่ระหว่าง 100 ไมครอน และ 2 มิลลิเมตร

** size particle ≤ 100 ไมครอน

*** ใช้วิธี ที่ดัดแปลงมาจาก วิธี Shake flask test (ASTM, 2008)



ภาพที่ 4 จลศาสตร์ของสารพิษ chlorpyrifos ในน้ำและตะกอน

1.4 ประสิทธิภาพการได้กลับคืน (Recovery) ของสารพิษ chlorpyrifos ในตัวอย่างน้ำตะกอนหยาบ ตะกอนละเอียด ปลาตะเพียนขาว และสาหร่ายหางกระรอกพบในทุกชนิดตัวอย่าง มีค่าการเอากลับคืน อยู่ในช่วงร้อยละ 70–110 ซึ่งแสดงว่าวิธีที่ใช้ในการสกัดมีความเหมาะสม รายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ประสิทธิภาพการได้กลับคืน (Recovery) ของการสกัดสารพิษ chlorpyrifos ในตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่าง	ค่าการเอากลับคืน (Recovery) (ร้อยละ)
น้ำ	86 - 95
ตะกอน*	84 – 102
- หยาบ**	94
- ละเอียด***	78
ปลาตะเพียนขาว	84 - 88
สาหร่ายหางกระรอก	99 - 112

* ช่วงค่าการเอากลับคืนของสารพิษ chlorpyrifos ในตะกอนที่มีทั้งตะกอนละเอียดผสมอยู่กับตะกอนหยาบ

** ขนาดของอนุภาค อยู่ระหว่าง 100 ไมครอน และ 2 มิลลิเมตร

*** ขนาดของอนุภาค น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 ไมครอน

2. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อปลาตะเพียนขาว

จากการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันของสารพิษ chlorpyrifos ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 หรือค่า Lethal concentration (LC_{50}) ภายในเวลา 96 ชั่วโมง (96-h LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 0.1053 มิลลิกรัมต่อลิตร และภายในเวลา 72 ชั่วโมง (72-h LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 0.567 มิลลิกรัมต่อลิตร รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรมเมื่อได้รับสารพิษ chloropyrifos จะสังเกตุเห็นปลาเสียการทรงตัวและการขยับเหงือกจะถี่ขึ้น

ตารางที่ 4. แสดงพารามิเตอร์ในการทดสอบผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อปลาตะเพียนขาว *P. Gonionotus*

ชนิดปลา	น้ำหนัก (ค่าเฉลี่ย) หน่วย:กรัม	ความยาว หน่วย:ซม.	จำนวนปลาต่อทรีทเม้นท์ หน่วย:ตัว	ช่วงความเข้มข้น หน่วย: มก./ลิตร (ระดับ)	72-h LC_{50} (มก./ลิตร)	96-h LC_{50} (มก./ลิตร)
ปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus*	4.88	6- 8	10	0.005 – 5 (5)	0.567	0.1053

3. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อสาหร่ายหางกระรอก *H. verticillata (L.F.) Royle*

จากการทดลองให้สารพิษ chlorpyrifos ความเข้มข้น 0, 0.09615, 0.9615, 9.615 และ 19.303 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของสาหร่ายหางกระรอกในชุดความเข้มข้น 0 และ 0.09615 มิลลิกรัม/ลิตรไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนในชุดความเข้มข้นอื่นๆ อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของสาหร่ายหางกระรอกจะลดลงสอดคล้องกับการตายของเซลล์สาหร่าย โดยจะสังเกตุพบการตายของเซลล์สาหร่ายได้อย่างชัดเจนในชุดความเข้มข้น 19.303 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ในน้ำจะลดลงตามจำนวนวันหลังจากให้สารพิษ chlorpyrifos และแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ที่ตรวจพบในสาหร่ายหางกระรอก ความสามารถในการสะสมสารพิษในสิ่งมีชีวิตหรือค่าการสะสมสารพิษในสิ่งชีวิต (Bioconcentration factor; BCF value) พบว่ามีค่าลดลงแปรผกผันตามกับปริมาณความเข้มข้น (ตารางที่ 5) จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถอนุมานได้ดังนี้

1. เมื่อสาหร่ายหางกระรอกได้รับสารพิษความเข้มข้นสูงกว่า 0.9615 มิลลิกรัมต่อลิตร จะแสดงผลกระทบที่เกิดขึ้นอย่างเด่นชัดคือ

1.1 อัตราการเจริญเติบโตลดลง และปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลง เนื่องมาจากการตายของเซลล์

1.2 ความสามารถในการสะสมสารพิษลดลง อาจเนื่องมาจากการทำงานของเซลล์รบกวน โดยสังเกตุจากปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลง

1.3 การแตกยอดและการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นถึงความสามารถในขบวนการล้างพิษ (detoxification) นั้นถูกรบกวน จึงทำให้จำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวการแตกหน่อใหม่ก็เกิดขึ้นตามกลไกการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด ซึ่งลักษณะการแตกยอดจะแตกต่างกับลักษณะการแตกยอดของสาหร่ายหางกระรอกในภาวะปกติ

2. เมื่อสาหร่ายหางกระรอกได้รับสารพิษความเข้มข้นต่ำกว่า 0.9615 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไม่มีผลกระทบต่อสาหร่ายหางกระรอก

ตารางที่ 5 ผลของ chlorpyrifos ที่มีต่อสาหร่ายหางกระรอก *H. verticillata (L.F.) Royle* หลังจากให้ chlorpyrifos เป็นเวลา 7 วัน

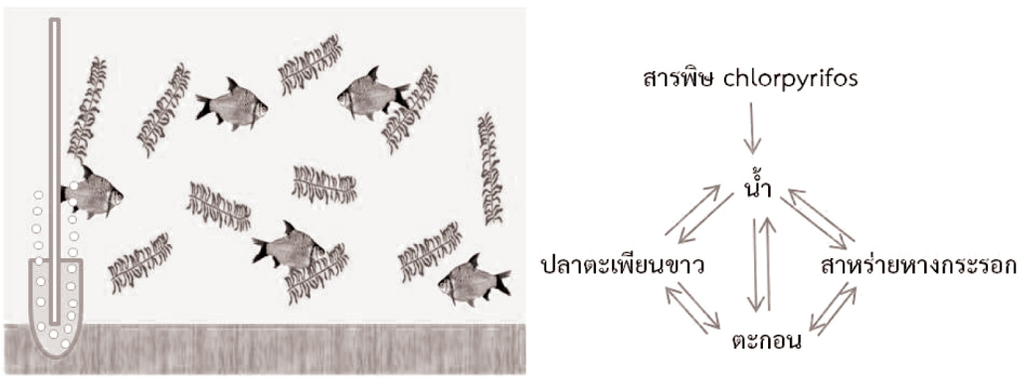
ความเข้มข้นของ chlorpyrifos	จำนวนวัน	อัตราการเจริญเติบโต (ร้อยละ)	chlorpyrifos ที่เหลือในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	chlorpyrifos ที่สะสมในสาหร่าย (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	BCF**	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	การตายของเซลล์สาหร่าย
0 มิลลิกรัมต่อลิตร	0 วัน	-	ไม่พบ*	ไม่พบ*	-	4.473±0.015	ไม่พบ
	3 วัน	99.140				5.082±0.011	
	7 วัน	112.910				6.864±0.009	
0.09615 มิลลิกรัมต่อลิตร	0 วัน	-	0.0946±0.009	-		4.849±0.014	+
	3 วัน	98.020	0.0505±0.014	0.521±0.0211	10.317	5.331±0.08	+
	7 วัน	105.600	0.0122±0.009	0.169±0.038	13.852	7.242±0.054	ไม่พบ
0.9615 มิลลิกรัมต่อลิตร	0 วัน	-	0.921±0.050	-		4.387±0.011	ไม่พบ
	3 วัน	35.370	0.359±0.076	3.723±0.1773	10.371	4.303±0.017	++
	7 วัน	65.660	0.0296±0.039	1.361±0.0962	45.98	2.481±0.089	+
9.615 มิลลิกรัมต่อลิตร	0 วัน	-	9.050±0.107	-		5.385±0.021	ไม่พบ
	3 วัน	23.980	5.275±0.420	37.037±9.70	7.021	3.464±0.011	+++
	7 วัน	-7.780	2.538±0.266	8.772±5.087	3.436	1.533±0.020	++++
19.303 มิลลิกรัมต่อลิตร	0 วัน	-	18.56±3.353	-		4.995±0.012	ไม่พบ
	3 วัน	-0.630	16.314±3.110	54.001±6.696	3.31	1.930±0.009	++++
	7 วัน	-19.450	10.733±1.193	15.653±7.180	1.458	1.291±0.011	+++++

* ค่าที่วัดได้ต่ำกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

**BCF คือ ค่าดัชนีการสะสมสารพิษ (Bioconcentration factor, BCF value

4. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อปลาตะเพียนขาว *P. gonionotu* และ สาหร่ายหางกระรอก *H. verticillata (L.F.) Royle* ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลอง

จากการทดลองให้สารพิษ chlorpyrifos ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ(0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลาง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลองที่ประกอบด้วย น้ำ ตะกอน ปลาตะเพียนขาว และสาหร่ายหางกระรอก (ภาพที่ 5) พบว่าการสะสมของสารพิษ Chlopyrifos ในปลา สาหร่ายหางกระรอก และตะกอนจะเพิ่มขึ้นและแปรผันผกผันต่อการลดลงของสารพิษในน้ำ



ภาพที่ 5 สภาวะและปัจจัยในการทดลอง และแสดง pathway ของสารพิษ chlorpyrifos

ค่าดัชนีการสะสมสารพิษในสิ่งมีชีวิต (BCF value) ในสาหร่ายหางกระรอก มีแนวโน้มลดลงแปรผันตามปริมาณความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบค่า BCF value ของสาหร่ายหางกระรอกที่ทดลองในสภาวะที่มีสิ่งมีชีวิตชนิดเดียว (single specie test) กับทดลองในสภาวะระบบนิเวศน์จำลอง พบว่าค่า BCF ของสาหร่ายหางกระรอกที่ทดลองในสภาวะระบบนิเวศน์จำลอง จะมีค่าสูงมากกว่า (110.182) ที่ระดับความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ต่ำๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นที่ต่ำระดับนี้ยังไม่เพียงพอต่อการทำให้เกิดผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์ที่สังเกตุเห็นได้ และกลไกการสะสมในสาหร่ายจึงเกิดขึ้นได้ดี และอาจเนื่องมาจากสารพิษบางส่วนในน้ำอาจถูกเปลี่ยนรูปแบบสารพิษ (Biotransformation process) โดยปลาตะเพียนขาว รวมทั้งอาจเกิดการสลายตัวโดยปัจจัยทางกายภาพด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายหางกระรอกจะแปรผกผันตามระดับความเข้มข้น และพบว่าความเข้มข้นสารพิษ chlorpyrifos ที่ต่ำกว่า 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด

ค่าดัชนีการสะสมสารพิษ (BCF value) ในปลาตะเพียน มีแนวโน้มลดลงแปรผันตามปริมาณความเข้มข้นโดยมีค่า BCF value สูงสุด (34.27) ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าค่า 96-h LC_{50} ประมาณ 20 เท่า) อาจจะบ่งบอกได้ว่าระดับความเข้มข้นดังกล่าวนี้ยังไม่ไปรบกวนต่อการทำงานของกระบวนการเปลี่ยนรูปแบบสารพิษ (Biotransformation process) การสะสมสารพิษในเซลล์จึงยังสามารถเกิดขึ้นได้ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของกระบวนการเปลี่ยนรูปแบบสารพิษ (Biotransformation process) มากขึ้น ส่งผลให้ความสามารถ

ในการสะสมสารพิษในเซลล์ลดลง (ซึ่งสอดคล้องกันกับระดับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน)

การเกิดการสะสม(accumulation)ของสารพิษ chlorpyrifos ในตะกอน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มคงที่หากระดับความเข้มข้นเกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้สามารถอธิบายผลการทดลองดังกล่าวด้วยผลการทดลองการยึดจับและการปลดปล่อยสารพิษจากตะกอนว่าการสะสมน่าจะขึ้นอยู่ขนาดของอนุภาคของตะกอน และปริมาณสารพิษที่ได้รับ

ตารางที่ 6 ผลของ chlorpyrifos ที่มีต่อปลาตะเพียนขาว หลังจากให้ chlorpyrifos เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลอง (จำนวนปลา 5 ตัว และจำนวนท่อนสาหร่าย 10 ท่อน)

	0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม)[1]	**0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (ระดับต่ำ)**[2,a]	**0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ระดับกลาง)**[2,b]	**5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ระดับสูง)**[2,c]
chlorpyrifos ในน้ำ (มก./ลิตร)	ไม่พบ*	0.011±0.007	0.341±0.022	2.853±0.024
chlorpyrifos ในปลาตะเพียนขาว (มก./กก.)	ไม่พบ*	0.377±0.03	0.939±0.044	1.398±0.097
chlorpyrifos ในสาหร่ายหางกระรอก (มก./กก.)	ไม่พบ*	1.212±0.121	6.325±0.385	11.508±1.92
chlorpyrifos ในตะกอน (มก./กก.)	ไม่พบ*	1.310±0.093	11.879±0.77	10.721±0.294
chlorophyll ในสาหร่ายหางกระรอก (มก./กก.)	3.948±0.015	8.342±0.123	4.432±0.019	5.525±0.077
$BCF_{ปลา}$	-	34.27	2.75	0.490
$BCF_{สาหร่ายหางกระรอก}$	-	110.182	12.997	4.033
AChE** (nmole/min/mg protein)	0.29±0.01	0.27±0.02	0.25±0.02	0.13±0.01
GST*** (mmole/min/mg protein)	1.66±0.20	2.18±0.14	2.91±0.33	4.36±0.45
EROD**** (pmole/min/mg protein	0.81±0.011	4.399±0.086	8.585±0.072	14.101±0.12

* ค่าที่วัดได้ต่ำกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

** AChE ; Acetylcholinesterase enzyme actvity

***GST ; Glutathione-*S*-Transferase enzyme activity

**** EROD ; Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase enzyme activity

ตัวเลขแตกต่างกันหมายถึง สารพิษ chlorpyrifos มีผลกระทบต่อชุดควบคุม chlorpyrifos และชุดทดลอง chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตัวอักษรต่างกันแสดงว่า ระดับความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อปริมาณของสารพิษในน้ำ ตะกอน ปลาตะเพียนขาว สาหร่ายหางกระรอก ค่า BCF และการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์อย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

สารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนต่อระดับเอนไซม์ทั้งสองชนิด ได้แก่ Acetylcholinesterase และ Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase ส่วนGlutathione-*S*-transferase จะเพิ่มขึ้นอย่างไม่ชัดเจน และเกือบไม่มีความแตกต่างที่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos สูงๆ (ตารางที่ 6) ซึ่งการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนของ Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase และการยับยั้งอย่างชัดเจนของ Acetylcholinesterase ในภาวะที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ อาจบ่งบอกได้ถึงความจำเพาะ(specific) ต่อสารพิษ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เหมาะที่จะคัดเลือกมาใช้เป็นดัชนีชีวภาพสัมผัสของสารนั้นๆ (Biomarker of exposure) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆ ที่ได้รายงานไว้ว่า Acetylcholinesterase จัดเป็นดัชนีชีวภาพสัมผัสของสารพิษกลุ่ม organophosphorus อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีสารพิษมากกว่าหนึ่งกลุ่ม (ซึ่งอาจมีกลุ่ม organophosphorus ด้วย) การเลือกตรวจวัดระดับเอนไซม์ Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase น่าจะเหมาะสมกว่าเอนไซม์ Acetylcholinesterase เพราะมีความไว ชัดเจนและครอบคลุมในการตรวจวัดผลกระทบที่เกิดขึ้น สำหรับเอนไซม์ Glutathione-*S*-transferase อาจจะมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารพิษในสภาวะที่มีสารพิษหลายกลุ่มที่มีความเข้มข้นมาก และไม่ต้องการความจำเพาะเจาะจงมากนัก

ความสัมพันธ์ของการเกิดพิษวิทยาของ chlorpyrifos ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ สามารถอธิบายด้วยพฤติกรรมที่ผิดปกติของปลาตะเพียนขาวและการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ กล่าวคือ ผลกระทบของ chlorpyrifos ต่อปลาตะเพียนขาวขึ้นอยู่กับปริมาณของ chlorpyrifos ในขณะที่สาหร่ายหางกระรอก(ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้เป็นตัวแทนของพืชน้ำ) ผลกระทบที่เกิดขึ้นจะแสดงให้เห็นเมื่อได้รับ chlorpyrifos ปริมาณมากๆ เท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพืชน้ำสามารถนำ phosphorus ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารพิษกลุ่ม organophosphorus มาใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการให้ chlorpyrifos ความเข้มข้นต่ำๆ แก่สาหร่ายหางกระรอกจึงทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น และความเป็นพิษของ chlorpyrifos ต่อสาหร่ายหางกระรอก จะตรวจพบได้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ได้แก่ การตายของเซลล์ และจำนวนการแตกยอดใหม่ของสาหร่ายหางกระรอก



ภาพที่ 6 แสดงเซลล์สาหร่ายที่ตายและการแตกยอดใหม่หลังได้รับ chlorpyrifos ความเข้มข้นสูงๆ



ภาพที่ 7 แสดงผลของchlorpyrifosต่อพฤติกรรมของปลาตะเพียนขาว

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดพิษวิทยาต่อปลาตะเพียนขาว และสาหร่ายหางกระรอก ในสภาวะการทดลองที่มีสิ่งมีชีวิตชนิดเดียว (single species test) และสภาวะการทดลองแบบระบบนิเวศจำลอง จะมีความแตกต่างกัน โดยในระบบนิเวศจำลอง ความเป็นพิษของ chlorpyrifos จะน้อยกว่าสภาวะการทดลองที่มีสิ่งมีชีวิตชนิดเดียว ทั้งนี้อาจสรุปได้พิษวิทยาของ chlorpyrifos นอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษ การรับสัมผัส แล้วยังขึ้นอยู่กับปัยจัยที่สำคัญ คือ ปัจจัยในระบบนิเวศน์ ที่สามารถส่งเสริมความเป็นพิษหรือหักล้างความเป็นพิษได้ ดังนั้นการทราบถึงปัจจัยดังกล่าว จะทำให้สามารถการอธิบายถึงการถ่ายทอดสารพิษในห่วงโซ่ได้

ปัจจัยในระบบนิเวศจำลองที่มีส่วนต่อของการเกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ปัจจัยจากสิ่งมีชีวิตเอง เช่น กลไกการเกิด metabolism และ biotransformation ของ chlorpyrifos ในปลา และสาหร่ายหางกระรอก ทำให้ได้สาร metabolites หรือ by products compounds ที่มีความเป็นพิษน้อยลง และเมื่อ re-exposure ด้วยสาร metabolites หรือ by products compounds ความเป็นพิษจะยิ่งลดน้อยลงไป (ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า Recovery process) นอกจากนี้ปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ เช่น แสง อุณหภูมิ อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง) ก็สามารถทำให้ chlorpyrifos เกิดการสลายตัวได้มากหรือน้อย ช้าหรือเร็ว ซึ่งจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงต่อความเป็นพิษของ chlopyrifos เช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

1. การยึดติด-ปลดปล่อยสารพิษ chlorpyrifos จากตะกอน ขึ้นอยู่อนุภาคของตะกอน โดยอนุภาคของตะกอนเล็กจะมีอัตราการจับ-ปลดปล่อยสารพิษคงที่
2. การคงทนของสารพิษ chlorpyrifos ในสภาวะจำลอง (ประกอบด้วยน้ำและตะกอน) ที่อุณภูมิปกติจะมีแนวโน้มลดลงเร็วมากกว่าสารพิษ chlorpyrifos ในสภาวะจำลองที่ประกอบด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว
3. สารพิษ chlorpyrifos ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันจะมีผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมของปลาที่คล้ายคลึงกัน คือ ปลาเสียการทรงตัว และการขยับเหงือกจะถี่ขึ้น

4. การเพิ่มการสะสมของสารพิษ chlopyrifos ในปลาตะเพียนขาว และสาหร่ายหางกระรอกจะแปรผันตามการลดลงของสารพิษในน้ำ ในขณะที่ตะกอนมีแนวโน้มการสะสมเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้นข้นระดับต่ำ และจะคงที่ที่ระดับความเข้มข้นปานกลางและสูง
5. สารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดโดย Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase เพิ่มขึ้น และยับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterse อย่างเด่นชัดได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ต่ำๆ แต่การกระตุ้นทำงานของ Glutathione-*S*-transferase จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของสารพิษ Chlorpyrifos สูงๆ
6. การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์จะแปรผันตามระดับความเข้มข้น และพบว่าความเข้มข้นสารพิษ cholrpyrifos ที่มากกว่า 0.96515 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสังเกตุเห็นผลกระทบที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน คือ การตายของเซลล์สาหร่าย และการเพิ่มการแตกยอดของเซลล์สาหร่าย
7. ผลกระทบของสารพิษ chlorpyrifos ในสภาวะระบบนิเวศจำลอง ต่อปลาตะเพียนขาวและสาหร่ายหางกระรอกจะน้อยกว่าผลกระทบของสารพิษ chlorpyrifos ต่อสาหร่ายหางกระรอกและปลาตะเพียนขาวที่ทดลองในสภาวะเดียว (single specie test)
8. การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase และ Acetylcholinesterse เป็นเทคนิคที่เหมาะสมเพราะสามารถตรวจหาผลกระทบในกรณีที่มีสารพิษปริมาณน้อยๆ ได้

การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาตัวชี้วัดด้านพิษวิทยา (Biomarker) เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือใช้ในการตรวจติดตามผลกระทบจากวัตถุมีพิษทางการเกษตรที่มีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

มลิสา เวชยานนท์ และพงศ์ศรี ใบอดุลย์ 2551. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในน้ำโดยใช้ Gas chromatograph กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997 TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CHLORPYRIFOS. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. Atlanta, Georgia

Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajbasher, D., and Schenck, F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partioning and “Dispersive solid-Phase Extraction” for determination of Pesticide Residues in Produce. J.AOAC. vol.86 no.2 p.412-431

APHA, 2001. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed. American Public Association/America Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC.

ASTM Standard on Biological Effects and Environmental Fate, 2008 (reapproved edition)

Back C.A. 1965. “Method of soil analysis: part I physical and mineralogical properties”. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Deniele Werck-Reichhart , Alain Hehn and Luc Didierjean. 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance; a review.Trend in plant science.5(3);116-123

Ellman, G.L.,Courtney,K.D.,Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A new rapid colorimetric deterrmination of acetylcholinesterase activity. J. Biochemistry and Pharmacology. 7:88-95

Feel Sun, Feng-Yi Lin, Sue-Sun Wong and Gwo-Chen Li.2000. Determination of Organochlorine and Nitrogen-Containing Pesticide Residues in Fish with Different Fat Content. Journal of food and drug analysis.8(2):103-111

Holfman D.J. and the others. 1995. Handbook of Ecotoxicology. CRC Press Inc.

Michael A. Lewis. 1994. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review . Environmental pollution. 87:319-336

Milan Jokanovic. 2001. Biotransformation of Organophosphorus compounds. Toxicology. 166:139-160

Muhammad Zafar, Yasmin Mussaddeq, Shamin Akhter and Aneesa Sutan. 2003. Weight-length and Condition Factor Relationship of thaila, Catla catla from Rawal Dam Islamabad, Pakistan. Pakistan Journal of Biological Sciences. 6(17):1532-1534

PAN Huiyun, LI Xiaolu, XU Xiaohua and GAO Shixiang. 2009. Phytotoxicity of four herbicides on Ceratophyllum demersum, Vallisneria natans and Elodea nuttallii. Journal of Environmental Sciences. 21; 307-312

Ron Van Der Oost, Jonny Beyer and Nico P.E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and Biomarkers in environmental risk assessment: a review. Envi. Toxico.&Pharmaco. 13:57-149

TNO 1993. Standard Operation Procedure, zeist-The Netherlands

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ในน้ำ

Method Development of Carbamate Insecticide Analysis in Water

ผกาสินี คล้ายมาลา เอกราช สิทธิมงคล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

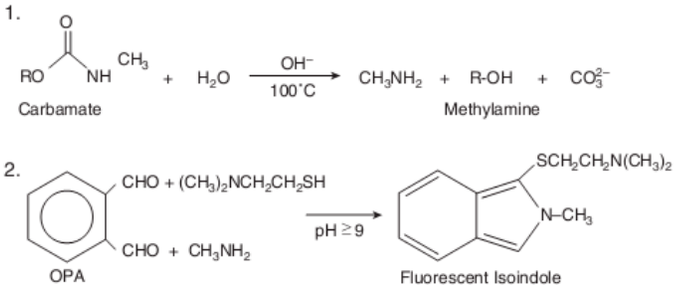
บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ (Method Development) เป็นการเลือกวิธีวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ และให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยใช้วิธีสกัด 3 วิธีการ ได้แก่ Separatory funnel shaker, Homogenizer และ Solid phase extraction (SPE) สารละลายที่ใช้ในการสกัดได้แก่ Ethyl acetate นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Fluorescence detector ที่ต่อกับ Post column Derivatizer (FL-PCD) สารกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamate 8 ชนิด ได้แก่ methomyl, metolcarb (MTMC), carbofuran, carbaryl, isoprocarb (MIPC), methiocarb, funobucarb (BPMC) และ promecarb พบว่าการใช้ Separatory funnel shaker ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (Working range) ได้ช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) อยู่ในช่วง 0.22–8.75 ไมโครกรัม/ลิตร Correlation coefficient หรือ r = 0.996-0.998 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) พิจารณาจาก Recovery ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ พบว่าความเข้มข้นระดับต่ำ (Low concentration) 0.22–0.28 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ Recovery ในช่วง 88–100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นระดับกลาง (Medium concentration) 1.31–1.72 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ Recovery ในช่วง 77–100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นระดับสูง (High concentration) 4.37–5.71 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ ในช่วง 73–105 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) มีค่า 0.028 – 0.078 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ของวิธีทดสอบ 0.10 – 0.26 ไมโครกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการทดสอบของห้องปฏิบัติการ การประเมินผลการทดสอบค่าต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ และควรตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ก่อนนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

คำนำ

สารกำจัดแมลงในกลุ่ม Carbamate เป็นสารที่มีการใช้ในการควบคุมกำจัดศัตรูพืชผลทางการเกษตรหลายชนิด เนื่องจากมีพิษเฉียบพลันสูงต่อแมลง พิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (low toxic effects on mammalians) และไม่คงทนในสิ่งแวดล้อม (low environmental persistence) แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase บางสารยังมีข้อสงสัยว่าอาจก่อให้เกิดมะเร็งหรือก่อการกลายพันธุ์ (Koc, F. *et al*., 2008) ซึ่งจะเพิ่มความเสี่ยงต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม แม้ว่าสารในกลุ่มนี้บางชนิดมีการสลายตัวเร็ว แต่ยังมีรายงานการตรวจพบสารพิษตกค้างของสารกลุ่มนี้บางชนิดในตัวอย่างผลิตผลและสิ่งแวดล้อม

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงในกลุ่ม Carbamate มีการใช้เทคนิคและเครื่องมือในการตรวจวัดได้หลายชนิดเช่น Gas Chromatography ชนิด Nitrogen Phosphorus Detector (GC-NPD), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), High Performance Liquid Chromatography-Mass spectrometer (HPLC-MS or MS/MS) และ Gas Chromatography-Mass Selective Detector (GC-MS) โดยการตรวจวิเคราะห์ซึ่งใช้เครื่อง HPLC จะมีการตรวจวัดได้ด้วย Diode Array Detector (DAD) และ Post column Derivatizer ที่ต่อกับ Fluorescence Detector (FL-PCD) โดยการตรวจวัดทั้ง 2 แบบ ให้ความไว (Sensitivity) ต่างกัน สำหรับ Post column derivatizer นั้น ใน reactor จะมีการเปลี่ยนรูปของสารในกลุ่ม Carbamate แล้วปลดปล่อยสารเรืองแสง โดยปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกมี Sodium hydroxide (NaOH) ที่อุณหภูมิใน reactor 100 องศาเซลเซียส (°C) ให้สารพวก alcohol, carbonate และ methylamine ขั้นต่อมาเกิดปฏิกิริยาของ methylamine กับ *o*-phthalaldehyde (OPA) และ nuclophilic thiofluor™ จะเปลี่ยนอยู่ในรูปของสาร highly fluorescence คือ 1-methyl-2-alkylthioisoindole derivative ซึ่งตรวจวัดได้โดย Fluorescence Detector ที่ให้ความไว (sensitivity) และการแยก (Selectivity) ที่เหมาะสม รวมถึงลดการเกิดของสารปนเปื้อน (reduction of interference)



ภาพที่ 1 การเกิดปฏิกิริยา (1) hydrolysis และ (2) derivatization ของสารกลุ่ม Carbamate (Pickering Laboratories, Inc., 2000)

การเลือกใช้ mobile phase ใน Pickering Laboratories, Inc., (2000) และ EPA Method 632, USEPA method 531.1, 531.2 หรือ AOAC Protocol 29.A05 ใช้ Column C18 หรือ C8 ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม Carbamate โดยใช้ได้ทั้ง water/ acetonitrile gradient และ Water/ methanol gradient และบาง method มีการใช้ BDMC เป็น internal standard สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกตรวจวิเคราะห์เฉพาะสารกลุ่ม Carbamate 8 ชนิด ได้แก่ methomyl, metolcarb (MTMC), carbofuran, carbaryl, isoprocarb (MIPC), methiocarb, funobucarb (BPMC) และ promecarb และยังไม่มีการเติม internal standard

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารมาตรฐานและสารเคมี ได้แก่

1.1 วัสดุและสารเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัด เช่น Ethyl acetate (AR grade), Acetonitrile, Water (HPLC grade), 0.45 ไมโครเมตร PTFE filter และ Sodium sulphate (Na_2SO_4) สารสำหรับใช้เตรียมสารมาตรฐานและปรับปริมาตรตัวอย่างใช้ Acetonitrile, Methanol และ Water (HPLC grade) สารที่ใช้เตรียมเป็น Derivertization reagent ได้แก่ *o*-Phthalaldehyde, Hydrolysis reagent (0.5 M sodium hydroxide, NaOH), Thioflour™, OPA diluents (0.05 M Sodium borate buffer solution) และ ChlorAC buffer

1.2 สารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ methomyl, metolcarb (MTMC), carbofuran, carbaryl, isoprocarb (MIPC), methiocarb, funobucarb (BPMC) และ promecarb ที่มีความบริสุทธิ์สูง 95.50 – 99.0 เปอร์เซ็นต์

1.3 น้ำที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ น้ำกลั่น

1.4 SPE (Solid Phase Extraction) Envi Chrom P ขนาด 0.25 กรัม ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

2. เครื่องแก้วและเครื่องมือชนิดต่างๆ

2.1 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น Beaker, Cylinder, Erlenmeyer flask, Separatory Funnel, Round bottom flask, Disposable pipette, Vial, Volumetric flask, Volumetric pipette และอุปกรณ์ที่ใช้ในการกรองสารละลาย

2.2 เครื่องมือ เช่น Vertex mixer, Homogenizer, Separatory funnel shaker และ Solid phase extraction apparatus, เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ PCX 5200 (Post column derivatizer) ต่อกับ N_2 gas

วิธีการ

1. การเตรียมสารมาตรฐาน

1.1 การเตรียม Stock standard solution โดยชั่งสารแต่ละตัว ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียม Intermediate standard solution โดย pipette จาก Stock standard solution เติมสารละลาย Acetonitrile/Water หรือ Methanol/Water ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็น Intermediate standard solution

1.3 การเตรียม Working standard solution เตรียมสารมาตรฐานโดย pipette จาก Intermediate standard solution เติมสารละลาย Acetonitrile/Water ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นสารละลายผสม (Mixed working standard solution) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (Low concentration) กลาง (Medium concentration) และ สูง (High concentration)

2. การเตรียม Fortified sample, Sample blank และ Reagent blank

การเตรียม Fortified sample ทำโดยตวงน้ำใส่ cylinder ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ Erlenmeyer flask หรือ Separatory funnel ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น pipette Working standard solution ของช่วงที่จะทดสอบของความเข้มข้นแต่ละระดับ เตรียมทั้งในความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง หมุนวนจนสารละลายผสมกับน้ำ

ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง การเตรียม sample blank ทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่เติม Working standard solution ส่วน Reagent blank ใช้ Ethyl acetate ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำด้วย Separatory funnel shaker และ Homogenizer

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารมาตรฐานกลุ่ม Carbamate

Carbamate	Stock **ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)**	Intermediate II **ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)**	Working-Low **ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)**	Working-Medium **ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)**	Working-High **ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)**
methomyl	1,190.02	28.56	0.28	1.72	5.71
metolcarb	1,141.70	25.12	0.25	1.51	5.02
carbofuran	826.41	24.79	0.25	1.49	4.96
carbaryl	691.02	27.64	0.28	1.66	5.53
isoprocarb	1,064.15	25.54	0.25	1.53	5.11
methiocarb	1,579.94	25.27	0.22	1.52	4.37
funobucarb	2,187.90	21.88	0.25	1.31	5.05
promecarb	365.76	21.94	0.25	1.32	4.40

3. การสกัดตัวอย่างน้ำ

3.1 Separatory funnel shaker (In house method, 2550)

นำ Fortified sample จากข้อ 2 มาเติม Ethyl acetate (AR) 100 มิลลิลิตร ลงใน Separatory funnel ปิดฝาเขย่าวนเบาๆ แล้วเปิดปลายเพื่อปล่อยความดัน นำไปเขย่าด้วย Separatory funnel shaker นาน 3 นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น ชั้นที่เป็น Ethyl acetate (AR) นำมากรองผ่าน Na_2SO_4 โดยตัก Na_2SO_4 ใส่กระดาษกรอง วางใน Glass funnel รองรับด้วย Round bottom flask ส่วนชั้นน้ำเทใส่ไว้ ใน Beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปสกัดซ้ำด้วย Ethyl acetate (AR) 50 มิลลิลิตรอีก 2 ครั้ง โดยใช้ Separatory funnel ใบเดิม และกรองผ่าน Na_2SO_4 เพื่อรวมสารละลายลงใน round bottom flask เมื่อกรองครั้งสุดท้ายเสร็จแล้วล้าง Na_2SO_4 ด้วย Ethyl acetate (AR) 10 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่รวมอยู่ใน Round bottom flask ไปลดปริมาตรด้วย Rotary evaporator จนเกือบแห้ง แล้วเติมด้วย Acetonitrile 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง โดยล้างสารละลายออกจาก Round bottom flask หลายๆ ครั้ง ใส่ลงใน Graduated tube จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วย Nitrogen evaporator แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol : Water หรือ Acetonitrile : Water ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน Filter membrane 0.45 ไมโครเมตร นำ Disposable pipette มาดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Vial เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์

3.2 Homogenizer

ตวงน้ำใส่ Cylinder ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ Errenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเท Ethyl acetate (AR) 75 มิลลิลิตร ใส่ใน Cylinder ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมลงใน Errenmeyer flask เขย่าวนเบาๆ นำไปปั่นด้วย Errenmeyer flask นาน 1 นาที เทลง Separatory funnel ตั้งทิ้งให้แยกชั้น ส่วนที่เป็น Ethyl acetate (AR) นำมากรองผ่าน Sodium sulphate ส่วนชั้นน้ำเทใส่ไว้ ใน Beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร นำไปสกัดซ้ำด้วย Ethyl acetate (AR) 50 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง รวมสารละลายลงใน Round bottom flask เมื่อกรองครั้งสุดท้ายเสร็จแล้วล้าง Sodium sulphate ด้วย Ethyl acetate (AR) 10 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่รวมอยู่ใน Round bottom flask ไปลดปริมาตรโดยใช้ Rotary evaporator จนเกือบแห้ง แล้วล้างด้วย Acetonitrile 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง โดยล้างสารละลายออกจาก Round bottom flask หลายๆ ครั้ง ใส่ลงใน Graduated tube ขนาด 12 มิลลิลิตร หรือ 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วย Nitrogen evaporator แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol : Water หรือ Acetonitrile : Water ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน Filter membrane 0.45 ไมโครเมตร นำ Disposable pipette มาดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Vial เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์

3.3 Solid phase extraction apparatus (EPA method 531.2)

ตวงน้ำจากข้อ 2 ใส่ cylinder ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เทใส่ Errenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดด้วย SPE ต่อไป โดยก่อนสกัดต้องทำขั้นตอนของการ Conditioning SPE ด้วย Methanol, Acetronitrile และ Water ก่อนและต้องระวังมิให้ตัว Packing material แห้งและเปิดให้ Flow คงที่ต่อด้วย Sample application โดยเติมตัวอย่างลงใน SPE จนหมดแล้ว Washing SPE จากนั้นทำให้ SPE แห้ง โดยใช้ N_2 เป่าเบาๆ หรือให้แห้งโดยใช้ปั๊มอากาศ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อไป คือ Eluting the analyte โดยชะสารออกจาก SPE ด้วย Acetronitrile ให้ Flow คงที่นำไปปรับปริมาตรด้วย Methanol : Water หรือ Acetonitrile : Water ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน Filter membrane 0.45 ไมโครเมตร นำ Disposable pipette มาดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Vial เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์

4. วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยปรับสภาวะการทำงานของเครื่องมือ ดังนี้

Detector : (1) Diode Array Detector (DAD) Wavelength 220 นาโนเมตร
(2) Fluorescense Detector (FL-PCD) Excitation 330 นาโนเมตร, emission 465 นาโนเมตร และ Excitation 339 นาโนเมตร, emission 445 นาโนเมตร

Column : (1) Zorba x SB C_{18} Particle size 5 ไมโครเมตร, Dimensions (length, ID) 150 x 4.6 มิลลิเมตร
(2) Carbamate analysis C_{18} Particle size 4 ไมโครเมตร, Dimensions (length, ID)150 x 3.9 มิลลิเมตร

Flow rate : 0.8–1.0 มิลลิลิตร/นาที Injection volume : 10 ไมโครลิตร

Column temperature : 35-42 องศาเซลเซียส

Mobile phase : Water/ Methanol/Acetonitrile

Stop time-Post time : Stop time 30 นาที และ Post time 5 นาที Post-column derivatizer:

Reagent 1 : 0.5 โมล NaOH Pump 1 Flow 0.30 มิลลิลิตร/นาที Reactor 1 : 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

Reagent 2 : *o*-Phthalaldehyde และ Thiofluor™ ใน pH 9.1 Borate buffer Pump 2 Flow : 0.30 มิลลิลิตร/นาที

Reactor 2 : 100 ไมโครลิตร ที่ Ambient temperature

5. การทำ System equilibration

หลังจาก Priming ระบบแล้ว เปิด Pump ให้ Mobile phase เข้า Column จนเกิด Equilibrium ทำการ Inject สารละลายมาตรฐานกลุ่ม Carbamate คือ carbaryl ปริมาณ 10 ไมโครลิตร จนกระทั่ง Retention time และ Area มีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของค่าเฉลี่ยของ 3 ครั้งที่ฉีดติดต่อกัน คำนวณค่าเฉลี่ยของ Retention time และ Area ของสารมาตรฐาน เครื่อง HPLC จะพร้อมใช้งาน



ภาพที่ 2 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ที่ต่อกับ Post-column derivatizer

6. การประเมินการยอมรับจากการวิเคราะห์ต่างๆ

6.1 ช่วงของการวัด (Working range) ทดสอบ Reagent blank และ Fortified sample 6 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ช่วงความเข้มข้นของ methomyl 0.28-7.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, metolcarb 0.25-6.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, carbofuran 0.25-8.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, carbaryl 0.28-8.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, isoprocarb 0.25–8.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, funoocarb 0.22–5.48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, methiocarb 0.25–6.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร promecarb 0.25 –5.40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่าที่ได้นำไป plot graph ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่า Response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) ซึ่งเป็นช่วงที่ใช้งาน

6.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยทดสอบ Reagent blank และ Fortified sample เตรียมสารละลายมาตรฐานใน Working range 6 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่า Response (แกน Y) ที่ได้จากนำค่าเฉลี่ยของ Area 3 ซ้ำ มาสร้างกราฟ ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ © ที่ได้จะเข้าใกล้ 1 เมื่อพบว่ามีความสัมพันธ์จึงสร้างเส้น Regression line

6.3 ความแม่น (Accuracy) ทำให้ทราบประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารที่สนใจในตัวอย่าง แสดงได้ด้วยการหา เปอร์เซ็นต์ Recovery ทดสอบ Reagent blank, Sample blank และ Fortified sample เตรียมสารละลายมาตรฐานที่อยู่ใน Working range 3 ระดับความเข้มข้น (Low, Medium และ High concentration) ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณ เปอร์เซ็นต์ Recovery จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Recovery} = \frac{(X_2 - X_1) * 100}{C}$$

X_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน Fortified sample (ไมโครกรัม/ลิตร)

X_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน Sample blank (ไมโครกรัม/ลิตร)

C คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม (ไมโครกรัม/ลิตร)

สำหรับการยอมรับ เปอร์เซ็นต์Recovery ที่ความเข้มข้นต่างๆ พิจารณาตาม AOAC (1993) เช่นที่ระดับความเข้มข้นของ analyze 10 ppb ยอมรับ Recovery ระหว่าง 60–115 เปอร์เซ็นต์

6.4 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดการหาเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) LOD ทำโดยวิเคราะห์ Fortified sample 3 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย x (แกน x) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน s (แกน y) ของแต่ละระดับความเข้มข้น โดย plot graph ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ย กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ถ้ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ลากเส้นกราฟตัดแกน y คือ s_0 คำนวณค่า LOD จากสูตร LOD = 3 s_0 ส่วน LOQ ประเมินจากค่า predicted LOQ = 10 s_0 เตรียม Fortified sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า predicted LOQ วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

7. การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Excel ในการคำนวณค่าที่รวบรวมจากการทดลอง

ระยะเวลา

ระยะเวลาเริ่มต้นเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2553 สิ้นสุดเดือน กันยายน พ.ศ. 2554 รวม 1 ปี

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม Carbamate ในน้ำ เลือกวิธี Multi-residue method ที่ใช้ตัวทำละลายคือ ethyl acetate ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลให้การตรวจวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ดี สำหรับการตรวจวิเคราะห์น้ำในสารกลุ่ม Organophosphorus และ Carbamate ที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร ในการสกัดแบบ Liquid-liquid partition คือการใช้ Seperatory funnel shaker และ Homogenizer ส่วนการสกัดแบบ Solid phase extraction apparatus ใช้ตัวทำละลาย คือ Methanol, Water และ Acetonitrile ในการปรับสภาวะของ SPE (condition) และใช้ Acetonitrile ในการชะตัวอย่าง (elute sample) ซึ่งการ

ใช้เทคนิคการสกัดทั้ง 3 วิธี ที่ทำเพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ Recovery นั้น อาจจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อการวิเคราะห์ ได้แก่

(1) การใช้ Column C_{18} ที่ต่าง particle size ในการตรวจวิเคราะห์

(2) การเปรียบเทียบอัตราส่วนของ Mobile phase ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

(3) การตั้งค่า Excitation และ Emission ที่ต่างกัน ของ Fluorescense Detector ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง Column, Mobile phase, ค่า Excitation และ Emissionของ Fluorescense Detector

Column	Mobile phase		
	(A)Water/Methanol (82/18%)	(B) Water/Acetonitrile (90/10%)	(C) Water/Methanol/ Acetonitrile (88/12/0%)
(1) Zorbax SB C_{18}	Flow 1.0 มิลลิลิตร/นาที Excitation 330 นาโนเมตร Emission 465 นาโนเมตร	Flow 0.8–1.0 มิลลิลิตร/นาที Excitation 330 นาโนเมตร Emission 465 นาโนเมตร	Flow 0.8–1.0 มิลลิลิตร/นาที Excitation 330 นาโนเมตร Emission 465 นาโนเมตร
(2) Carbamate analysis C_{18}	Flow 0.8–1.0 มิลลิลิตร/นาที Excitation 330 นาโนเมตร Emission 465 นาโนเมตร	Flow 0.8–1.0 มิลลิลิตร/นาที Excitation 339 นาโนเมตร Emission 445 นาโนเมตร	Flow 0.8–1.0 มิลลิลิตร/นาที Excitation 339 นาโนเมตร Emission 445 นาโนเมตร

ที่มา : (A) Pickering Laboratories, Inc., (2000) (B) EPA method 632 (C) Waters (2010)

ดังนั้น จึงทำการทดสอบสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ใช้ Diode Array Detector (DAD) และ HPLC (FL-PCD) ทดสอบด้วย Column Zorbax SB พบว่า sensitivity ของการใช้ HPLC (FL-PCD) ดีกว่า จึงเลือกใช้HPLC (FL-PCD) ในวิธีทดสอบ โดยเปลี่ยนชนิด Mobile phase ของ HPLC 3 ชนิด ได้แก่ Water/ Methanol และ Water/ Acetonitrile รวมถึงการเปลี่ยน Gradient program เพื่อเปรียบเทียบสภาวะที่ให้ sensitivity ที่เหมาะสม พบว่า การใช้ Mobile phase ชนิด Water/Acetonitrile ให้ Peak ที่มี Sensitivity ที่ดีกว่าการใช้ Water/Methanol แต่การแยก Peak ออกจากกันไม่ดี ใน Mixed working standard เนื่องจากเกิดการรวม Peak ของสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ methiocarb และ fenobucarb (BPMC) เป็น peak เดียว จึงทดลองเปลี่ยนมาใช้ Column Carbamate analysis จึงเปลี่ยน Mobile phase เป็น Water/Methanol/Acetonitrile และค่า Excitation และ Emission ของ FLD ด้วย แสดง response ของสารมาตรฐาน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบ Retention time (T_R) และ Sensitivity ของสารมาตรฐาน เมื่อใช้ Column และ Mobile phase ต่างกันในการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC (FL-PCD)

Carbamate (n=3)	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	Zorbax SB				Carbamate analysis	
		(A) Water/ Methanol (82/18%) Excitation 330 nm Emission 465 nm		(B) Water/Acetonitrile (90/10%) Excitation 330 nm Emission 465 nm		(C) Water/Methanol/ Acetonitrile (88/12/0%) Excitation 339 nm Emission 445 nm	
		T_R	Response	T_R	Response	T_R	Response
methomyl	3.43	4.870	938.91	7.832	1961.127	8.390	3757.795
metolcarb	3.01	10.333	668.233	13.400	2054.973	13.371	3308.927
carbofuran	2.97	13.017	481.794	14.534	1450.529	16.609	2435.212
carbaryl	3.32	14.392	873.208	15.015	2978.404	18.250	4149.650
isoprocarb	3.07	18.715	694.585	16.085	1902.230	19.882	3564.609
methiocarb	2.63	26.538	404.705	17.851	3724.883	23.490	4604.954
funobucarb	3.03	25.682	1036.123	17.851	3724.883	23.796	2160.748
promecarb	2.63	28.209	558.850	18.554	1488.881	25.441	2272.006

ตารางที่ 4 อัตราส่วน Water/ Methanol/ Acetonitrile (88/12/0 เปอร์เซ็นต์) ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

เวลา (นาที)	% Water	% Methanol	% Acetonitrile	Flow rate (มิลลิลิตร/นาที)
0.00	88.0	12.0	0	1.0
5.30	88.0	12.0	0	1.0
5.40	68.0	16.0	16.0	1.0
14.00	68.0	16.0	16.0	1.0
16.10	50.0	25.0	25.0	1.0
20.00	50.0	25.0	25.0	1.0
22.00	88.0	12.0	0	1.0
30.00	88.0	12.0	0	1.0

เมื่อใช้ Mobile phase ชนิด Water/ Methanol/ Acetonitrile พบว่าให้ Sensitivity ดีขึ้น และแยก Peak ของ methiocarb และ fenobucarb (BPMC) ที่ซ้อนทับกันได้ เนื่องจากข้อดีของ Acetonitrile เช่น Low viscosity คือให้ Sharper peak, Lower back pressure และ Higher elution strength เมื่อเทียบกับ Methanol แต่ Methanol มีส่วนดีคือ ให้ Better working condition และ Less toxic นอกจากนี้ การปรับอุณหภูมิของ column temperature ยังมีผล

ต่อ sensitivity ของสารมาตรฐานด้วย ในการตั้งค่าพารามิเตอร์เพื่อให้มีสภาวะการทำงานอย่างเหมาะสมของเครื่องมือ ทำได้ดังนี้

(1) ใช้ Gradient program ของ Mobile phase ชนิด Water/ Methanol/Acetonitrile โดย Flow rate 1 มิลลิลิตรต่อนาที

(2) ปรับตั้งค่าที่ FLD ให้ค่า Excitation 339 นาโนเมตร และ Emission 445 นาโนเมตร

(3) ปรับอุณหภูมิของ reactor และ column อย่างเหมาะสม

(4) ใช้ Injection volume 10 มิลลิลิตร

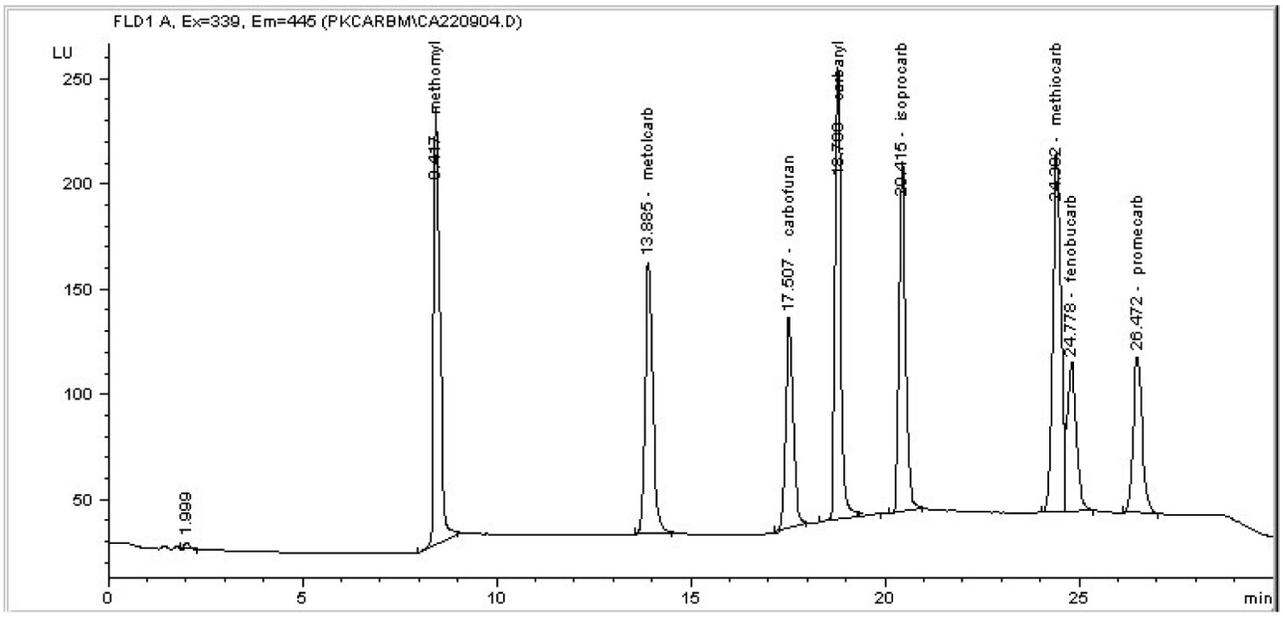
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงทดสอบวิธีการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ในน้ำ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลของ 3 วิธีการได้แก่ การสกัดด้วย Separatory funnel shaker, Homogenizer และ Solid phase extraction (SPE) เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (FL-PCD) พบว่าในครั้งแรกวิธีสกัดด้วย Separatory funnel shaker ให้ค่า % Recovery ระหว่าง 17-101 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าการสกัดโดยใช้ SPE ที่มีค่า % Recovery ระหว่าง 60-120 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ จึงต้องทำการสกัดซ้ำ พบว่าวิธี Separatory funnel shaker ให้ค่าการทำซ้ำดี และค่าเปอร์เซ็นต์ recovery 73–105 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ส่วนวิธี SPE มีค่าการทำซ้ำไม่ดีนัก แต่ % Recovery ยังอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และวิธี Homogenizer ให้ค่าการทำซ้ำและค่า % Recovery ไม่ดี ดังนั้น จึงเลือกวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ในน้ำ โดยใช้ Separatory funnel shaker 1 นาที ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (FL-PCD) สามารถนำมาใช้เป็นวิธีทดสอบมาตรฐานของห้องปฏิบัติการได้ และต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ Recovery, เปอร์เซ็นต์ RSD ของการใช้ Seperatory funnel shaker ในการสกัดสารกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamate ในน้ำ

Carbamate	ความเข้มข้นระดับต่ำ (n=10) 0.22 – 0.28 ไมโครกรัม/ลิตร			ความเข้มข้นระดับกลาง (n=10) 1.31 – 1.72 ไมโครกรัม/ลิตร			ความเข้มข้นระดับสูง (n=10) 4.37 – 5.71 ไมโครกรัม/ลิตร		
	ความเข้มข้น	% Recovery	% RSD	ความเข้มข้น	% Recovery	% RSD	ความเข้มข้น	% Recovery	% RSD
methomyl	0.28	89	7	1.72	79	11	5.71	73	3
metolcarb	0.25	89	13	1.51	77	12	5.02	86	11
carbofuran	0.25	100	10	1.49	100	12	4.96	100	10
carbaryl	0.28	98	6	1.66	99	6	5.53	105	7
isoprocarb	0.25	88	10	1.53	83	5	5.11	98	14
methiocarb	0.25	89	13	1.52	89	12	5.06	105	7
fenobucarb	0.25	99	11	1.31	99	9	4.37	98	13
promecarb	0.22	97	10	1.32	94	10	4.39	102	14

ตารางที่ 6 ช่วงของการวัด, สมการเส้นตรง, ค่า Correlation coefficient LOD และ LOQ ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate ในน้ำ สกัดวิธี Separatory funnel shaker

Carbamate	Range Std. (ไมโครกรัม/ลิตร)	Linearity	Correlation coefficient	LOD (ไมโครกรัม/ลิตร)	LOQ (ไมโครกรัม/ลิตร)
methomyl	0.11 – 7.10	y = 1001.5x + 160.48	0.996	0.032	0.11
metolcarb	0.10 – 6.15	y = 1040.2x + 74.833	0.998	0.043	0.14
carbofuran	0.09 – 8.41	y = 976.51x – 101.75	0.996	0.056	0.19
carbaryl	0.11 – 8.75	y = 1216.1x + 81.193	0.998	0.032	0.11
isoprocarb	0.11 – 8.75	y = 1344.7x – 95.279	0.997	0.034	0.11
methiocarb	0.11 – 6.05	y = 884.8x – 31.536	0.997	0.028	0.10
fenobucarb	0.09 – 5.48	y = 884.8x – 31.536	0.997	0.064	0.21
promecarb	0.09 – 5.40	y = 942.33x – 28.733	0.997	0.061	0.20



ภาพที่ 3 Chromatogram ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamate ความเข้มข้น 1.31 -1.72 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

ผลการประเมินค่าต่างๆ ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamate ในน้ำ โดยใช้ Seperatory funnel shaker โดยใช้ HPLC (FL-PCD) ให้ Recovery อยู่ในช่วงที่ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัดที่เป็นเส้นตรง ระหว่าง 0.996 – 0.998 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ความเป็นเส้นตรง (Linearity) จากค่า Correlation coefficient หรือ $r \geqslant 0.995$ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ จึงสามารถนำวิธีนี้ไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamate ในน้ำของห้องปฏิบัติการอีกวิธีหนึ่ง

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เผยแพร่ในหนังสือรายงานประจำปี และการประชุมวิชาการของหน่วยงาน
2. อบรมหรือถ่ายทอดความรู้แก่นักศึกษา นักวิจัยในหน่วยงานอื่นๆ ที่ต้องการวิธีทดสอบ
3. เป็นข้อมูลสำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม Carbamate ในน้ำ

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 1993. AOAC Peer Verified Methods Program. Manual on Policies and Procedures, Arlinton, VA Nov. 1993.

EPA Method 531.1. Measurement of N-Methylcarbamoyloximes and N-Methylcarbamates in Water by Direct Aqueous Injection HPLC with Post Column Derivatization -Revision 3.1

EPA Method 531.2. Measurement of N-Methylcarbamoyloximes and N-Methylcarbamates in water by Direct Aqueous Injection HPLC With Post Column Derivatization.

EPA Method 632. The Determination of Carbamate and Urea Pesticides in Municipal and Industrial Wastewater.

Fernandez, J. M., Vazquez, P. P and Vidal, J. L. M. 2000. Analysis of N-methylcarbamate pesticides insec-ticides and some of their main metabolites in urine with liquid chromatography using diode array detection and electrospray mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 412: 131-139.

Koc, Feride., Yigit YusuF., Kursad das, Yavuz., Gurel Yasemin and Yarali, Cevdet. 2008. Determination of Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl and Methiocarb Residues in Honey by HPLC with Post-column Derivatization and Fluorescence Detection after Elution from a Florisil Column. J. of Food and Drug Analysis, Vol. 16: 3. 39-45

Garfield, F.M. 1996. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. AOAC International. HPLC Guide. Available source: http://www.chemgroups.northwestern.edu/scheidt/PDFs/HPLC guide.pdf

In house method. 2550. Base on Organochlorine and Organophosphorus Pesticide. General Multiresidue Method. AOAC Official Method 970.52 (1995) กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

Kromidas, Stavros. 2000. Practical Problem Solving in HPLC. Wiley-VCH Verlag GmbH. D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany.

Pickering Laboratories, Inc. 2000. Application Manual. Carbamates Version 1.2. Pickering Laboratories, Inc. Mountain View. USA.

Pickering Laboratories, Inc. 2010. HPLC Post-Column Derivatization in International Product Catalog 10/11.

Snyser, Lloyd R., Kirkland, Joseph J. and Glajch Joseph L. 1997. Practical HPLC Method Development. 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc. USA.

Waters. 2010. Environmental Chromatography Methods Guide. Waters Corporation.

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงและสารกำจัดวัชพืชในดินและน้ำโดยใช้ Gas chromatography/Mass Spectrometry: พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน

Analytical Method Development of organophosphorus, organochlorines and pyrethroids insecticide compound in soil by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

มลิสา เวชยานนท์ ประกิจ จันทร์ติ๊บ

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus กลุ่ม organochlorines และ pyrethroids ในดินโดยใช้เครื่อง Gas chromatography/Mass spectrometry พัฒนาจากวิธีที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph ที่ใช้ตัวตรวจวัดที่แตกต่างกันมากกว่าหนึ่งตัวเป็นวิธีรวมที่ตรวจได้พร้อมกันในคราวเดียว ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเหมาะกับเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบในดินทราย ดินร่วน และดินเหนียว ที่ระดับความเข้มข้น 0.005-0.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สกัดด้วย ethyl acetate 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker นาน 5 ชั่วโมง ไม่ผ่านการ clean up ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร ผลการทดสอบในตัวอย่างดินทรายและดินร่วน มีค่า recovery อยู่ในช่วง 77-117 และ 74-117 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ยกเว้นสารพิษชนิด malathion ที่อยู่ในกลุ่ม organophosphorus ที่มีค่า recovery มากกว่า 120 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด 70-120 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลการทดสอบในตัวอย่างดินเหนียว พบว่าสารพิษกลุ่ม organochlorines มีค่า recovery อยู่ในช่วง 75-118 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารพิษกลุ่ม organophosphorus และ pyrethroids ส่วนใหญ่มีค่า recoveryมากกว่า 120 เปอร์เซ็นต์ และไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ยกเว้นสารพิษชนิด chlorpyrifos, bifenthrin, lambda cyhalothrin และ permethrin ที่มีค่า recovery ระหว่าง 104-115 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สารพิษที่ทดสอบในตัวอย่างดินเหนียวที่มีค่า recovery ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดนี้จะต้องทำการศึกษาองค์ประกอบอื่นเพิ่มอีกในขั้นต่อไป

รหัส 03-06-54-06-01-01-02-54

คำนำ

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน แต่เดิมใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph โดยแบ่งตัวอย่างไปตรวจด้วยตัวตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดที่แตกต่างกันกลุ่ม organophosphorus ด้วยตัวตรวจวัดชนิด Flame photometric detector กลุ่ม organochlorines และ pyrethroids ตรวจวิเคราะห์ด้วยตัวตรวจวัด Electron capture detector ซึ่งทำให้เสียเวลาและแรงงานในการเตรียมตัวอย่างเป็นอย่างมาก

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines and pyrethroids ในดินโดยใช้เครื่อง Gas chromatography/Mass Spectrometry ซึ่งเป็นเครื่องมือขั้นสูงที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับในระดับสากล โดยใช้วิธีสกัดที่ไม่ยุ่งยาก และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องเพียงชนิดเดียว เพื่อต้องการลดขั้นตอนและประหยัดค่าใช้จ่าย รวมทั้งผลวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้อง ยอมรับในระดับสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วสกัดได้แก่ beaker, cylinder, Erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for auto sampler, และ glass funnel เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารละลายของสารมาตรฐานและทำ standard calibration curveได้แก่ auto pipette, volumetric pipette และ volumetric flask

2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ

2.1 สารเคมี analytical grade ได้แก่ anhydrous sodium sulfate (anh. Na_2SO_4), acetone, dichloromethane, ethyl acetate, hexane สารเคมีชนิด pesticide grade ได้แก่ ethyl acetate

2.3 สารพิษมาตรฐาน pesticide grade กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 16 ชนิด ประกอบด้วย aldrin, alpha BHC, alpha endosulfan, beta endosulfan, dieldrin, endosulfan sulfate, endrin, gamma BHC, heptachlor, heptachlor epoxide, o,p'-DDE, o,p'-DDT, o,p'-TDE, p,p'-DDE, p,p'-DDT และ p,p'-TDE กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 10 ชนิด ประกอบด้วย chlorpyrifos, diazinon, EPN, ethion, malathion, methidathion, parathion methyl, pirimiphos methyl, profenofos และ triazophos กลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด ประกอบด้วย bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lamda cyhalothrin และ permethrin

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 5 ตำแหน่ง เครื่องสกัดชนิด shaker เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator และ nitrogen evaporator เครื่อง Gas Chromatograph/Mass spectrometry รุ่น 5973

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน เตรียม stock standard solution ของสารพิษแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น ประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม Intermediate standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมของแต่ละกลุ่มให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.01-2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการสกัดตัวอย่างตามวิธีของ TNO, 1993. โดยเปลี่ยนชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวทำละลายสำหรับใช้สกัดตัวอย่างดิน ได้แก่ ethyl acetate, hexane, hexane: acetone, dichloromethane: acetone ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ Erlenmeyer flask เติม เลือกตัวทำละลายข้างต้นเติม 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker นาน 5 ชั่วโมง กรองสารสกัดผ่าน anh. $NaSO_4$ ใส่ใน round bottom flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS

3. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph/Mass spectrometry (GC-MS) เครื่อง GC-MS ชนิด Single Quadrupole ยี่ห้อ Agilent รุ่น MSD 5973 ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

mode	: pulsed splitless
GC column	: column DB 5 - MS capillary, 30 m x 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness
Injector	: 230 °C
MS Transfer Line	: 280 °C
MS Quad temperature	: 150 °C
Ms source	: 230 °C
Oven program	: 100 °C (1 นาที) $\xrightarrow{15\ ^\circ C/นาที}$ 180 °C (1 นาที) $\xrightarrow{3\ ^\circ C/นาที}$ 200 °C (0 นาที) $\xrightarrow{1\ ^\circ C/นาที}$ 210 °C (0 นาที) $\xrightarrow{15\ ^\circ C/นาที}$ 290 °C (5 นาที)
Carrier gas	: helium flow 1.4 มิลลิลิตร/นาที
Injection volume	: 1 ไมโครลิตร

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2554

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบตัวอย่างเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus 10 ชนิด organochlorines 16 ชนิดและ pyrethroids 7 ชนิดในดิน ดัดแปลงวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจากวิธี Netherlands ใช้ดินทรายเป็นตัวแทนของดิน ปรับเปลี่ยนสารเคมีที่ใช้ในการสกัดได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลายเดี่ยว คือ hexane และ ethyl acetate พบว่าการทดสอบด้วยตัวทำละลายชนิด hexane มีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 96-120 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม organochlorines อยู่ระหว่าง 85-118 เปอร์เซ็นต์

และ pyrethroids อยู่ระหว่าง 90 - 101 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด (70-120 % ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/kg) ยกเว้นสารพิษชนิด EPN 124 เปอร์เซ็นต์ o,p'-DDT 133 เปอร์เซ็นต์ deltamethrin 131 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาองค์ประกอบอื่นเพิ่มเติม และพบว่าการสกัดด้วย hexane เกิดการแยกชั้น สารละลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในขั้นตอนการดูดสารสกัดเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ ส่วนผลการทดสอบตัวทำลายชนิด ethyl acetate มีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 93-110 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม organochlorines อยู่ระหว่าง 77-117 เปอร์เซ็นต์ และ pyrethroids อยู่ระหว่าง 99 -110 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

การทดสอบวิธีการสกัดโดยการใช้สารละลายผสม 2 ชนิด เป็นตัวทำละลาย ได้แก่ ชนิด acetone: dichloromethane (1:1) มีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 100-120 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม organochlorines อยู่ระหว่าง 87-107 เปอร์เซ็นต์ และ pyrethroids อยู่ระหว่าง 95-105 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด (70-120 % ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/kg) ยกเว้น สารพิษชนิด EPN, parathion methyl และ triazophos 133, 122, 121 เปอร์เซ็นต์ o,p'-DDT และ p,p'-DDT 194 และ 126 เปอร์เซ็นต์ deltamethrin 129 เปอร์เซ็นต์ ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดนี้จะต้องทำการศึกษาองค์ประกอบอื่นเพิ่มอีก ส่วนผลการทดสอบตัวทำลายผสมชนิด acetone: hexane (1:1) มีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 83-112 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม organochlorines อยู่ระหว่าง 70-116 เปอร์เซ็นต์ และ pyrethroids อยู่ระหว่าง 88-97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนดแต่การสกัดด้วยสารผสม acetone: hexane นี้จะเกิดปัญหาเหมือนการสกัดด้วย hexane คือสารสกัดไม่เป็นเนื้อเดียวกันทำให้เกิดปัญหาและความยุ่งยากในขั้นตอนการดูดตัวอย่างเพื่อไปตรวจวิเคราะห์ (ตารางที่ 2)

เลือกวิธีการสกัดที่ดีที่สุด และเกิดปัญหาน้อยที่สุด คือการสกัดด้วย ethyl acetate ไปทดสอบกับดินเหนียวและดินร่วน พบว่าการทดสอบกับตัวอย่างดินเหนียวมีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 121-134 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด ยกเว้นสารพิษชนิด chlorpyrifos 104 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม organochlorines อยู่ระหว่าง 75-118 เปอร์เซ็นต์ และ pyrethroids อยู่ระหว่าง 104-120 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นชนิด cypermethrin และ fenvalerate 135 และ 123 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดสอบกับดินร่วนพบว่า มีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 93-117 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารพิษชนิด malathion 126 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม organochlorines อยู่ระหว่าง 80-105 เปอร์เซ็นต์ และ pyrethroids อยู่ระหว่าง 74–101 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphorus ในดินเหนียว รวมทั้งสารพิษกลุ่ม pyrethroids ที่ทดสอบในดินร่วน ผลการทดสอบ recovery ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด จะต้องทำการศึกษาองค์ประกอบอื่นเพิ่ม ได้แก่การ clean up เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน การทดสอบผลกระทบของตัวอย่างที่มีผล และส่งเสริมประสิทธิภาพของการวัดสัญญาณ (metric effect) เป็นต้น

ตารางที่ 1. % recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารสกัด hexane และ ethyl acetate ในดินทราย

pesticides	hexane						ethyl acetate				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD		rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD
organophosphorus											
chlorpyrifos	96	91	101	96	5.1		102	118	102	107	8.8
diazinon	107	101	113	107	5.4		106	118	95	106	10.8
EPN	124	112	137	124	10.1		112	103	98	104	6.8
ethion	113	99	115	109	8.0		120	100	101	107	10.6
malathion	121	114	124	120	4.4		90	89	100	93	6.6
methidathion	121	113	126	120	5.1		106	100	101	102	3.1
parathion methyl	114	116	129	120	6.7		102	112	89	101	11.4
pirimiphos methyl	117	110	124	117	6.1		113	105	90	103	11.4
profenofos	109	98	114	107	7.2		107	98	102	102	4.4
triazophos	115	109	126	117	7.3		105	104	120	110	8.2
organochlroines											
aldrin	91	79	85	85	6.7		96	96	103	98	4.3
alpha endosulfan	89	80	89	86	5.7		99	104	117	107	8.9
alpha-BHC	92	83	89	88	5.4		80	78	73	77	7.0
beta endosulfan	90	77	92	86	9.0		97	96	108	100	7.0
dieldrin	89	77	90	85	8.6		100	96	106	101	5.0
endosulfan sulfate	92	83	92	89	5.9		118	115	117	117	1.0
endrin	105	91	106	101	8.1		107	112	107	109	2.7
gamma-BHC	92	82	88	87	5.8		94	94	84	90	6.2
heptachlor	96	90	97	94	4.1		102	100	98	100	2.0
heptachlor epoxide	92	83	90	89	5.7		102	100	111	104	6.0
o,p'-DDE	87	81	90	86	4.9		101	98	111	103	6.6
o,p'-DDT	130	140	130	133	4.2		100	95	112	102	8.5
o,p-TDE	88	79	93	87	7.9		110	105	112	109	3.1
p,p'-DDE	90	80	89	86	6.3		98	95	105	99	4.7
p,p'-DDT	116	110	128	118	7.4		100	108	120	109	9.2
p,p'-TDE	85	75	90	84	9.0		96	105	115	105	9.0
pyrethroids											
bifenthrin	97	88	102	96	7.5		114	97	108	106	8.1
cyfluthrin	100	91	105	99	7.4		113	112	106	110	3.4
cypermethrin	104	93	106	101	7.2		101	113	104	106	5.8
deltamethrin	170	96	125	131	28.5		112	98	86	99	13.2
fenvalerate	103	83	99	95	11.0		104	103	113	107	5.2
lambda-cyhalothrin	98	88	103	96	8.0		95	104	118	106	11.0
permethrin	94	79	96	90	10.0		100	105	98	101	3.6

ตารางที่ 2. % recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารสกัดผสม acetone: dichlorometane และ acetone : hexane ในดินทราย

pesticides	acetone : dichloromethane					acetone : hexane				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD
organophosphorus										
chlorpyrifos	97	102	102	100	3.1	78	87	83	83	5.4
diazinon	106	113	110	110	3.2	83	98	88	90	8.5
EPN	128	136	134	133	3.0	104	120	112	112	7.2
ethion	107	110	113	110	2.5	102	107	99	103	3.9
malathion	111	118	112	114	3.1	102	109	98	103	5.2
methidathion	111	117	112	113	2.7	109	111	99	107	5.9
parathion methyl	118	126	120	122	3.5	95	105	104	101	5.6
pirimiphos methyl	114	122	101	112	9.5	92	108	98	99	7.9
profenofos	103	107	100	103	3.3	86	95	89	90	5.1
triazophos	118	125	120	121	2.8	89	99	99	96	6.1
organochlorines										
aldrin	88	93	95	92	3.9	103	79	73	85	18.8
alpha endosulfan	92	96	93	94	2.1	63	82	75	74	13.3
alpha-BHC	89	95	90	91	3.0	69	79	71	73	7.4
beta endosulfan	92	96	95	94	2.4	57	76	78	70	16.8
dieldrin	87	92	90	90	2.7	85	81	75	80	6.2
endosulfan sulfate	90	90	95	92	3.0	68	76	70	71	5.8
endrin	106	110	105	107	2.6	78	102	95	92	13.5
gamma-BHC	90	95	91	92	2.9	62	76	71	70	9.9
heptachlor	101	106	100	102	3.2	78	88	82	83	6.4
heptachlor epoxide	93	98	98	96	2.9	69	79	76	75	6.7
o,p'-DDE	87	92	90	89	2.8	77	81	77	78	3.6
o,p'-DDT	190	197	195	194	1.9	110	119	119	116	4.6
o,p'-TDE	89	93	90	91	2.7	75	83	81	80	5.7
p,p'-DDE	90	95	92	92	2.7	71	78	75	75	5.2
p,p'-DDT	125	128	124	126	1.7	88	101	83	91	9.9
p,p'-TDE	85	90	87	87	3.1	77	86	85	83	6.5
pyrethroids										
bifenthrin	94	100	100	98	3.5	84	94	87	88	6.0
cyfluthrin	99	103	100	101	1.9	86	96	89	90	5.9
cypermethrin	102	105	102	103	1.8	93	104	95	97	5.8
deltamethrin	128	132	128	129	1.8	90	105	85	93	10.8
fenvalerate	104	107	105	105	1.5	80	102	92	92	12.4
lambda-cyhalothrin	95	100	96	97	2.4	83	94	88	88	6.4
permethrin	93	97	95	95	2.5	83	96	89	90	7.1

ตารางที่ 3. % recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารสกัด ethyl acetate ในตัวอย่างดินเหนียวและดินร่วน

pesticides	ดินเหนียว					ดินร่วน				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD
organophosphorus										
chlorpyrifos	104	103	106	104	2	89	101	95	95	6
diazinon	126	123	152	134	12	87	94	98	93	6
EPN	155	120	115	130	17	111	120	121	117	5
ethion	123	120	120	121	1	104	107	110	107	3
malathion	114	108	132	118	11	120	127	130	126	4
methidathion	135	120	119	125	7	109	102	117	109	7
parathion methyl	123	158	118	133	16	105	101	115	107	7
pirimiphos methyl	123	118	149	130	13	105	103	98	102	4
profenofos	124	120	118	121	3	100	108	110	106	5
triazophos	121	119	125	122	3	101	112	114	109	7
organochlorines										
aldrin	75	73	90	79	12	78	82	80	80	3
alpha endosulfan	80	77	93	83	10	84	87	89	87	3
alpha-BHC	80	77	96	84	12	78	83	80	80	3
beta endosulfan	83	77	91	84	8	88	89	92	90	3
dieldrin	80	78	95	84	10	82	82	90	85	6
endosulfan sulfate	96	92	114	101	12	88	92	94	92	3
endrin	113	110	130	118	9	99	110	106	105	5
gamma-BHC	75	70	85	77	10	78	82	85	82	4
heptachlor	87	80	92	86	7	85	90	87	87	3
heptachlor epoxide	81	78	96	85	11	82	86	82	83	3
o,p'-DDE	81	78	98	86	12	85	85	82	84	2
o,p'-DDT	119	96	110	109	11	92	96	92	93	3
o,p'-TDE	90	90	112	97	13	80	88	86	85	5
p,p'-DDE	80	77	95	84	12	80	86	95	87	9
p,p'-DDT	75	73	78	75	3	77	89	81	82	7
p,p'-TDE	96	99	126	107	15	91	85	96	91	6
pyrethroids										
bifenthrin	99	95	120	105	13	99	100	105	101	3
cyfluthrin	124	120	117	120	3	95	99	101	98	3
cypermethrin	124	120	161	135	17	99	100	104	101	3
deltamethrin	124	119	117	120	3	90	85	98	91	7
fenvalerate	112	109	147	123	17	67	80	75	74	9
lambda-cyhalothrin	108	103	134	115	14	96	98	101	98	2
permethrin	99	93	121	104	14	91	92	98	94	4

ตารางที่ 4. แสดง Molecular formular และ Quantifier Ion

pesticides	Molecular formular	Molecular weight	Quant.ion(s) (*m/z*)	Quant.ion1 (*m/z*)	Quant.ion2 (*m/z*)
organophosphorus					
chlorpyrifos ethyl	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350.62	199	314	97
diazinon	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304.35	179	179	304
EPN	$C_{14}H_{14}O_4NPS$	323.3	157	169	185
ethion	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	384.48	231	97	153
malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330.36	125	125	93
methidathion	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	302.33	145	85	93
parathion methyl	$C_8H_{10}NO_5PS$	263.21	109	109	125
pirimiphos methyl	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	305.34	290	276	309
profenofos	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	373.6	139	337	372
triazophos	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS$	313.31	161	162	172
organochlorines					
aldrin	$C_{12}H_8Cl_6$	364.93	263	66	293
alpha endosulfan	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406.96	241	237	339
alpha-BHC	$C_6H_6Cl_6$	290.83	181	219	183
beta endosulfan	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406.96	195	237	339
dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	380.91	79	277	263
endosulfan sulfate	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406.96	272	387	422
endrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	380.93	263	81	345
gamma-BHC	$C_6H_6Cl_6$	290.83	181	181	219
heptachlor	$C_{12}H_5Cl_7$	373.34	272	274	100
heptachlor epoxide	$C_{12}H_5Cl_7O$	389.34	353	81	355
o,p'-DDE	$C_{14}H_8Cl_4$	318.02	246	248	318
o,p'-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$	354.51	235	237	165
o,p'-TDE	$C_{14}H_{10}Cl_4$	320.04	235	237	165
p,p'-DDE	$C_{14}H_8Cl_4$	318.02	246	318	176
p,p'-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$	354.51	235	237	165
p,p'-TDE	$C_{14}H_{10}Cl_4$	320.04	235	237	165
pyrethroids					
bifenthrin	$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	422.88	181	165	166
cyfluthrin	$C_{23}H_{18}Cl_2FNO_2$	434.3	163	206	226
cypermethrin	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_2$	416.3	163	181	165
deltamethrin	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	505.12	253	181	208
fenvalerate	$C_{25}H_{22}ClNO_3$	419.91	167	125	419
lambda-cyhalothrin	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	449.85	181	197	208
permethrin	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	391.28	183	163	165

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากผลการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus 10 ชนิด organochlorines 16 ชนิด และ pyrethroids 7 ชนิด ในดิน โดยใช้เครื่อง Gas chromatography/Mass spectrometry พบว่าการใช้ ethyl acetate เป็นสารสกัด ไม่ผ่านการ clean up ให้ผลการทดสอบของสารพิษส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์กำหนด และสามารถยอมรับได้ แต่จะมีสารพิษบางชนิดที่มีค่า recovery ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดนี้ซึ่งจะต้องทำการศึกษาองค์ประกอบอื่นเพิ่มอีกในขั้นต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดินของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
2. เป็นข้อมูลสนับสนุนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เพื่อนำไปสู่การขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน

เอกสารอ้างอิง

ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ และปฏิมาภรณ์ สังห์น้อย. 2552. การตรวจวิเคราะห์สารพาตกค้าง 53 ชนิด อย่างรวดเร็วด้วยวิธี QuECheRS โดยใช้ GC/MS-PTV Inlet. กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร, สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

พนิดา ไชยยันต์บูรณ์และคณะ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม fungicide ในผักและผลไม้โดยใช้ Gas Chromatograph/Mass Spectrometry. 2553. กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร, สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

AMADEO R.FERNANDEZ ALBA. 2004. Chromatographic–Mass spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide residues. Comprehensive Analytical Chemistry volume XLIII

การวิเคราะห์คาร์เบนดาซิม เบนโนมิล ไธอะเบนดาโซลตกค้างในหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีอิมมิวโนเอสเส (Immunoassay)

Determination of Carbendazim Benomyl Thiabendazole Residue in Asparagus by Immunoassay

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ [1] *สุปราณี อิ่มพิทักษ์* [2]

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

นำสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม สารมาตรฐานเบนโนมิล และสารมาตรฐานไธอะเบนดาโซลความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 ppb มา Conjugate กับ protein BSA (bovine serum albumin) ได้เป็น Car-BSA, Ben-BSA, Thiaben-BSA เป็น Immunogen หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกริยากับ antibody คือ Carbendazim antibody, Benomyl antibody, Thiabendazole antibody คือ Rabbit anticarbendazim antibody (Anticarbendazim-BSA), Rabbit Antibenomyl antibody (Antibenomyl-BSA) และ Rabbit antithiabendazole antibody (Antithia bendazole-BSA) ที่ละลายอยู่ใน buffer saline solution โดยใช้ paramagnetic particle เป็น catalyst แล้ว enzyme คือ Lyophilized Carbendazim enzyme conjugate (Horse–นำไปทำปฏิกิริยากับ raddish peroxidase, HRP Conjugate Rabbit antiserum) เป็นผงสำเร็จรูปที่ละลายใน buffer saline solution ทีมี BSA ถ้าเป็น Benomyl ใช้ enzyme คือ Lyophilized Benomyl enzyme conjugate (Horse–raddish peroxidase, HRP Conjugate rabbit antiserum) เป็นผงสำเร็จรูปที่ละลายใน buffer saline solution ทีมี BSA ถ้าเป็น Thiabendazole ใช้ enzyme คือ Lyophilized Thiabenda - zoleenzyme conjugate (Horse–raddish peroxidase, HRP Conjugate rabbit antiserum) เป็นผงสำเร็จรูปที่ละลายใน buffer saline solution ทีมี BSA แล้วตามด้วย Substrate คือ peroxide solution และ TMB (3, 3$^{'}$, 5, 5$^{'}$ –tetra methyl benzidine) เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด จะมองเห็นสีน้ำเงิน หยุดปฏิกิริยาด้วย Stopping solution คือ 2M. H_2SO_4 จะมองเห็นสีเหลืองในสารละลาย ถ้าต้องการหาปริมาณที่ตกค้างใน ตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง นำหน่อไม้ฝรั่งมาสกัดด้วยสารละลายที่ใช้สกัด แล้วนำมา Conjugated กับ protein BSA เพื่อทำให้เป็น immunogen หลังจากนั้นทำเหมือนกับวิธีการของสารมาตรฐาน นำมาวัดปริมาณที่แน่นอนด้วย Spectrophotometer หรือ Elisa reader ที่ wavelength (λ) 450 nm. แล้วเปรียบเทียบกับ Calibration Curve ของสารมาตรฐาน วิธีนี้สามารถพัฒนาเป็น ELISA Test kxt ได้

รหัสโครงการวิจัย งานวิจัยพิเศษตามความต้องการเร่งด่วนของรัฐบาล

[1] นักวิทยาศาสตร์ ชำนาญการพิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

[2] ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร ด้านเคมีเกษตร

คำนำ

คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) และ เบนโนมิล (Benomyl) เป็นสารกำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค ประเภทดูดซึม (Systemic fungicide) สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่รากและส่วนต่างๆ ของพืชได้ ใช้เป็นสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในพวกธัญพืช ไม้ผล เช่น ส้ม กล้วย สตรอเบอรี่ ฯลฯ ผัก เช่น แตงกวา ผักกาดหอม หัวหอม ขึ้นฉ่าย แครอท หน่อไม้ฝรั่ง ฯลฯ สารพิษทั้ง 2 ตัวไม่เป็นพากับพืชที่ปลูก (Agricultural Handbook, 1991) ทั้ง คาร์เบนดาซิม และเบนโนมิล จัดอยู่ในกลุ่ม Benzimidazole fungicide (Lyr, 1987)

เบนโนมิลสามารถซึมผ่าน Cuticle ที่เคลือบผิวแอบเปิลได้รวดเร็วกว่า คาร์เบนดาซิม ในขณะที่ไธอะเบนดาโซล (Thiabendazole) จะซึมได้ช้าที่สุด คาร์เบนดาซิมชอบสะสมอยู่ที่หน่อและยอดของใบ เนื่องจากกลุ่ม Benzimidazole สามารถเคลื่อนที่ได้ในใบโดยการคายน้ำสารพวก Benzimidazole ถ้าใช้ฉีดพ่นเมล็ดทำให้เกิดการแคระแกรน (Stunt) และงอกช้า (Lyr, 1987)

ถ้าเพิ่มสารพวก Surfactants ลงไป ทำให้พวก Benzimidazole ซึมผ่านดินได้ดีขึ้น (Pitblado, 1972) คาร์เบนดาซิมค่อนข้างสลายตัวยากในดิน (Baude, 1974) คาร์เบนดาซิมสลายตัวได้ปานกลางด้วยแสงแดด (Fluker, 1977) ในพืชและดิน คาร์เบนดาซิมจะสลายตัวเป็น 2-aminobenzimidazole ได้ช้ามาก (Helweg, 1977) คาร์เบนดาซิมและ 2-aminobenzimidazole ไม่สามารถเคลื่อนย้ายในดินและจะไม่ถูกชะล้าง (leaching) ไปจากตำแหน่งที่ใช้ฉีดพ่น การถูกดูดซึม และการคงสภาพในดินขึ้นอยู่กับความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (pH) และปริมาณ Organic matter ในดิน (Helweg, 1977)

การเปลี่ยนรูปจากเบนโนมิล และ Thiophanates ไปเป็น คาร์เบนดาซิม สามารถเกิดขึ้นได้ (Baude, 1973) พิษตกค้างของ Benzimidazole หลังใช้ฉีดพ่นในแตงกวา กล้วย ส้ม และองุ่น 28 วันไปแล้วตรวจพบพิษตกค้างมากกว่า 60% เป็น เบนโนมิล (Chiba, 1981) คาร์เบนดาซิมจะไม่เกิด hydrolysis ที่ pH 1-7 (25^0c - 27^0c) และจะมี half-life ที่ pH 9 ประมาณ 17 ชั่วโมง (Lyr, 1987)

Carbendazim / benomyl / thiabendazole rapid assay เป็นวิธีการง่ายๆ วิธีการหนึ่งของ Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) ที่ใช้หาปริมาณของ คาร์เบนดาซิม เบนโนมิล และไธอะเบนดาโซล ขั้นตอนแรก ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หลังจากนำมาสกัดหยาบและ conjugate กับ BSA (Bovine serum albumin) แล้ว นำมาผสมกับ Enzyme conjugate ใน Test tube ใช้ paramagnetic particle เป็นตัวช่วยให้เกิดการ Binding ได้ดีระหว่าง Enzyme conjugate กับ Antigen หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Antibody ซึ่ง Specific กับ Carbendazim, Benomyl และ Thiabendazole ที่ต้องการหาปริมาณในตัวอย่าง (Ohm icon Environmental Diagnostics, 1990)

ทั้ง Carbendazim, Benomyl, และ Thiabendazole ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง และในสารมาตรฐานทั้ง 3 สาร ที่เกาะติดกับ BSA เป็น Heptan ซึ่งเกาะติดกับ Enzyme conjugate จะ binding ได้ complete กับ antibodies sites บน magnetic particle หลังจากผ่านการ incubate เรียบร้อยแล้ว สนามแม่เหล็กจะทำให้เกิดเป็น paramagnetic particle ซึ่งมี Carbendazim, Benomyl, และ Thiabendazole เกาะติดอยู่ การทำปฏิกิริยากับ antibodies บน magnetic particle จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารพิษในสารมาตรฐานและในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง

ปริมาณของ Carbendazim, Benomyl และ Thiabendazole สามารถตรวจสอบได้จากการเติม substrate hydrogen peroxide และ chromogen (3, 3', 5, 5'–tetra methyl benzidine) chromogen จะทำให้เกิดสีหลังจาก

incubate ชั่วระยะเวลาหนึ่ง จะได้สีน้ำเงิน ถ้าไม่มีสารพิษทั้ง 3 ชนิด เมื่อเติมกรดลงไปปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะสิ้นสุด สีน้ำเงินจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปริมาณ Carbendazim, Benomyl และ Thiabendazole จะหาได้โดยการเปรียบเทียบสีกับ blank ซึ่งไม่มี Carbendazim, Benomyl และ Thiabendazole ใช้ calibration curve ของสารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ (Ohm icon Environmental Diagnostics, 1990)

ในเทคนิค Rapid assay ของ ELISA เวลานำ antibodies มาใช้ในการทดลอง ห้ามใส่ในภาชนะบรรจุที่ทำด้วยแก้ว (glass) (Ohm icon Environmental Diagnostics, 1990)

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาการวิเคราะห์พิษตกค้างของ Carbendazim, Benomyl และ Thiabendazole ในหน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้ Rapid assay ของ ELISA

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ 1.เครื่องบดตัวอย่าง (Blender)

2.เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (Centrifuge)

3.อุปกรณ์เตรียมตัวอย่าง (Food prep kit เป็น extraction clean up reagent tube)

4. เครื่องผสมตัวอย่าง (Vortex mixer)

5. แก๊สไนโตรเจน ใช้ระเหยตัวอย่างที่สกัดแล้ว

6. สารที่ใช้เจือจางสารมาตรฐาน เป็น Buffer saline solution

7. สารมาตรฐานหรือ Technical grade ของ Carbendazim, Benomyl และ Thiabendazole

8. หลอดทดลอง (Test tube) ที่เป็น polyethylene tube

9. หน่อไม้ฝรั่ง

10. ไปเปตที่เป็น Automatic pipette ขนาด 50, 100, 200, 250, 500, 1,000 µl

11. Carbendazim enzyme conjugate, Benomyl enzyme conjugate, Thiabendazole enzyme conjugate, ซึ่งเป็น Lyophilized carbendazim enzyme conjugate, lyophilized benomyl enzyme conjugate, lyophilized thiabendazole enzyme conjugate เป็นชนิด Horse-raddish peroxidase (HRP) ชนิดผง

12. Carbendazim antibody ที่เกาะอยู่บนparamagnetic particlesเป็น rabbitanticarbendazim ละลายอยู่ใน Buffer saline solution ซึ่งผสมอยู่กับ Bovine serum albumin

13. Control ประกอบด้วย Buffer saline solution

14. Rapid magnetic separator

15. เครื่องชั่ง

16. สารที่ใช้สกัดตัวอย่าง คือ Acetone

17. Substrate เป็น peroxide solution (H_2O_2 0.02% ใน buffer ของ Citric acid) และ chromogen (3, 3', 5, 5'– tetra methyl benzidine) ความเข้มข้น 0.04 กรัม / ลิตร เวลาใช้ละลายใน Citric acid

18. Washing buffer ใช้ Buffer saline solution

19. Stopping solution ใช้ H_2SO_4 ความเข้มข้น 2 M.

20. Magnetic particle rack

21. ELISA reader หรือ Spectrophotometer

วิธีการ

1. นำหน่อไม้ฝรั่งมาสับให้ละเอียด

2. สกัดตัวอย่างโดยการปั่นใน Blender ใช้หน่อไม้ฝรั่ง 50 กรัม ใส่ acetone 100 ml ปั่น low speed 5 นาที และปั่น high speed 5 นาที

3. กรอง แล้วนำสารละลายที่ได้มาแบ่ง 25 ml ใส่ใน 50 ml centrifuge tube

4. ทำการ centrifuge ให้แยกชั้น แล้ววางทิ้งไว้ 5 นาที

5. แบ่งส่วนที่ใสมา 4 ml ใส่ใน extraction clean up reagent tube ที่มี adsorptive polymer อยู่ภายใน เรียก food prep kit.

6. นำ สารสกัดที่กรองได้จาก food prep kit. ใส่ใน Polyethylene tube แล้ว mixed ด้วย Votex mixer 15 นาที

7. ใส่ Salt reagent (NaCl) ลงไปใน Polyethylene tube 1 กรัม แล้วปิดฝา

8. Mixed ให้เข้ากันด้วย Votex mixer แล้ววางทิ้งไว้ให้ชั้นของน้ำและ acetone แยกออกจากกันประมาณ 5 นาที

9. ดูด Acetone extract มา 50 µl (top layer) ใส่ลงใน 13x100 mm polyethylene test tube

10. นำไป evaporate ด้วย nitrogen gas จนแห้ง

11. เติม Rapid assay sample diluent 2.5 ml (buffer saline)

การตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA

1. Label test tube ที่ใช้สำหรับ standard, control และตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง

2. เติม Standard benomyl ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 1.00, 5.00 ppb ตามลำดับ ทำ calibration curve แล้วจึงทำของ control และตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่สกัดไว้ลงใน test tube ที่เตรียมไว้โดยใช้ automatic micropipette หลอดละ 250 µl ของ carbendazim และ thiabendazole ก็ดำเนินการทำนองเดียวกัน

3. เติม benomyl enzyme conjugate ลงไปทุก tube ที่มี Standard benomyl ความเข้มข้นต่างๆ tube ละ 250 µl ของ carbendazim เติม carbendazim enzyme conjugate ลงไปทุก tube ที่มี Standard carbendazim ความเข้มข้นต่างๆ tube ละ 250 µl ทำนองเดียวกันของ thiabendazole ก็เติม thiabendazole enzyme conjugate ลงไปทุก tube ที่มี Standard thiabendazole ความเข้มข้นต่างๆ tube ละ 250 µl

4. เติม benomyl antibody ที่ผสมอยู่กับ paramagnetic particle ลงไป 500µl ลงไปทุก tube ที่มี Standard benomyl ความเข้มข้นต่างๆ และเติม carbendazim antibody ที่ผสมอยู่กับ paramagnetic particle ลงไป 500µl ลงไปทุก tube ที่มี Standard carbendazim ความเข้มข้นต่างๆ

ทำนองเดียวกันของ Thiabendazole ก็เติม thiabendazole antibody ลงไปทุก tube ที่มี Standard thiabendazole ความเข้มข้นต่างๆ

5. Mix ใน vortex mixer 2 วินาที ต้องระวังอย่าให้เกิดฟอง

6. Incubate 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

7. วางทิ้งไว้ให้แยกชั้นใน Rapid magnetic separator เป็นเวลา 2 นาที

8. เท Solution ออกเบาๆ แล้วเติม 1 ml washing buffer ในแต่ละ tube แล้ววางทิ้งไว้ 2 นาที แล้วเท Solution ออก ล้างแต่ละ tube อีกครั้งด้วย 1 ml washing buffer วางทิ้งไว้ 2 นาที แล้วเท Solution ออก

9. ยก rack ออกจาก Rapid magnetic separator แล้วเติม 500 µl substrate คือ color reagent (TMB) แล้วเติม 200µl 0.02% peroxide solution

10. Mix ใน vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที ระวังอย่าให้เกิดฟอง

11. Incubate เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

12. เติม 500 µl stopping solution (H_2SO_4 2 M.) แล้ววางทิ้งไว้ 20 นาที

13. นำมาอ่านค่า absorbance ที่ 450 nm ด้วย ELISA reader หรือ Spectrophotometer

14. นำค่า absorbance ที่ได้มาคำนวณ $\%B/B_0$ จาก

$$\%B/B_0 = \frac{\text{absorbance ที่วัดได้ - absorbance ของ blank}}{\text{absorbance ของ blank}} \times 100$$

แล้วนำค่า $\%B/B_0$ มาทำ calibration curve ของ Standard โดย plot ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นเป็น log ppb สามารถหาความเข้มข้นของพิษตกค้างของสารพิษในตัวอย่างได้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองใช้ Standard มาทำการ binding เองโดยปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibit (%B/Bo) กับความเข้มข้นเป็น log ppb ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibit (%B/Bo) กับความเข้มข้นเป็น log ppb

Standard	ppb	log ppb	$\%B/B_0$ Standard **เตรียมเอง**
benomyl	0.25	1.3979	116.70
	0.50	1.6989	83.59
	1.00	2.0	74.70
	5.00	2.6989	42.34

ตารางที่ 1. (ต่อ) ความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibit (%B/Bo) กับความเข้มข้นเป็น log ppb

Standard	ppb	log ppb	$\%B/B_0$ Standard **เตรียมเอง**
carbendazim	0.25	1.3979	107.20
	0.50	1.6989	86.09
	1.00	2.0	72.95
	5.00	2.6989	48.75
thiabendazole	0.25	1.3979	128.70
	0.50	1.6989	98.83
	1.00	2.0	74.82
	5.00	2.6989	43.43

สาเหตุที่ทำทั้ง 3 ชนิดในกลุ่ม Benzimidazole เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ในขณะที่อยู่ภายในต้นพืช เนื่องจากเกิดการ metabolism ภายในสรีระของพืชเอง(Chiba, 1981 และ Baude, 1973)

ตารางที่ 2. แสดง % Recovery และ ppb found ในหน่อไม้ฝรั่งที่ใช้ทดลอง

Benzimidazoles	ppb added	ppb found	% Recoveries
benomyl	0.5	0.42	84
	1.0	0.85	85
carbendazim	0.5	0.80	80
	1.0	1.05	105
thiabendazole	0.5	0.85	85
	1.0	1.03	103

หน่อไม้ฝรั่งเก็บมาจากตลาดสดจังหวัดกาญจนบุรี 25 ตัวอย่างตรวจพบ Benomyl 1 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบ 1.2 ppb ตรวจไม่พบ carbendazim และ thiabendazole

ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษด้วยวิธี Immunoassay ทุก reagents ที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ ต้องปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และ antibody ที่ couple กับ paramagnetic particle จะทำการผสมกันเฉพาะเวลาจะใช้เท่านั้น เพราะถ้าทิ้งไว้หลังจากผสมแล้ว คุณสมบัติจะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย Antibody ห้ามนำไปใส่ในภาชนะที่เป็นแก้วโดยเด็ดขาด (Ohmicron Environmental Diagnotics, 1990) ในขบวนการและขั้นตอนการวิเคราะห์ทุก tube ที่ใช้ในขบวนการต้องทำการ condition ให้เหมือนกันทุกๆ step ของการทดลอง ทุกครั้งที่เติม reagent ลงไปใน test tube ระวังอย่าให้ปลาย pipette tip สัมผัสกับ reagent ใน tube โดยเด็ดขาด เพราะทำให้ปริมาณสารไม่แน่นอน ทำให้เกิด cross-contaminations โดยเฉพาะ carry over สารติดไปใน pipette ที่สะอาดไปใส่ใน tube อื่นๆ

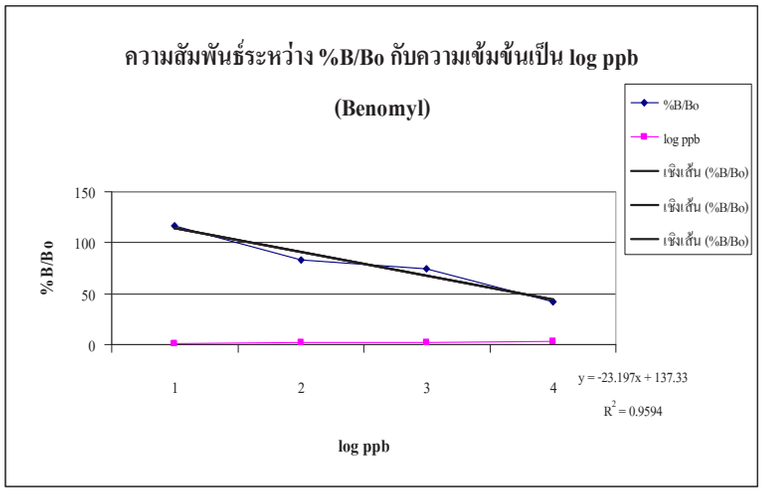
ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ นำสารสกัดของตัวอย่างมาเติม Powder reagent เพื่อกำจัดสารพวก phenolic compounds และ flavonoids ซึ่งอาจปนเปื้อนติดมาอยู่ในตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ และเติม NaCl เพื่อดูดซับสารพวก aqueous components ที่มีอยู่ในสารสกัดของตัวอย่าง

สรุปผล ข้อเสนอแนะ / คำแนะนำ และการนำไปใช้ประโยชน์

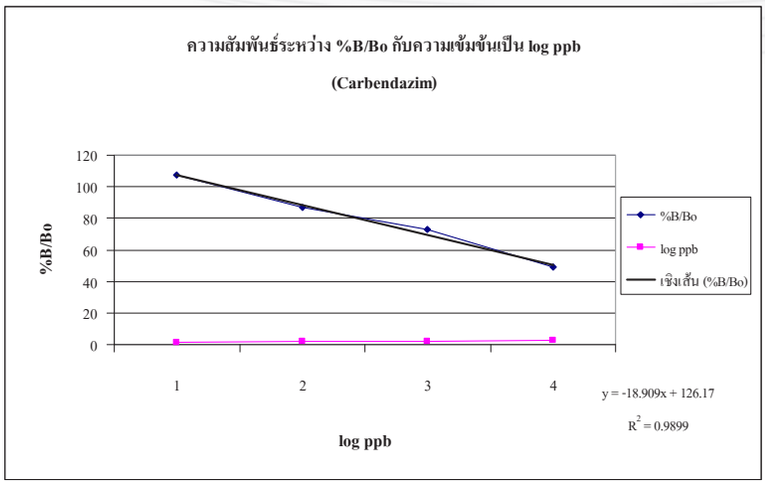
การวิเคราะห์ Benomyl, carbendazim และ thiabendazole ด้วยวิธี immunoassay นี้ดีเพราะสามารถวิเคราะห์ได้ถึงปริมาณน้อยๆถึง ppb ได้ แต่มีข้อควรระวังมาก เพราะเป็นการวิเคราะห์โดยปฏิกิริยาทางชีวเคมีเกี่ยวข้องกับ enzyme, antibody, antigen ต้องระวังอย่างยิ่งเรื่องสิ่งแปลกปลอมที่มากับความไม่สะอาดในขั้นตอนการวิเคราะห์ อุณหภูมิ และเวลาต้องเข้มงวดทุกขั้นตอน ถ้าไม่เป็นไปตามนั้น ปฏิกิริยาไม่เกิด สารเคมีไม่เกิด binding ทำให้ตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารที่ต้องการ และระวังทุกขั้นตอนตามที่กล่าวมาในวิจารณ์ผลการทดลอง ในการทดลองนี้สามารถตรวจได้ตั้งแต่ 0.25-5.00 ppb

การตรวจโดยอาศัยปฏิกริยาทางชีวเคมีของเอ็นไซม์มีความเฉพาะเจาะจงสูงมาก และสามารถตรวจสอบได้ในปริมาณที่ต่ำมากๆ เหมาะสำหรับปริมาณสารพิษตกค้าง (Residue) ที่มีปริมาณต่ำมากๆ ถ้าประเทศไทยสามารถผลิต ELISA Test kit (Immunoassay technique) ขึ้นมาสำเร็จจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพราะตรวจสอบได้รวดเร็ว ความแม่นยำสูง พกพาไปตรวจที่ใดก็ได้ และสำคัญที่สุดไม่ต้องคำนึงถึงความสะอาดของตัวอย่างก่อนจะนำมาตรวจวิเคราะห์ และใช้งานง่าย (โดยไม่นับขบวนการสังเคราะห์สาร เพราะคิดขึ้นมาเป็น test kit เรียบร้อยแล้ว เพียงแต่หยดสารตามที่บอกในคู่มือ แล้วดูการเปลี่ยนสีเท่านั้นเอง) ถ้าจะพัฒนาเป็น test kit ควรผลิต antibody และ antigen ขึ้นมาเอง จะได้ประหยัดค่าใช้จ่าย ในงานวิจัยนี้สั่งซื้อจากสหรัฐอเมริกา ในอนาคตกรมวิชาการเกษตรกำลังดำเนินการพัฒนาเป็น test kit สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการต่อยอดเพื่อพัฒนาได้เป็นอย่างมาก

ผลการทดลองแสดงด้วยภาพ



ภาพที่ 1. แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Absorbance $\%B/B_0$ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Benomyl (log ppb)



ภาพที่ 2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Absorbance $\%B/B_0$ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Carbendazim (log ppb

เอกสารอ้างอิง

Agricultural Handbook, 3rd edition, 1991. The Royal society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Rd., Cambridge, CB 4, 4WK, England, (A0031, A0058).

Baude, F.J.; Gardiner, J.A.; Han J.C.Y. Jr; 1973. Characterization of residues in plants Following foliar spray applications of benomyl, J. Agric. Food Chem. 21, 1084-1090.

Baude, F.j.; Pease, H.l.; and Holt, J.; 1974. Fate of Benomyl on field soil and turf, J. Agric. Food Chem. 22, 413-418.

Benomyl / Carbendazim; Rapid Assays, 1990. Ohmicron Environmental Diagnotics, Sale Department, Newtown, Pensylvania, 18940 , USA.

Chiba, M.; and Veres, D.F.; 1981. Fate of Benomyl and its degradation compound methyl 2-benzimidazole carbamate on apple foliage, J. Agric. Food Chem. 29, 588-590.

Fliker, J.R.; and Lacy, H.M.; 1977. Photolysis of methyl 2-benzimidazole carbamate. J. Agric. Food Chem. 25, 51-55.

Heweg, A.; 1977. Degradation and Absorption of Carbendazim and 2-aminobenzimidazole in Soil, Pesticide Sci. 8, 71-78.

Lyr, H.; 1987. Modern Selective Fungicide (Properties, applications, mechanism of action) Longman Scientific & Technical Copubbished in the United States with John Wiley&Son Inc., Newyork, 283 pp, 233-257.

Piblado, R.E.; and Edgington, L.V.; 1972. Movement of Benomyl in field soil as influene by Acid surfactants, Phypathology, 62, 513-516.

การวิเคราะห์ไซเปอร์เมทรินตกค้างในพริก โดยวิธีอิมมิวโนเอสเส (Immunoassay)

Determination of Cypermethrin Residue in Chilli by Immunoassay

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ [1] *สุปราณี อิ่มพิทักษ์* [2]

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

นำสารไซเปอร์เมทรินมาตรฐานมาทำการ Conjugated กับ protein BSA (Bovine serum albumin) ใช้เป็นตัว immunogen เพื่อนำไป coat microtiter well plate การ Conjugated ใช้กรรมวิธีทางเคมี (Chemical reaction) โดยอาศัย Thionyl chloride เป็น catalyst เพื่อทำการเปลี่ยน carboxylic acid เป็น acid chloride และถูกแทนที่ด้วย amino group จาก protein BSA อีกวิธีหนึ่งโดยการทำปฏิกิริยาอย่างอ่อนๆ โดยการทำให้ amino group จาก protein BSA เข้าแทนที่ OH ใน carboxylic acid แต่ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นช้ามาก แต่มีข้อดีคือทำให้โมเลกุลของโปรตีนไม่มีการแตกสลาย

หลังจากนั้นนำ Microtiter well plate ที่ coat เรียบร้อยแล้ว มาทดสอบหาพิษตกค้างกับ Anticypermethrin-BSA คือ Hybridoma supernatants แล้วหาปริมาณสาร cypermethrin ตกค้างโดยการทำให้เกิดปฏิกริยาแทนที่ด้วย enzyme peroxydase conjugated goat anti-mouse antiserumโดยใช้ substrate 2,2-azinobis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) และ Stopping solution (1N. HCl) สุดท้ายเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดจะได้สารละลายสีเหลือง ใน well plate ที่มี cypermethrin ปริมาณน้อยมากๆ ที่เกาะติดอยู่กับ protein ถ้าต้องการหาปริมาณที่ตกค้างในตัวอย่างพริก นำพริกมาสกัดด้วยสารละลายที่ใช้สกัด แล้วนำมา Conjugated กับ protein BSA เพื่อทำให้เป็น immunogen หลังจากนั้นทำเหมือนกับวิธีการซองไซเปอร์เมทรินมาตรฐาน ถ้าต้องการทราบปริมาณที่แน่นอนนำสารละลายมาวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer หรือ Elisa Reader ที่ wavelength (λ) 405 nm โดยการเปรียบเทียบกับ Calibration Curve ของสารมาตรฐาน วิธีนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็น ELISA Test kit ได้

รหัสโครงการวิจัย งานวิจัยพิเศษตามความต้องการเร่งด่วนของรัฐบาล

[1] นักวิทยาศาสตร์ ชำนาญการพิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

[2] ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร ด้านเคมีเกษตร

คำนำ

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค Immunoassay มาใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษการเกษตร โดยอาศัยหลักการที่ใช้ Antobodies ในการจำแนกชนิดและปริมาณของวัตถุมีพิษ โดยการสร้าง Antibodies ชนิด Anti-pesticide antibodies

Antibodies ผลิตโดย Plasma cells แล้ว secreate ออกมาโดยหนึ่ง plasma cell จะผลิต antibody ออกมาตัวหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัวของมัน antibodies เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งประกอบไปด้วย Amino acid เรียงตัวกันเป็น sequence เป็น 3 dimensions มีสูตรโครงสร้างที่มี site หนึ่งที่สามารถจะเกาะติดกับสารตัวอื่นได้ แต่ต้องมีรูปร่าง specific สำหรับ site นั้นโดยเฉพาะ Antibodies บางรูปร่างสามารถมีโมเลกุลของพวกสารต่างๆ มาเกาะติดได้ เช่น พวกน้ำตาล แบคทีเรีย ไวรัส glycoprotiens, glycolipids และเซลมะเร็ง ซึ่งมี specific site พอดีกับ antibodies นั้นๆ (Mumma, 1988)

วัตถุมีพิษที่ต้องการวิเคราะห์มีสูตรโครงสร้างที่เล็กมากเกินไปไม่สามารถจะเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง antibodies ได้ด้วยตัวของมันเอง ดังนั้นต้องนำโมเลกุลของวัตถุมีพิษมา conjugate กับสารอื่นที่มีโมเลกุลใหญ่ เพื่อจะให้เกิดเป็น antibodies ที่มี specific sites สารที่สร้างขึ้นใหม่โดยการนำโปรตีนมา conjugate กับวัตถุมีพิษเรียกว่า Heptan (Mumma, 1988)

การวิเคราะห์วัตถุมีพิษโดยใช้ Immunoassay เป็นวิธีเปรียบเทียบการ inhibit ของ enzyme ถ้าไม่มี Free pesticide molecule อยู่ enzyme จะไป inhibit pesticide ที่เกาะติดอยู่กับ Heptan จนหมด ทำให้ไม่เกิดสี แต่ถ้ามี Free pesticide molecule อยู่ และสามารถเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน enzyme จะไป inhibit free pesticide molecule จนหมดก่อน enzyme ที่เหลือจึงจะไป inhibit pesticide ที่เกาะติดกับ Heptan ทำให้เกิดสีน้ำเงินขึ้นมา หลังจากเติม substrate ลงไป

ถ้าต้องการยับยั้งปฏิกิริยาไม่ให้เกิดต่อไป โดยให้เกิดเฉพาะช่วงเวลาที่จำกัดเท่านั้น ให้เติม stopping solution จะเกิดสีเหลืองแทนที่สีน้ำเงิน สีที่เกิดขึ้นจะอ่อนหรือแก่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ pesticide ที่ต้องการวิเคราะห์ สีอ่อนแสดงว่ามีความเข้มข้นของ pesticide มาก (Mumma, 1988)

ถ้าวัตถุมีพิษมีความเข้มข้นสูง bind กับ anti-pesticide antibodies ได้มาก จะทำให้เหลือ anti-pesticide antibodies เพียงส่วนน้อยที่จะไป bind กับ pesticides ที่เกาะติดอยู่กับ Heptan ซึ่งเคลือบอยู่บน plate ทำให้ทราบว่า binding site บน Heptan ซึ่ง coat อยู่ที่ plate ถูก inhibit โดย free pesticide ไปจำนวนเท่าไร (Mumma, 1988)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาการใช้เทคนิค Immunoassay ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารไพเรทรอยด์ในเนื้อสัตว์ (Stanker *et al*., 1989) และมีการใช้ศึกษาพิษตกค้างของ pyrethrin, allerthrin, resmethrin, phenothrin โดยใช้เทคนิค Radio immunoassay (Wing, *et al*., 1978) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ parathion โดยใช้เทคนิค Radio immunoassay (Ereccegovide, *et al*., 1981) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ Triazine โดยใช้ ELISA (Harrison, *et al*., 1991), (Goodrow, *et al*., 1990) and (Dunbar, *et al*., 1990) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ Triazole fungicide โดยใช้ ELISA (Forlani, *et al*., 1992) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ Metolachlor โดยใช้ ELISA (Schlaeppi *et al*., 1991) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ Bentazon โดยใช้ ELISA (Li, *et al*., 1991) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ

Chloroacetanilide herbicide โดยใช้ ELISA (Feng, *et al*., 1992) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ Clomazone herbicide โดยใช้ ELISA (Koppatschek, *et al*., 1990) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ 2,4-D โดยใช้ ELISA (Hall, *et al*., 1989) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ Picloram โดยใช้ ELISA (Descechamps, *et al*., 1990) ใช้ศึกษาพิษตกค้างของ norflurazon herbicide โดยใช้ ELISA (Riggle, *et al*., 1990)

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาการวิเคราะห์พิษตกค้างของไซเปอร์เมทรินในพริกโดยใช้วิธี Immunoassay technique หรือ Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์ 1. สารเคมีในการเตรียม Heptan (Py) เช่น standard cypermethrin, dichloromethane, oxalyl chloride, dimethyl formamide, 3-phenoxy benzyl alcohol, pyridine, ether, $NaHCO_3$,Na_2SO_4 , neutral Al_2O_3, benzene, formic acid, ethyl acetate, H_2O_2 , NaOH, HCl, silica gel, Methanol, chloroform, น้ำกลั่น

2. สารเคมีในการ conjugate Heptan กับ BSA (bovine serum albumin) เช่น tri-n-butylamine, dioxane, iso-butylchlorocarbonate, BSA (bovine serum albumin), NaOH, HCl, acetone

3. สารเคมีในการ coat plate wells เช่น Py-BSA, Na_2CO_3 / $NaHCO_3$, buffer pH 9

4. สารเคมีที่ใช้ทำ antigen ที่เกาะติดกับ pesticide คือ ovalalbumin สำหรับให้ enzyme มา inhibit ที่ specific site

5. สารเคมีที่ใช้ทำเป็น antibodies ของ antigen Py-BSA ที่จะมา binding กับ antigen คือ hybridoma supernatants (anti-Py-BSA)

6. สารเคมีที่ใช้ในการล้าง plate คือ tween-20

7. Enzyme ที่จะมาแทนที่ antibodies ของ antigen Py-BSA คือ peroxides (conjugated goat anti mouse anti-serum)

8. Substrate ที่ใช้ทำปฏิกิริยากับ Enzyme คือ 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid และ Stopping solution reaction คือ 1N. HCl

9. Spectrophotometer หรือ ELISA reader

10. สารมาตรฐานไซเปอร์เมทริน ใช้ cypermethrin technical grade (99%) แทน

11. พริกชี้ฟ้าเขียว

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1

1. เตรียม Heptan (Stanker, *et al.*, 1989) โดยการนำ cypermethrin technical grade (99%) 0.86 กรัม เติม 20 ml CH_2Cl_2 เติม oxalyl chloride 740 µl เติม 1 drop dimethyl formamide แล้วคนวางทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2. หลังจากนั้นเติม 2 กรัม 3-Phenoxy benzyl alcohol และเติม 2 ml pyridine คนแล้ววางทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง

3. เติม Ether anhydrous 10 ml แล้วถ่ายใส่ separatory funnel 250 ml ล้างด้วย saturated $NaHCO_3$ 10 ml 2 ครั้ง และน้ำ 10 ml 2 ครั้ง

4. เขย่าเบาๆ แยกเอาชั้น Ether ออก ผ่าน anhydrous Na_2SO_4

5. ระเหยเกือบแห้งใช้ benzene ละลาย 5 ml ผ่าน neutral Al_2O_3 column

6. เติม 10 ml formic acid และ 200 ml ethyl acetate จะได้ phenothrin 1.4 กรัม

7. เก็บไว้ที่ 0^0c เป็นเวลา 20 นาที เติม 3 ml 30% H_2O_2

8. เก็บไว้ที่ 4^0c เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

9. เติม น้ำกลั่น 5 ml และ 2 M. NaOH 5 ml

10. ทำชั้น aqueous layer ให้เป็นกรดด้วย 12 M. HCl แล้วสกัดด้วย CH_2Cl_2ใน separatory funnel 250 ml เขย่าแล้วทิ้งให้แยกชั้น

11. นำชั้น CH_2Cl_2 ผ่าน anhydrous Na_2SO_4 แล้วนำมาระเหยให้เกือบแห้ง ใช้ $CHCl_3$ prewet column (silica gel column) แล้วนำ CH_2Cl_2 ที่สกัดได้ผ่าน silica gel column แล้ว elute ด้วย MeOH : $CHCl_3$ (3:97)

12. สารละลายที่ได้มาระเหยจนเหลือเป็นน้ำมัน (oil) คือ Heptan หรือ Py ที่ต้องการ

ขั้นตอนที่ 2

13. นำ Py มา conjugate กับ BSA (bovine serum albumin) (Erlanger, *et al.*, 1959) โดยชั่ง Py มา 1.2 กรัม ผสมกับ 0.75 ml tri-n-butylamine และ 30 ml dioxane คนให้เข้ากัน แล้วทำให้เย็นจนอุณหภูมิถึง 8^0c เติม 0.4 ml isobutyl chlorocarbonate แล้วเก็บไว้ที่ 8^0c เป็นเวลา 35 นาที

14. คนให้เข้ากัน แล้วเติม 4.2 กรัม BSA และ 110 ml H_2O กับ 80 ml dioxane และ 4.8 ml 1 N. NaOH แล้ววัด pH ให้ได้ = 9 จะได้สารค่อนข้างหนืด

15. ทิ้งไว้ 20 นาที สารละลายจะใสวัด pH จะได้ 6.8 หลังจากนั้นเติม 1.75 ml 1N. NaOH และ 0.5 ml 1 N. NaOH คนเป็นเวลา 30 นาที แล้ววางทิ้งไว้ 4.5 ชั่วโมง

16. ปรับ pH = 4.5 ด้วย 1 N. HCl แล้วเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะตกตะกอนสีขาวนวล

17. นำตะกอนมาละลายด้วย 200ml H_2O ปรับ pH = 7 ด้วย 1 N. NaOH แล้วเติม 300 ml cold acetone แล้วปรับ pH = 5 ด้วย 1 N. HCl ตะกอนจะตกเพิ่มมากขึ้น โดยเก็บตะกอนผ่านกระดาษกรอง แล้วอบที่ 70^0c หลังจากนั้นเก็บตะกอนไว้ในตู้เย็น 3 ชั่วโมง จะได้ conjugated py-BSA

ขั้นตอนที่ 3

18. นำ Py-BSA มา coat plate (microtiter plate 96 wells) (Stanker, et al., 1989) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 2 µg / ml ใน $CO^{=}_{3}$ / H CO^{-}_{3} buffer pH 9 โดยทำการ coat ด้วย 100 µl ของ Py-BSA / well แล้ววางทิ้งไว้ 18 ชั่วโมงที่ 4^{0}c

19. เติม 3% antigen คือ cypermethrin ที่เกาะติดกับ ovalalbumin สำหรับให้ enzyme มา inhibit ที่ specific site ปริมาณ 50µl (65 ppb) 100µl (130 ppb) 200µl (260 ppb) 400µl (520 ppb)
800µl (1040 ppb) เพื่อทำ calibration curve

20. ถ้าเป็นของตัวอย่างพริก จากข้อ 18 มาทำข้อ 20 คือเติม 3% antigen คือ ตัวอย่างพริกสกัดที่เกาะติดกับ ovalalbumin สำหรับให้ enzyme มา inhibit ที่ specific site ปริมาณ 500 µl
เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำค่า % absorbance มาเปรียบเทียบกับ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่แน่นอน

21. เติม Antibodies ของ antigen Py-BSA ลงในข้อ 19 และ 20 ที่จะมา binding กับ antigen คือ hybridoma supernatants (anti-Py-BSA) 50 µl แล้ว incubate ต่อ 1 ชั่วโมงที่ 37^{0}c

22. ล้าง plate ด้วย 0.05% tween-20 in water แล้วเติม 50µl Enzyme ที่จะมาแทนที่ antibodies ของ antigen Py-BSA คือ peroxides (conjugated goat anti-mouse anti-serum) แล้วเขย่าให้เข้ากันเบาๆ incubate ต่อ 1 ชั่วโมงที่ 37^{0}c

23. ล้าง plate ด้วย dilute 1:500 assay buffer (0.005 M. Na_3 PO_4 + 0.075 N. NaCl + 0.001% tween-20 (pH 7.2) แล้ว incubate ต่อ 1 ชั่วโมงที่ 37^{0}c

24. ล้าง plate ด้วย 0.05% tween-20 in water อีกครั้ง

25. เติม Substrate คือ 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid และ Green ABTS 100µl/หลุม เพื่อทำปฏิกิริยากับ enzyme จะเกิดสีน้ำเงิน ถ้าปริมาณวัตถุมีพิษมีปริมาณน้อย ถ้าวัตถุมีพิษมีมากสีจะจาง แล้ว incubate ต่อ 1 ชั่วโมงที่ 37^{0}c

26. เติม Stopping solution reaction คือ 1N. HCl 50µl / หลุม จะเกิดสีเหลืองแทนสีน้ำเงิน แล้ววางทิ้งไว้ 15 นาทีในที่มืด หลังจากนั้นนำมาวัด absorbance ที่ 405 nm. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer หรือ ELISA reader

27. นำค่า absorbance ที่วัดได้มาคำนวณ %B / B_0 (Inhibition) จากสูตร

$$\%B / B_0 = \frac{\text{absorbance ที่วัดได้ - absorbance ของ blank}}{\text{absorbance ของ blank}} \times 100$$

แล้วนำค่า $\%B/B_0$ มาทำ calibration curve ของ สารมาตรฐาน โดย plot ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นเป็น ppb. สามารถหาความเข้มข้นของพิษตกค้างของสารพิษไซเปอร์เมทรินในตัวอย่างได้โดยเปรียบเทียบกับ Calibration curve

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (ppb) กับค่า Absorbance (B) และ % Inhibition (%B/B_0)

Concentration (ppb)	absorbance(B)	% inhibition (%B/B_0)
0	0.102	100
65	0.094	84.31
130	0.085	66.66
260	0.076	49.01
520	0.068	33.33
1040	0.054	5.88

ค่า Background absorbance (B_0) = 0.051

ตารางที่ 2. ค่า Absorbance (B) และ % Inhibition (%B/B_0) ในการหา %Recovery ของ Cypermethrin ในพริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

Conc.(ppb)	Absorbance(B)	%Inhibition (%B/B_0)		%Recoveries
		calculate	Calibration curve	
125	0.081	58.82	57.02	96.33
250	0.074	45.09	44.10	97.80
500	0.061	19.60	19.00	96.93

ค่า Background absorbance (B_0) = 0.051

ตารางที่ 3. เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์พิษตกค้างของ Cypermethrin โดยวิธี Conventional และวิธี ELISA

Method of analysis	conc.(ppb)	%recoveries
GC	125	96.80
	250	98.20
	500	97.60
TLC	250	85.00
	500	88.00
ELISA	125	96.33
	250	97.80
	500	96.93

Limit of determination ของวิธี Immunoassay ตรวจได้ตั้งแต่ 65-1,040 ppb. ใกล้เคียงกับของ Brown, *et al.*,1987 ซึ่งตรวจได้ 50-1,000 ppb วิธีการนี้สามารถประยุกต์มาใช้ตรวจได้ทั้ง Permethrin, fenvalerate, deltamethrin, cyhalothrin และสาร Pyrethroids ทุกตัวที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วย cyclopropane ring เป็นโครงสร้างหลัก

การเตรียมสาร Heptan เพื่อจะมา conjugate กับ BSA ต้องระวังและเตรียมให้ดี จึงจะได้ % yield ออกมาสูง จากการทดลอง synthesis สาร phenothrin ในการทดลองครั้งที่ 1 ได้ 17.92 กรัม และในการทดลองครั้งที่ 2 ได้ 15.63 กรัม เมื่อดำเนินการต่อมาจนถึงได้สาร Heptan ในการทดลองที่ 1 ได้ Heptan 110 กรัม และในการทดลองที่ 2 ได้ Heptan 120 กรัม

หลังจากนั้นนำมา conjugate กับ BSA (ตามวิธีการของ Erlanger, *et al.*,1959) ในการทดลองครั้งที่ 1 ได้ Py-BSA 30.8 mg และในการทดลองครั้งที่ 2 ได้ Py-BSA 58.5 mg Py-BSA มีลักษณะเป็นผงสามารถเก็บไว้ได้นาน ถ้ายังไม่ละลายเป็นสารละลาย จะทำการละลายเมื่อจะใช้ coat plate (micro titer plate well) เท่านั้น โดยเก็บไว้ที่ -40^{0}c

ตารางที่ 4. แสดงชนิดและปริมาณสารที่ได้ในการสังเคราะห์ เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย

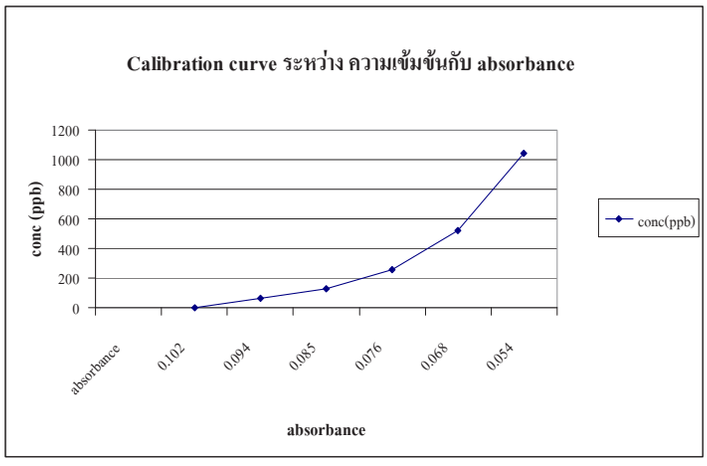
ชนิดสาร	ปริมาณ	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
phenothrin	17.92	15.63
Heptan	110.00	120.00
Py-BSA	30.80	58.50

สรุปผล คำแนะนำ และการนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการวิเคราะห์ไซเปอร์เมทริน ด้วยวิธี Immunoassay เหมาะสำหรับใช้เป็น screening test ที่ดีที่สุด เพราะ sensitivity ดีมาก recovery ยิ่งความเข้มข้นต่ำมากๆ ก็สามารถตรวจได้ดี เพราะเป็นขบวนการของ enzyme ทางชีวเคมี แต่ขบวนการทำค่อนข้างยุ่งยาก ต้องใช้นักเคมีวิเคราะห์ที่มีความสามารถเฉพาะทางสูง ขั้นตอนการตรวจ สามารถทำได้รวดเร็ว ถ้าไม่คิดกรรมวิธีการสังเคราะห์สารทั้ง 3 ตัวที่กล่าวมาข้างต้น เพราะการนำมาทำเป็น test kit ได้นำเอาเฉพาะ Py-BSA ที่สังเคราะห์เสร็จที่เก็บไว้ที่ -40 ^{0}c มาใช้ coat well plate หรืออาจใช้เป็น strip cell ก็ได้ เหมือนที่ต่างประเทศผลิตขึ้นมาขายสำหรับสารพิษชนิดต่างๆ การตรวจโดยอาศัยปฏิกริยาทางชีวเคมีของเอ็นไซม์มีความเฉพาะเจาะจงสูงมาก และสามารถตรวจสอบได้ในปริมาณที่ต่ำมากๆ เหมาะสำหรับปริมาณสารพิษตกค้าง (Residue) ที่มีปริมาณต่ำมากๆ ถ้าประเทศไทยสามารถผลิต ELISA Test kit (Immunoassay technique) ขึ้นมาสำเร็จจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพราะตรวจสอบได้รวดเร็ว ความแม่นยำสูง พกพาไปตรวจที่ใดก็ได้ และสำคัญที่สุดไม่ต้องคำนึงถึงความสะอาดของตัวอย่างก่อนจะนำมาตรวจวิเคราะห์ และใช้งานง่าย (โดยไม่นับขบวนการสังเคราะห์สาร เพราะคิดขึ้นมาเป็น test kit เรียบร้อยแล้ว เพียงแต่หยดสารตามที่บอกในคู่มือ แล้วดูการเปลี่ยนสีเท่านั้นเอง) ถ้าจะพัฒนาเป็น test kit ควรผลิต antibody และ antigen ขึ้นมาเอง

จะได้ประหยัดค่าใช้จ่าย ในงานวิจัยนี้สั่งซื้อจากสหรัฐอเมริกา ในอนาคตกรมวิชาการเกษตรกำลังพัฒนาเป็น test kit จะได้นำไปใช้เป็นพื้นฐานในการต่อยอดได้ประโยชน์เป็นอย่างมาก

ผลการทดลองแสดงด้วยภาพ

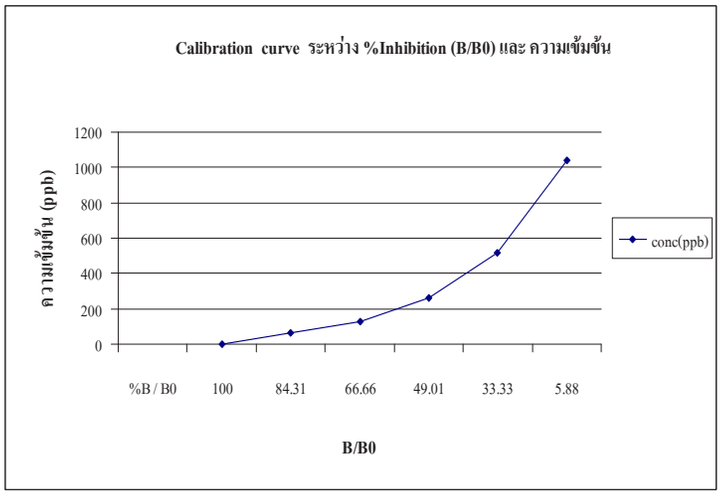


ภาพที่ 1. Calibration curve ระหว่างความเข้มข้น (ppb) กับค่า Absorbance (B)

จากกราฟที่ 125 ppb จะได้ absorbance 0.081

250 ppb จะได้ absorbance 0.074

500 ppb จะได้ absorbance 0.061



ภาพที่ 2. Calibration curve ระหว่างความเข้มข้น (ppb) กับค่า % Inhibition (%B/B_0)

จากกราฟ 125 ppb จะได้ % Inhibition (%B/B_0) 57.02

250 ppb จะได้ % Inhibition (%B/B_0) 44.10

500 ppb จะได้ % Inhibition (%B/B_0) 19.00

เอกสารอ้างอิง

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ สุปราณี อิ่มพิทักษ์ 2537 การวิเคราะห์วัตถุมีพิษชนิดไซเปอร์เมทรินตกค้างในข้าวโพดฝักอ่อนโดยวิธีอิมมิวโนเอสเส (Immunoassay) 7 หน้า

Deschamps, R. Ja.; Hall, J.C.; McDermolt, M.R.; 1990. J. Agric. Food Chem, 38, 1881-1886.

Dunbar, B.; Riggle, B.; Niswender, G.; 1990. J. Agric. Food Chem, 38, 433-437.

Ercegovide, C.D.; Vellejo, R.P.; Gettig, R.R.; Woods, L.; Bogus, E.R.; Mumma, R.O.; 1981. J. Agric. Food Chem, 29, 559-563.

Erlanger, B.F.; Borok, F.; Beiser, S. M.; Lieberman, S.; 1959. J. Biol. Chem., 234, 1090-1094.

Feng, P.C.C.; Horton, S.R.; Sharp, C.R.; 1992. J. Agric. Food Chem., 40, 211-214.

Forlani, F.; Amoli, A.; Pagani, S.; 1992. J. Agric. Food Chem., 40, 328-331.

Goodrow, M.H.; Harrison, R.O.; Hammock, B.D.; 1990. J. Agric. Food Chem., 38, 990-996.

Hall, J.C.; Deschamps, R.J.A.; Krieg, K.K.; 1989. J. Agric. Food Chem., 37, 981-984.

Harrison, R.O.; Goodrow, M.H.; Hammock, B.D.; 1991. J. Agric. Food chem., 39, 122-128.

Koppatschek, F.K.; Liebi, R.A.; Kriz, A.L.; Melhado, L.L.; 1990. J. Agric. Food Chem., 38, 1519 -1522.

Li, Q.X.; Hammock, B.D.; Seiber, J.N.; 1991. J. Agric. Food Chem, 39, 1537-1544.

Mumma, R.; 1988. Potential of Immunoassay in Monitoring Pesticide Residues in Food, Pensylvania State University and Westing house Bio - Analytic systems Co. USA (11pp.)

Riggle, B.; Dunbar, B.; 1990. J. Agric. Food Chem, 38, 1922-1925.

Schlaeppi, J.M.; Moser, H.; Ramsteiner, K.; 1991. J. Agric. Food Chem, 39, 1533-1536.

Stanker, L.H.; Biggle, C.; Emon, J.V.; Watlains, B.; Jensen, R.H.; Mirris, C.; Vanderiaan, M.; 1989. J. Agric. Food Chem, 37, 834-839.

Wing, K.; Hammock, B.D.; Wustner, D.A.; 1978. J. Agric. Food Chem, 26, 1328-1333.

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในชะอมโดยใช้เทคนิค chromatography: พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphorus

จินตนา ภู่มงกุฎชัย พนิดา ไชยยันต์บูรณ์ สุพัตรี หนูสังข์ บุญทวีศักดิ์ บุญทวี

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus จำนวน 21 ชนิดในชะอม โดยเลือกจากวิธีการเตรียมตัวอย่าง 2 แบบคือ การปั่นตัวอย่างแบบธรรมดา และการปั่นตัวอย่างด้วยการเติมน้ำแข็งแห้ง (DI) ตัวอย่างที่ได้จากการปั่นทั้ง 2 แบบนำมาสกัดด้วย 5 วิธี จำแนกเป็น 2 หมวด หมวดหนึ่งมีการ clean-up ในการสกัดด้วยเทคนิค dispersive solid phase extraction ใช้คำย่อของวิธีว่า Q ซึ่งมาจาก QuEChERS เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายแต่ในรายละเอียดของวิธีการได้ถูกพัฒนาไปจากวิธีการดั้งเดิมประกอบด้วย 3 วิธีย่อยได้แก่ Q1 เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการของประเทศสมาชิกในสหภาพยุโรปใช้ Q2 เป็นวิธีที่ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้และใช้เป็น standard method ใน AOAC และ Q3 เป็นวิธีดั้งเดิม ส่วนหมวดที่ไม่มีการ clean-up นำวิธี Steinwandter ซึ่งเป็นวิธีที่กรมวิชาการเกษตรใช้ตรวจวิเคราะห์พืชผัก ผลไม้ส่งออกเป็นหลักประกอบด้วย 2 วิธีย่อย ได้แก่ St เป็นวิธี Steinwandter เป็นวิธีที่กรมวิชาการเกษตรใช้ในปัจจุบันและ Sp เป็นวิธี Steinwandter และเติม H_3PO_4 พร้อมกับปั่นตัวอย่างในขณะเย็น นำวิธีทั้ง 10 มาดำเนินการตามวิธีที่กำหนดทดสอบที่ 3 ระดับ ความเข้มข้น ได้แก่ 0.05, 0.1 และ 0.5 µg/ml และแต่ละตัวอย่างสกัด 3 ซ้ำ นำตัวอย่างที่สกัดตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-FPD เพื่อหา % recovery พบว่าทั้ง 10 วิธีให้ผลการวิเคราะห์รวม (recovery) ในช่วง 82-96% สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีความเป็น polar มากกว่าบางชนิดอยู่นอกเกณฑ์กำหนด (70-120%) วิธีที่เหมาะสมที่สุดได้แก่ วิธี St-DI, Sp-DI, Q1 และ Q2 วิธี St-DI และวิธี Sp-DI เป็นวิธีเติมน้ำแข็งแห้งในการสกัดแบบ Steinwandter ซึ่งเป็นวิธีไม่ผ่านการ clean-up ส่วนวิธี Q1 และ Q2 เป็นวิธีสกัดแบบ QuEChERS ที่มีการพัฒนาด้วยการใช้ buffer และมีการ clean-up เพื่อขยายวิธีการสกัด สามารถนำวิธีทั้ง 4 ไปทดสอบกับการวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan เมื่อได้วิธีที่สมบูรณ์จะได้นำไปสู่การ validate วิธีการนี้ต่อไป

คำนำ

ปัญหาสารพิษตกค้างในสินค้าเกษตรเป็นปัญหาที่มีความสำคัญมากยิ่งขึ้น การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างให้ได้ผลต่ำมากและสามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายชนิด การพัฒนาเทคนิคและวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำ เหมาะสม รวดเร็ว

ทันต่อความต้องการ ลดค่าใช้จ่าย และใช้สารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม รองรับการตรวจวิเคราะห์สินค้าเกษตรส่งออก และห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร ทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาค สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี ไปใช้ตามความเหมาะสม สามารถนำไปทดสอบเพื่อเพิ่มชนิดของวัตถุมีพิษหรือพืชเพื่อขยายขอบเขตของการวิเคราะห์ให้มากขึ้นและสามารถใช้เป็นวิธีที่ขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 และใช้เป็นวิธีทางเลือกในกรณีจำเป็นได้

ชะอมมีชื่อเรียกในภาคเหนือว่า ผักหละ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acacia pumate* wild sub sp. Insuavis Nielsen อยู่ในวงศ์ Mimosaceae ใบอ่อนหรือยอดอ่อนจะมีกลิ่นฉุนคล้ายสะตอหรือดอกดิน จึงนิยมนำมาขายเป็นผักเพื่อประกอบอาหาร ชะอมเป็นพืชผักที่มีวิตามินเอสูงมาก และเป็นพืชส่งออกที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในชะอมจะต้องมีความระมัดระวัง เนื่องจากสารที่มีกลิ่นเฉพาะจะสามารถตรวจวัดได้ดีด้วย GC เช่นเดียวกับวัตถุอันตรายที่ตรวจวิเคราะห์ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในชะอมจึงมีความสำคัญ

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 เครื่องแก้วชนิดต่างๆได้แก่ flat bottom flask, volumetric flask, reagent bottle, pipette, GC vial, glass syringe, test tube, cylinder, beaker

1.1.2 เครื่องหั่นและผสมอาหาร (food processor)

1.1.3 เครื่องสกัดวัตถุมีพิษโดยการปั่น (homoginizer)

1.1.4 เครื่องระเหยสารละลาย (rotary evaporator)

1.1.5 เครื่องกวนตัวอย่าง (vortex mixer)

1.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลาย (centrifuge)

1.1.7 เครื่องเขย่าสาร (shaker)

1.1.8 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น Teflon tube พร้อมฝาปิด Auto pipette SPE manifold

1.1.9 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด (electronic balance) 5 ตำแหน่ง

1.1.10 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ (electronic balance) 2 ตำแหน่ง

1.1.11 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษ gas chromatograph (GC) ที่มีหัวตรวจ (detector) ชนิด flame photometric detector (FPD)

1.2 สารเคมี

1.2.1 ethyl acetate ; EtAc (PR grade), acetonitrile ; ACN (AR และ PR grade), acetone (AR grade), dichloromethane;CH_2Cl_2 (AR และ PR grade)

1.2.2 sodium chloride ;NaCl (ACS grade), primary secondary amine ;PSA

1.2.3 acetic acid ;HAc, formic acid ;HCOOH, phosphoric acid ;H_3PO_4 (ACS grade)

1.2.4 sodium acetate ; NaAc, disodium citrate, sodium citrate (ACS grade)

1.2.5 CHROMABOND : diamino/carbon clean-up-mix; 0.15g diamino+0.9g $MgSO_4$+45mg carbon

1.2.6 CHROMABOND : citrate extraction mix ; 4g $MgSO_4$ + 1g NaCl + 0.5g Na_2 Hcitrate. 1.5 H_2O + 1g Na_3 citrate $2H_2O$

1.2.7 CHROMABOND : acetate extraction mix; 6g $MgSO_4$+1.5g NaAc

1.2.8 sodium sulphate Na_2SO_4 ชนิด anhydrous granular, ขนาดเม็ด 12-60 mesh นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450^{O}C นาน 4 ชั่วโมง ก่อนใช้งานนำไปอบที่ 130^{O}C นาน 24 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นใน desiccator

1.2.9 magnesium sulfate anhydrous $MgSO_4$ ก่อนใช้งานนำไปเผาที่ 550^{O}C นาน 5 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นใน desiccator

2. การกำหนดวิธีการทดสอบ

การเลือกใช้วิธีการทดสอบ การเตรียมตัวอย่าง การตรวจวิเคราะห์ แต่ละส่วนมีความสำคัญ แบ่งเป็น

2.1 การคัดเลือกวิธี ใช้การทำความสะอาดตัวอย่าง (clean-up) และเป็นวิธีที่นิยมและใช้ในปัจจุบันได้แก่

2.1.1 วิธีที่ไม่มีการ clean-up โดยนำวิธี Modified Steinwandter, 1985 ซึ่งเป็นวิธีที่กรมวิชาการเกษตรใช้ตรวจวิเคราะห์พืชผัก ผลไม้ส่งออก เป็นหลักประกอบด้วย 2 วิธีย่อย ได้แก่

2.1.1.1 St เป็นวิธี Steinwandter เป็นวิธีที่กรมวิชาการเกษตรใช้

2.1.1.2 Sp ป็นวิธี Steinwandter ใช้ตัวอย่างแช่แข็งเติม H_3PO_4 ปั่นตัวอย่างในขณะเย็น

2.1.2 วิธีที่มีการ clean-up ในการสกัดด้วยเทคนิค dispersive solid phase extraction ซึ่งใช้คำย่อของวิธีว่า Q ซึ่งมาจาก QuEChERS เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายแต่ในรายละเอียดของวิธีการได้ถูกพัฒนาไปจากวิธีการดั้งเดิม โดยประเทศสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรป ประกอบด้วย 3 วิธีย่อย เป็นวิธีตัวแทนของวิธีสกัดตัวอย่างที่มีการ clean-up ได้แก่

2.1.2.1 Q1 (citrate) เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการของประเทศสมาชิกในสหภาพยุโรปใช้ (CEN,2008)

2.1.2.2 Q2 (acetate) เป็นวิธีที่ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้และเผยแพร่ใน AOAC (2007)

2.1.2.3 Q3 เป็นวิธีดั้งเดิม (Anastassiades และคณะ,2003)

วิธี Q1 และ Q2 เป็นวิธีที่มีการใช้สารที่เป็น buffer ร่วมในขั้นตอนการสกัด

2.2 การเลือกวิธีเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างมีความสำคัญต่อผลของการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีการสกัด แบ่งย่อยการเตรียมตัวอย่างเป็น 2 วิธี ได้แก่

2.2.1 การปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นและผสมอาหารที่ใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร

2.2.2 การปั่นตัวอย่างโดยเติมน้ำแข็งแห้ง เป็นวิธีที่ปรับจากการเตรียมตัวอย่างของวิธี QuEChERS เพื่อให้ตัวอย่างมีขนาดเล็กมาก และมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น

เมื่อรวมการคัดเลือกวิธี และการเตรียมตัวอย่าง จะได้วิธีการทดสอบ 10 วิธีการ ดังนี้

	ปั่นตัวอย่างแบบธรรมดา		ปั่นตัวอย่างด้วยน้ำแข็งแห้ง (Di)
St	Steinwandter	St-Di	Steinwandter
Sp	Steinwandter + H_3PO_4	Sp-Di	Steinwandter + H_3PO_4
Q1	QuEChERS (citrate)	Q1-Di	QuEChERS(citrate)
Q2	QuEChERS (acetate)	Q2-Di	QuEChERS (acetate)
Q3	QuEChERS (no buffer)	Q3-Di	QuEChERS (no buffer)

แต่ละวิธีการทั้ง 10 วิธี ทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.05, 0.1 และ 0.5 µg/ml และแต่ละตัวอย่างสกัด 3 ซ้ำ ดำเนินการสกัดตัวอย่างตามวิธีการแต่ละวิธีหลัก 5 วิธี(ภาพที่ 1)

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐานกลุ่ม organophosphorus 21 ชนิด ได้แก่ DDVP, omethoate, monocrotophos, pirimiphos methyl, parathion methyl, malathion, parathion, ethion, triazophos, phosalone, diazinon, methamidophos, mevinphos, dimethoate, chlorpyrifos, pirimiphos-ethyl, fenitrothion, prothiophos, azinphos-ethyl, EP และ profenofos เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่ม organophosphorus 21 ชนิด ใน ethyl acetate (PR grade) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 µg/ml เป็น stock standard solution

- mix stock standard solution และเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ 50-100 µg/ml เป็น intermediate standard solution

- เจือจาง intermediate standard solution เป็น working standard solution ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับฉีดเข้าเครื่อง GC

4. การตรวจวิเคราะห์ด้วย GC มีรายละเอียดดังนี้

การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างด้วย GC นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดและสารละลายมาตรฐานฉีดเปรียบเทียบกันด้วย GC ดังนี้

สารกลุ่ม organophosphorus ใช้ GC ที่มี detector เป็น FPD

GC model : Agilent 6890 N

Column (FPD) : DB-5.625 0.25 um film thickness , 30 m. length , 0.32 mm.id.

Temperatur : injector 250 °C , detector , 250 °C

Oven temperature program : 70°C (3.00 min) $\xrightarrow{15\ ^\circ C/min}$ 120° C (1.00 min) $\xrightarrow{15^\circ C/min}$ 250° C (6.33 min) $\xrightarrow{15^\circ C/min}$ 260° C (10.00 min)

Inject mode : splitless (purge on time = 1 min)

Carrier gas : helium, total flow 74.8 ml/min

Make up gas : nitrogen, flow rate 60 ml/min

H_2/Air ratio (FPD) : 150/110 ml/min

Injection volume : 1 ul

ระยะเวลา

เริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้างในพืชผัก กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการตรวจวิเคราะห์สาร 21 ชนิด ของ organophosphorus ด้วยวิธี St (ตารางที่ 1) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 µg/ml ให้ % recovery รวม 76.2% และมี 8 ชนิดที่อยู่นอกเกณฑ์กำหนด (70-120%) ได้แก่ DDVP, mevinphos, omethoate, monocrotophos, parathion-ethyl, profenofos, phosalone และ azinphos-ethyl ในทำนองเดียวกันที่ 0.1 µg/ml ให้ % recovery เท่ากับ 83.2% และมีสารที่นอกเกณฑ์ 2 ชนิด ได้แก่ omethoate monocrotophos และที่ 0.5 µg/ml ให้ % recovery เท่ากับ 87.6 % และสารที่นอกเกณฑ์เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml สำหรับ prothiofos มี matrix ที่เสริมการวิเคราะห์มากทำให้ % recovery สูงมาก และเมื่อสกัดชะอมด้วยวิธี Sp ให้ % recovery รวมที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.5 µg/ml เท่ากับ 89.4 ,88.5 และ 80.5% สารที่ตรวจได้ recovery ต่ำกว่าเกณฑ์ ได้แก่ methamidophos mevinphos omethoate monocrotophos เช่นเดียวกับตารางที่ 2 ที่ใช้น้ำแข็งแห้งในขณะปั่นชะอมให้มีขนาดเล็กซึ่งสกัดด้วยวิธี St-DI ให้ % recovery ที่ 0.05, 0.1 และ 0.5 µg/ml 83.3, 83.5 และ 82.1% และสกัดด้วย Sp-DI ให้ 82.5, 84.7 และ 82.9% ตามลำดับ จาก % recovery รวมที่ได้ พบว่าวิธีที่ไม่มีการ clean-up ทั้ง 4 วิธี ให้ % recovery ของสาร 21 ชนิดในภาพรวมใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 82–86% ซึ่งแต่ละสารที่ตรวจวิเคราะห์จะให้ recovery ใกล้เคียงกันและที่สารบางชนิดที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีความเป็น polar มากกว่าทำให้เกิดการคลาดเคลื่อนและบางชนิดเกิดจาก matrix ของชะอมที่ไปบดบังหรือหน่วงในช่วงของการวิเคราะห์ ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด

สำหรับวิธีที่มีการ clean-up แบบ dispersive solid phase extraction ซึ่งใช้คำย่อของวิธีว่า Q ซึ่งมาจาก QuEChERS ประกอบด้วย 3 วิธีย่อย ได้แก่ Q1 Q2 และ Q3 การใช้วิธีสกัด QuEChERS และปั่นตัวอย่างแบบธรรมดา พบว่าวิธี Q1 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.5 µg/ml ให้ % recovery 91.3, 92.8 และ 84.2 วิธีนี้สารที่ให้ผลไม่อยู่ในเกณฑ์ ได้แก่ DDVP omethoate และ monocrotophos วิธี Q2 ให้ % recovery 88.4, 90.5 และ 82.8 ตามลำดับ ซึ่งผลที่อยู่นอกเกณฑ์ ได้แก่ methamidophos DDVP omethoate และ monocrotophos ส่วนวิธีที่ Q3 ให้ % recovery 94.5, 90.5 และ 92.0 ตามลำดับ สารที่ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนดได้แก่ methamidophos DDVP mevinphos omethoate และ monocrotophos (ตารางที่ 1) สำหรับวิธีการที่ได้จากการปั่นตัวอย่างและเติมน้ำแข็งแห้งนั้นได้ % recovery 89.8, 93.3, 85.1 ของวิธี Q1-DI; 85.8, 85.4 และ 78.4 ของวิธี Q2-DI และ 105.9, 98.7 และ 85.2 ของวิธี Q3-DI ตามลำดับความเข้มข้น สารที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ในแต่ละวิธีมีมากกว่าวิธีที่ปั่นตัวอย่างธรรมดา (ตารางที่ 2) จาก % recovery รวมทั้ง 10 วิธี ให้ % recovery ของสาร 21 ชนิดในภาพรวมอยู่ในช่วง 82-96% ซึ่งสารบางชนิดไม่อยู่ในเกณฑ์วิเคราะห์นั้นเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีความเป็น polar มากกว่า ผลที่ได้จึงเกิดการคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์จะต้องใช้ column ที่สะอาดไม่มีสิ่งสกปรกตกค้างใน column มาก และสารบางชนิดเกิดจาก matrix

ของชะอมที่ไปเสริมหรือหน่วงในช่วงของการวิเคราะห์ ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด (ตารางที่ 3) นำผลเฉลี่ยของทั้ง 10 วิธีเปรียบเทียบระหว่างวิธี มีผลไม่แตกต่างกันในขณะที่สารที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ของวิธี St-DI, Sp-DI, Q1 และ Q2 มีเพียง 1-2 ชนิดที่อยู่นอกเกณฑ์กำหนด วิธีทั้ง 4 นี้ได้จาก 2 วิธีของการปั่นตัวอย่าง วิธีการที่ปั่นตัวอย่างแบบธรรมดาต้องมีการ clean-up ในวิธีนั้นด้วย (Q1 และ Q2) แต่ถ้าปั่นตัวอย่างแบบใช้น้ำแข็งแห้ง และไม่มีการ clean-up (St-DI และ Sp-DI) จะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphorus ในชะอมสามารถนำวิธีทั้ง 4 ทดสอบในการศึกษาในการวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan ในชะอมขยายวิธีวิเคราะห์ เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ครบทั้ง 3 กลุ่มจะได้ทำการ validate วิธีที่เหมาะสมนี้ต่อไป ส่วนการศึกษาหาผลของ matrix ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างแต่ละชนิดของวิธีการสกัดแต่ละวิธีจะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่ม organophosphorus ในชะอม ทั้ง 10 วิธีการ โดยแยกเป็น 2 วิธีการปั่นตัวอย่าง คือ การปั่นตัวอย่างธรรมดาและการปั่นตัวอย่างที่เติมน้ำแข็งแห้ง (DI) วิธีสกัดหลักแยกเป็น 2 วิธี ซึ่งเป็นวิธีที่มีการ clean-up ประกอบด้วย 3 วิธีย่อยตามการพัฒนาของแต่ละประเทศที่นำไปใช้(Q1 Q2 และ Q3) กับวิธีที่ไม่มีการ clean-up ประกอบด้วย 2 วิธีย่อยซึ่งปั่นตัวอย่างในขณะเย็น ปรับ pH (Sp) และวิธี Steinwandter (St) ผลการทำ recovery ทั้ง 10 วิธีให้ผลใกล้เคียงกัน แต่วิธีที่เหมาะสมที่สุดได้แก่ วิธี St-DI, Sp-DI, Q1 และ Q2 ซึ่งวิธี St-DI และวิธี Sp-DI เป็นวิธีเติมน้ำแข็งแห้งใช้การสกัดแบบ Steinwandter ซึ่งไม่ผ่านการ clean-up ส่วนวิธี Q1 และ Q2 เป็นวิธีสกัดแบบ QuEChERS ซึ่งที่ใช้ Buffer ในระหว่างการสกัดและมีการ clean-up สำหรับสารบางชนิดที่ได้ผลการวิเคราะห์อยู่นอกเกณฑ์ สาเหตุหนึ่งมาจาก matrix ของชะอมที่มีกลิ่นชนิดเฉพาะ นำวิธีทั้ง 4 ทดสอบในการวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan ในชะอมเป็นการลดจำนวนวิธีวิเคราะห์ลงได้ เพื่อนำไปสู่การ validate วิธีการที่เหมาะสมต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำผลการทดลองหา validation เพื่อหาวิธีที่ใช้ได้
2. ผลการทดลองสามารถนำทดสอบและเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นที่มีกลิ่นเฉพาะ
3. นำข้อมูลหรือข้อจำกัดของแต่ละวิธีไปปรับใช้กับสารพิษตกค้างชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน
4. นำทั้ง 4 วิธีทดสอบในการวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan ในชะอม
5. นำวิธีการสกัดทำการทดลองซ้ำ โดยใช้ GC-MS หรือ LC-MS/MS ที่สามารถวิเคราะห์ในปริมาณต่ำและมีความเที่ยงมากกว่า GC

เอกสารอ้างอิง

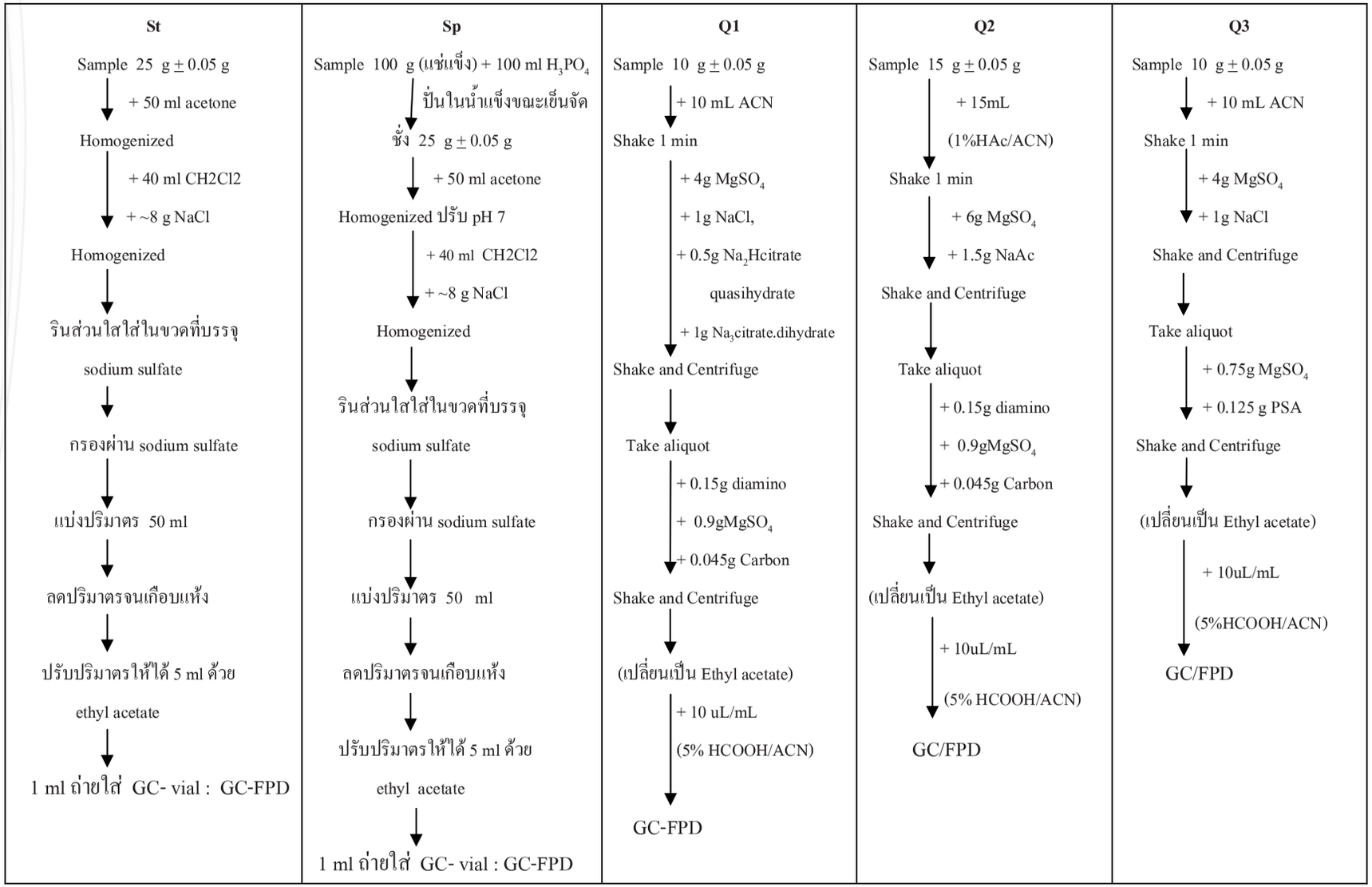
Anastassiades M., Steven J. Lehotay, Darinka Stalbaher and Frank J. Schenk, 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employinging Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phrase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int.V.86, No.2: 412-431.

AOAC, 2007. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. AOAC Official Method 2007.01 . J. AOAC Int.

European Committee for Standardization(CEN), 2008. Food of plant origin – Determination of pesticide Residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method. European Standard (EN15662).

Steinwandter H., 1985. Universal 5 min on line Mehtod for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius. Z. Anal. Chem. No.1155.

ภาพที่ 1 แสดงวิธีการสกัด 5 วิธีหลัก



ตารางที่ 1 %recovery ของ organophosphorus 21 ชนิด 5 วิธีสกัดที่ปั่นตัวอย่างปกติ 3ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 µg/ml

Pesticide	St				Sp				Q1				Q2				Q3			
	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave
methamidophos	109.1	85.6	77.8	90.8	58.7	58.0	55.4	57.3	115.2	107.3	75.1	99.2	94.5	84.5	69.3	82.7	67.1	68.1	70.2	68.5
ddvp	51.6	70.7	77.9	66.7	85.4	83.8	84.3	84.5	76.1	70.7	55.0	67.3	67.1	70.8	74.6	70.9	66.1	62.6	81.1	69.9
mevinphos	52.3	80.4	83.4	72.0	96.8	97.1	64.9	86.3	70.4	104.3	83.5	86.1	78.9	77.5	96.8	84.4	112.5	83.5	65.3	87.1
omethoate	43.0	57.8	48.1	49.6	84.8	52.2	61.8	66.2	111.6	111.6	55.1	92.8	75.3	65.4	56.1	65.6	71.6	69.9	57.1	66.2
monocrotophos	68.4	67.6	37.7	57.9	50.3	58.8	82.8	64.0	85.3	76.2	61.2	74.2	93.2	80.0	57.0	76.7	40.5	50.3	63.2	51.4
dimethoate	77.6	89.1	78.7	81.8	91.9	94.3	84.6	90.3	90.9	86.2	78.2	85.1	83.4	80.5	73.1	79.0	98.0	90.2	85.1	91.1
diazinon	87.5	90.0	94.1	90.5	97.5	96.9	86.2	93.6	95.6	98.5	92.4	95.5	91.8	102.5	92.5	95.6	98.8	98.8	100.1	99.2
parathion-methyl	94.5	97.2	96.1	95.9	96.8	96.8	87.3	93.6	97.3	98.4	95.4	97.0	98.4	103.1	93.6	98.3	101.5	98.9	101.8	100.7
fenitrothion	74.7	81.5	80.6	78.9	91.9	93.6	83.4	89.7	86.4	89.1	88.4	88.0	90.7	95.0	85.6	90.4	104.3	99.0	99.7	101.0
pirimiphos-methyl	79.7	89.5	87.4	85.5	89.7	89.5	81.5	86.9	101.4	101.2	97.6	100.1	98.6	103.1	94.6	98.8	107.1	101.6	103.2	104.0
chlorpyrifos	94.7	96.5	96.2	95.8	98.1	97.2	84.4	93.2	89.4	94.0	89.6	91.0	89.1	97.1	87.8	91.3	102.0	98.4	101.5	100.7
malathion	85.1	90.0	91.3	88.8	96.5	96.0	82.9	91.8	94.9	99.4	94.6	96.3	93.7	100.8	92.3	95.6	106.1	102.2	103.1	103.8
pirimiphos-ethyl	90.6	95.0	95.2	93.6	96.9	97.2	85.3	93.1	97.5	105.4	94.2	99.0	95.6	102.8	93.7	97.4	103.4	100.8	103.3	102.5
parathion-ethyl	63.9	75.9	74.4	71.4	90.2	89.8	81.1	87.0	83.6	83.9	85.5	84.3	87.7	83.7	79.5	83.6	98.0	94.7	93.2	95.3
prothiofos	95.4	98.3	230.9	141.5	95.4	95.1	83.9	91.5	83.0	86.5	86.8	85.5	82.5	91.5	83.6	85.9	96.5	95.0	99.6	97.0
profenofos	61.5	75.0	70.2	68.9	91.1	90.4	81.9	87.8	98.4	92.6	89.5	93.5	86.6	90.6	82.6	86.6	103.9	95.0	100.8	99.9
ethion	90.0	94.7	95.0	93.2	96.9	96.6	84.8	92.8	97.6	101.8	97.7	99.0	99.8	106.8	96.0	100.8	103.2	100.7	102.9	102.3
triazophos	77.7	84.2	86.5	82.8	95.2	95.7	85.0	92.0	100.3	96.0	94.9	97.1	96.3	98.0	89.1	94.5	102.5	97.8	101.2	100.5
EPN	73.8	80.0	81.6	78.5	94.1	94.5	84.2	90.9	82.9	84.6	85.5	84.4	84.4	93.6	80.8	86.3	102.9	99.8	103.0	101.9
phosalone	64.7	75.1	79.0	72.9	88.5	91.2	82.1	87.2	81.1	80.5	83.8	81.8	85.0	86.9	80.0	83.9	99.5	96.8	98.8	98.4
azinphos-ethyl	64.3	73.8	77.7	71.9	91.2	92.9	83.3	89.1	77.8	80.1	83.1	80.3	84.8	86.3	79.5	83.6	98.5	96.0	98.0	97.5
average	76.2	83.2	87.6	82.3	89.4	88.5	80.5	86.1	91.3	92.8	84.2	89.4	88.4	90.5	82.8	87.2	94.5	90.5	92.0	92.3

ตารางที่ 2 %recovery ของ organophosphorus 21 ชนิด 5 วิธีสกัดที่ปั่นตัวอย่างด้วยน้ำแข็งแห้ง 3ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 µg/ml

Pesticide	St-DI				Sp-DI				Q1-DI				Q2-DI				Q3-DI			
	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave	0.05	0.1	0.5	ave
methamidophos	88.4	96.5	82.0	88.9			73.3	73.3	47.7	66.3	42.8	52.2	42.4	31.3	57.3	43.6	62.5	59.4	34.9	52.3
ddvp	55.6	49.0	48.1	50.9					65.8	63.4	56.6	62.0	38.4	79.0	51.3	56.2		30.5	57.6	44.0
mevinphos	84.0	92.7	89.5	88.7	96.1	100.7	84.6	93.8	68.0	109.2	76.4	84.5	101.0	90.0	77.9	89.6	80.0	93.3	68.9	80.7
omethoate	86.3	96.6	88.2	90.3			77.5	77.5	169.3	106.5	110.2	128.7	166.8	149.1	67.6	127.8	165.4	157.3	76.0	132.9
monocrotophos	89.9	87.4	87.1	88.1		40.8	84.4	62.6	141.0	113.7	69.4	108.0	129.8	115.2	76.8	107.3	113.2	149.3	56.5	106.3
dimethoate	90.7	89.8	96.2	92.2	87.4	93.8	85.0	88.7	101.2	88.5	84.0	91.2	93.2	86.0	74.6	84.6	93.7	101.6	80.2	91.8
diazinon	86.8	79.4	81.2	82.5	57.7	94.8	77.9	76.8	35.6	55.5	105.7	65.6	114.1	99.4	98.2	103.9	133.9	130.5	107.1	123.8
parathion-methyl	84.3	81.2	83.8	83.1	82.7	86.0	83.6	84.1	93.4	99.4	92.6	95.1	73.8	82.8	85.5	80.7	100.9	101.8	94.1	99.0
fenitrothion	80.0	81.5	76.8	79.4	85.1	87.9	82.5	85.2	86.6	101.1	89.3	92.4	73.9	82.1	81.2	79.1	91.2	94.9	91.0	92.3
pirimiphos-methyl	78.3	80.0	80.9	79.7	90.9	79.0	80.0	83.3	99.3	109.4	95.4	101.4	85.7	82.5	88.3	85.5	95.8	98.9	92.5	95.7
chlorpyrifos	88.8	84.0	82.6	85.2	83.6	85.4	83.5	84.2	81.5	97.1	86.5	88.4	71.1	80.2	82.8	78.0	93.7	98.0	94.3	95.4
malathion	85.2	81.5	81.8	82.8	83.2	85.8	84.3	84.4	91.0	105.6	92.9	96.5	80.8	83.1	87.6	83.8	129.2	105.4	98.4	111.0
pirimiphos-ethyl	87.0	83.8	85.4	85.4	83.6	86.4	83.9	84.7	94.5	78.2	100.8	91.2	85.5	89.7	94.9	90.1	207.3	101.4	108.1	138.9
parathion-ethyl	78.5	81.2	80.8	80.2	74.7	86.2	84.2	81.7	83.6	87.7	88.7	86.6	82.2	80.4	75.8	79.4	100.2	83.8	80.0	88.0
prothiofos	85.4	89.5	86.3	87.0	79.4	85.1	83.6	82.7	80.9	88.7	81.8	83.8	81.9	83.1	79.1	81.3	96.0	95.9	93.9	95.2
profenofos	81.3	86.2	80.2	82.6	82.2	83.9	85.9	84.0	91.8	100.4	86.4	92.9	87.0	80.3	75.0	80.8	97.8	89.1	88.9	91.9
ethion	87.7	88.0	88.3	88.0	84.9	86.0	85.4	85.4	85.5	107.0	94.8	95.8	91.7	85.7	89.7	89.1	94.6	100.1	95.8	96.8
triazophos	82.7	82.1	80.9	81.9	83.7	86.4	84.9	85.0	97.8	106.0	89.7	97.8	80.4	85.1	81.9	82.5	92.1	100.0	92.2	94.8
EPN	89.1	82.6	83.6	85.1	88.1	85.4	84.9	86.1	94.4	98.6	81.2	91.4	73.9	71.2	76.7	73.9	99.2	100.9	94.1	98.1
phosalone	80.7	81.0	81.3	81.0	79.0	85.5	83.7	82.7	85.1	88.8	82.8	85.5	68.9	80.5	72.8	74.1	77.3	88.3	91.8	85.8
azinphos-ethyl	78.5	79.2	78.6	78.8	81.0	84.5	84.0	83.2	91.1	86.9	79.0	85.7	80.0	76.5	71.3	75.9	93.6	91.4	92.1	92.4
average	83.3	83.5	82.1	83.0	82.5	84.7	82.9	83.3	89.8	93.3	85.1	89.4	85.8	85.4	78.4	83.2	105.9	98.7	85.2	96.6

ตารางที่ 3. เปรียบเทียบ 10 วิธีสกัดด้วย % recovery ของ organophosphorus 21 ชนิด

pesticide	St	St-DI	Sp	Sp-DI	Q1	Q1-DI	Q2	Q2-DI	Q3	Q3-DI
methamidophos	90.8	88.9	57.3	73.3	99.2	52.2	82.7	43.6	68.5	52.3
ddvp	66.7	50.9	84.5		67.3	62.0	70.9	56.2	69.9	44.0
mevinphos	72.0	88.7	86.3	93.8	86.1	84.5	84.4	89.6	87.1	80.7
omethoate	49.6	90.3	66.2	77.5	92.8	128.7	65.6	127.8	66.2	132.9
monocrotophos	57.9	88.1	64.0	62.6	74.2	108.0	76.7	107.3	51.4	106.3
dimethoate	81.8	92.2	90.3	88.7	85.1	91.2	79.0	84.6	91.1	91.8
diazinon	90.5	82.5	93.6	76.8	95.5	65.6	95.6	103.9	99.2	123.8
parathion-methyl	95.9	83.1	93.6	84.1	97.0	95.1	98.3	80.7	100.7	99.0
fenitrothion	78.9	79.4	89.7	85.2	88.0	92.4	90.4	79.1	101.0	92.3
pirimiphos-methyl	85.5	79.7	86.9	83.3	100.1	101.4	98.8	85.5	104.0	95.7
chlorpyrifos	95.8	85.2	93.2	84.2	91.0	88.4	91.3	78.0	100.7	95.4
malathion	88.8	82.8	91.8	84.4	96.3	96.5	95.6	83.8	103.8	111.0
pirimiphos-ethyl	93.6	85.4	93.1	84.7	99.0	91.2	97.4	90.1	102.5	138.9
parathion-ethyl	71.4	80.2	87.0	81.7	84.3	86.6	83.6	79.4	95.3	88.0
prothiofos	141.5	87.0	91.5	82.7	85.5	83.8	85.9	81.3	97.0	95.2
profenofos	68.9	82.6	87.8	84.0	93.5	92.9	86.6	80.8	99.9	91.9
ethion	93.2	88.0	92.8	85.4	99.0	95.8	100.8	89.1	102.3	96.8
triazophos	82.8	81.9	92.0	85.0	97.1	97.8	94.5	82.5	100.5	94.8
EPN	78.5	85.1	90.9	86.1	84.4	91.4	86.3	73.9	101.9	98.1
phosalone	72.9	81.0	87.2	82.7	81.8	85.5	83.9	74.1	98.4	85.8
azinphos-ethyl	71.9	78.8	89.1	83.2	80.3	85.7	83.6	75.9	97.5	92.4
average	82.3	83.0	86.1	82.5	89.4	89.4	87.2	83.2	92.3	95.6

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำ ในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า

Application of *Acorus calamus* Linn. Extract for Controlling Kale Pests

อิสริยะ สืบพันธุ์ดี รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา พรรณีกา อัตตนนท์ ธิติยาภรณ์ ประยูรมหิศร

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า ระหว่างเดือน มกราคม – มิถุนายน 2554 ณ แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ 7 กรรมวิธี พบว่าสารสกัดว่านน้ำ, สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ และสารสกัดน้ำมันว่านน้ำมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักใกล้เคียงกับรากหางไหลสดแช่น้ำ แต่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักน้อยกว่าสารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์) ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารไซเปอร์เมทริน 35% W/V EC

และเมื่อดูผลผลิตพบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตมากกว่าแปลงเปรียบเทียบ คือให้ผลผลิตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 36.27–51.33 กิโลกรัมต่อ 10 ตารางเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแปลงเปรียบเทียบ ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 32.67 กิโลกรัมต่อ 10 ตารางเมตร

คำนำ

จากรายงานการตรวจวิเคราะห์พืชผักและผลไม้ส่งออกของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ช่วง มกราคม – ธันวาคม 2551 พบว่า สารไซเปอร์เมทริน เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่ตกค้างมาก และพบในปริมาณที่เกินค่า MRLs ในพืชผักผลไม้ที่ส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น สิงคโปร์ และสหภาพยุโรป นอกจากนี้ สารไซเปอร์เมทริน เป็นสารที่ไม่ได้รับการแนะนำจากกรมวิชาการเกษตรให้ใช้ในพืชผักเช่น ในคะน้าและพริก แต่ก็ยังมีการนำไปใช้ ทำให้เกิดปัญหาการส่งออกบ่อยครั้ง

สารไซเปอร์เมทริน เป็นสารป้องกันกำจัดแมลง กลุ่ม pyrethroid ที่มีความเป็นพิษในระดับพิษปานกลาง (Moderately Hazardous, class II) เป็นสารป้องกันกำจัดแมลงที่เกษตรกรนิยมใช้มาก ในปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณนำเข้าสูงถึง 932.2 ตัน คิดเป็นสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ (active ingredient, a.i.) 856.35 ตัน มีมูลค่า 281.38 ล้านบาท จากฉลากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยกรมวิชาการเกษตร สารไซเปอร์เมทริน ผลิตเป็นสูตร EC (Emulsifiable

concentrate) ความเข้มข้น 10%, 25% และ 35% ใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่นหนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนผีเสื้อ หนอนกอ มอด และเพลี้ยจักจั่นมะม่วง มีวิธีการใช้โดยการฉีดพ่น ดังนั้นโอกาสที่สารพิษจะฟุ้งกระจายในอากาศขณะฉีดพ่น ปนเปื้อนบนผลผลิตและเกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อม เมื่อตกลงบนดินหรือในแหล่งน้ำย่อมเกิดขึ้นได้สูง

คะน้าเป็นพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งและพบว่ามีปริมาณสารไซเปอร์เมทรินตกค้างในปริมาณที่เกินค่า MRLs กำหนดคือ 1.00 mg/kg แมลงศัตรูที่ทำลายผลผลิตคะน้ามากที่สุดได้แก่ หนอนใยผักและด้วงหมัดผัก ดังนั้นเกษตรกรจึงใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากในระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตทำให้ผลผลิตที่ได้มีโอกาสที่จะมีปริมาณสารพิษตกค้างในผลผลิตได้สูง ประกอบกับการใช้สารเคมีในการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่ไม่ถูกต้อง ทำให้แมลงเกิดการดื้อต่อสารเคมีดังกล่าว ศัตรูธรรมชาติถูกทำลาย เกิดการระบาดของแมลงศัตรูชนิดใหม่ เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม และเกิดการเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์ จากข้อเสียดังกล่าวในการใช้สารเคมี การลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่รวมถึงการเพิ่มการใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมคือ การใช้สารสกัดจากพืชเพื่อทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพ ปลอดภัยต่อการบริโภคและสิ่งแวดล้อมและเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรใช้เป็นทางเลือกที่ดีและปลอดภัย

ว่านน้ำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในเขตอบอุ่นของทวีปเอเชีย เป็นพืชที่ขึ้นอยู่กับโคลนเลน หรือริมบ่อ หนอง บึง มีชื่ออื่นๆ ได้แก่ คาเจียงจี้ ทิสีปุตอ ผมผา ส้มชื่น ฮางคาวน้ำ ฮางคาวบ้าน ฮางคาวผา Calamus flargoot, Myrtle grass, Sweet flag, Sweet sedge ว่านน้ำเป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน สูง 1–2 เมตร จะมีลักษณะเหง้าอยู่ใต้ดิน เป็นรูปทรงกระบอกที่ค่อนข้างแบน ภายนอกจะมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหอม ใบรูปยาวเรียงคล้ายใบดาบฝรั่ง จะเรียงสลับซ้ายขวาทะแยงกัน มีการนำว่านน้ำมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตั้งแต่ต้น ค.ศ. 1600 ในประเทศแถบทวีปยุโรป นำมาใช้เป็นสารไล่แมลง ซึ่งมีการใช้มาก่อนที่จะใช้หางไหล (Thacker, 2009) มงคล แก้วเทพ (2547) ได้รายงานวิจัยที่ระบุถึงฤทธิ์ในการกำจัดแมลงของว่านน้ำว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง สารสกัดเมทธานอลของว่านน้ำทำให้ด้วง*ข้าว Sitophilus oryzae* (L.) และด้วงถั่วเหลือง *Callosobruchus chinensis* ที่โตเต็มวัยตายมากกว่า 90% หลังจากการสัมผัสสารสกัดโดยตรง 3 – 4 วัน น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำพบสาร β-asarone (2,4,5-trimethoxypropenylbenzenes), acorangermacrone และ asarylaldehyde ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด *คือ Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbita* และ *D. dorsalis* เมื่อนำว่านน้ำ สะเดา และโล่ติ๊นมาผสมในอัตราส่วน 1:1:1 พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของตัวอ่อนผีเสื้อกลางคืน *Earias vittella* (Fab) นอกจากนี้ว่านน้ำยังสามารถใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในโรงเก็บได้ (Kim *et al*., 2003) เมื่อนำข้าวสาลีไปคลุกกับน้ำมันว่านน้ำที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ppm

สามารถป้องกันมอดแป้ง *Tribolium castaneum* ได้ และเมื่อมอดแป้งถูกสารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 ppm พบว่าทำให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนและตัวโตเต็มวัยลดลง และสาร asarones ซึ่งสกัดแยกมาจากน้ำมันหอมระเหยจากรากว่านน้ำมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการกินอาหารของผีเสื้อกลางคืนชนิด *Peridrama saucia* (Nawamaki and Kuroyanagi, 1996) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากว่านน้ำในการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดหอม

งานวิจัยนี้จึงใช้คุณสมบัติของสารสกัดจากพืชดังกล่าวมาใช้ ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูของคะน้า เพื่อลดการใช้สารไซเปอร์เมทรินซึ่งเป็นปัญหาสารพิษตกค้างในคะน้า และป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาในการส่งออกคะน้า จึงจำเป็นต้องศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำต่อศัตรูพืชแต่ละชนิดและเวลาในการใช้และอัตราที่เหมาะสมในการใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติมักเป็นสารที่มีความจำเพาะ (selective) ต่อศัตรูพืชต่างชนิดกัน

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า วางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. แปลงเปรียบเทียบ

กรรมวิธีที่ 2. สารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์) อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3. สารสกัดว่านน้ำ อัตรา 150 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4. สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5. น้ำมันว่านน้ำ 25% V/V อัตรา 25 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6. รากหางไหลสดแช่น้ำ อัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7. สารไซเปอร์เมทริน 35% W/V EC อัตรา 17 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

วิธีดำเนินการ

1. เตรียมแปลงทดลองย่อยขนาด 10 ตารางเมตร จำนวน 21 แปลง ระยะระหว่างแปลงทดลองย่อย 1.5 เมตร ระยะระหว่างแต่ละกรรมวิธี 1.5 เมตร

2. หว่านเมล็ดคะน้าให้กระจายสม่ำเสมอทั่วทั้งแปลง ต้นกล้าจะขึ้นภายใน 7 วัน ทำการถอนต้นกล้าที่แน่นหรืออ่อนแอทิ้ง เพื่อป้องกันโรคและแมลง ดูแลเรื่องน้ำและปุ๋ย

3. ตรวจหาเปอร์เซ็นต์สาระสำคัญของสารธรรมชาติที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์), สารสกัดว่านน้ำ, สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ, น้ำมันว่านน้ำ 25% V/V และรากหางไหลสดแช่น้ำก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลอง

4. เริ่มฉีดพ่นสารทดลองเมื่อคะน้าอายุได้ 30 วัน โดยพ่นสารทดลองทุก 5 วัน พ่นสารทั้งหมด 5 ครั้ง สารทดลองที่ใช้ฉีดพ่นทุกกรรมวิธีผสมสารจับใบตราเบสมอร์ อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

5. สุ่มตรวจนับจำนวนด้วงหมัดผักจำนวน 10 ต้นต่อแปลงย่อย โดยนับครั้งแรกก่อนฉีดพ่นสารทดลอง และหลังการฉีดพ่นสารทดลองจำนวน 5 ครั้ง

6. สุ่มเก็บผลผลิตคะน้าหลังฉีดพ่นสารทดลองครั้งสุดท้าย

7. นำข้อมูลของแมลงและผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีต่างๆ โดยวิธี Analysis of Variance และ Analysis of Covariance

8. สรุปผลการทดลองและเขียนรายงาน

อุปกรณ์

1. แปลงทดลองย่อยขนาด 10 ตารางเมตร จำนวน 21 แปลง

2. เมล็ดพันธุ์คะน้า

3. สารทดลองได้แก่ สารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์), สารสกัดว่านน้ำ, สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ, สารสกัดน้ำมันว่านน้ำ, รากหางไหลสดแช่น้ำ และสารไซเปอร์เมทริน 35% W/V EC

4. ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 และปุ๋ยคอก

5. เครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง

6. กรวยพลาสติกขนาดใหญ่

7. ถังพลาสติกสำหรับผสมสารทดลอง

8. ป้ายแปลงทดลอง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตรวจหาเปอร์เซ็นต์สารสำคัญของสารธรรมชาติที่ใช้ในการทดลองก่อนที่จะนำไปฉีดพ่น พบว่าสารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์) พบ Total alkaloid 2.5% W/V, สารสกัดว่านน้ำ พบ β-arsarone 7.38% W/V, สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ พบ β-arsarone 28.99% W/V, สารสกัดน้ำมันว่านน้ำ 25% V/V พบ β-arsarone 18.32% W/V และรากหางไหลสดแช่น้ำ พบ Rotenone 0.03% W/V

จากการสุ่มนับจำนวนด้วงหมัดผักที่เข้าทำลายคะน้าก่อนพ่นสารทดลอง พบว่าก่อนพ่นสารทดลองทุกกรรมวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแปลงเปรียบเทียบ โดยพบด้วงหมัดผักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.00–6.33 ตัวต่อแปลง

หลังการฉีดพ่นสารทดลองครั้งที่ 1 พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแปลงเปรียบเทียบ โดยพบด้วงหมัดผักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.33–10.67 ตัวต่อแปลง

หลังการฉีดพ่นสารทดลองครั้งที่ 2 พบว่ากรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 7 พบด้วงหมัดผักน้อยที่สุด โดยพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 3.75 และ 3.81 ตัวต่อแปลง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 3, 4, 5, 6 และแปลงเปรียบเทียบ ซึ่งพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 8.96–11.54 ตัวต่อแปลง

หลังการฉีดพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 พบว่ากรรมวิธีที่ 7 และกรรมวิธีที่ 2 พบด้วงหมัดผักน้อยที่สุด โดยพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 5.67 และ 6.33 ตัวต่อแปลง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 5 และแปลงเปรียบเทียบ ซึ่งพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 14.33 และ 12.67 ตัวต่อแปลง ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 3, 4 และกรรมวิธีที่ 6 ซึ่งพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 8.33, 9.33 และ 8.33 ตัวต่อแปลง ตามลำดับ

หลังการฉีดพ่นสารทดลองครั้งที่ 4 พบว่ากรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 3 พบด้วงหมัดผักน้อยที่สุด โดยพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 7.33 และ 8.33 ตัวต่อแปลง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับแปลงเปรียบเทียบ ซึ่งพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 15.67 ตัวต่อแปลง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 4, 5, 6 และกรรมวิธีที่ 7 ซึ่งพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 11.00, 11.33 , 11.67 และ 10.67 ตัวต่อแปลง ตามลำดับ

หลังการฉีดพ่นสารทดลองครั้งที่ 5 พบว่าทุกกรรมวิธีพบด้วงหมัดผักน้อยกว่าแปลงเปรียบเทียบ โดยพบด้วงหมัดผักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.33 – 7.67 ตัวต่อแปลง ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับแปลงเปรียบเทียบ ซึ่งพบด้วงหมัดผักเฉลี่ย 13.00 ตัวต่อแปลง (ตารางที่ 1)

จากการเก็บผลผลิตคะน้า มาหาน้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพดี พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตมากกว่าแปลงเปรียบเทียบ กรรมวิธีที่ 7 ให้ผลผลิตสูงสุด 51.33 กิโลกรัมต่อ 10 ตารางเมตร รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 3 ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากัน 46.67 กิโลกรัมต่อ 10 ตารางเมตร รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 6, 4 และกรรมวิธีที่ 5 ให้ผลผลิต 45.33, 43.87 และ 36.27 กิโลกรัมต่อ 10 ตารางเมตร ส่วนแปลงเปรียบเทียบให้ผลผลิตน้อยที่สุด 32.67 กิโลกรัมต่อ 10 ตารางเมตร (ตารางที่ 2)

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า พบว่า สารสกัดว่านน้ำ, สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ และสารสกัดน้ำมันว่านน้ำมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักใกล้เคียงกับรากหางไหลสดแช่น้ำ แต่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักน้อยกว่าสารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์) ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารไซเปอร์เมทริน 35% W/V EC เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของผลผลิตคะน้าที่มีคุณภาพดีพบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตมากกว่าแปลงเปรียบเทียบ กรรมวิธีที่ 7 ให้ผลผลิตสูงสุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 3 ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากัน รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 6, 4 และกรรมวิธีที่ 5 ส่วนแปลงเปรียบเทียบให้ผลผลิตน้อยที่สุด (ตารางที่ 2) น้ำหนักของผลผลิตคะน้าที่สุ่มเก็บน้อยกว่าที่ควรเป็น เนื่องจากก่อนการเก็บเกี่ยวมีการระบาดของโรคใบแดงเกิดขึ้น ทำให้ใบของคะน้าแห้งกรอบและน้ำหนักหายไป

อย่างไรก็ตาม การทดลองการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้น และจะได้ใช้เป็นแนวทางในการลดความเสี่ยงภัยจากสารพิษตกค้างในผลิตผลการเกษตร ลดการใช้สารเคมี และเพื่อความปลอดภัยทั้งต่อตัวเกษตรกรผู้ฉีดพ่นสาร ผู้บริโภค รวมทั้งสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการแนะนำการใช้ผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า

2. เพื่อลดปริมาณการใช้สารไซเปอร์เมทริน 35% W/V EC ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงภัยของเกษตรกรผู้ฉีดพ่นสาร และลดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตคะน้า รวมทั้งสิ่งแวดล้อม และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคด้วย

เอกสารอ้างอิง

มงคล แก้วเทพ. 2547. ว่านน้ำสมุนไพรฆ่าแมลง จุลสารข้อมูลสมุนไพร ปีที่ 21 ฉบับที่ 4 หน้า 8-11.

Kim,S.; Park, C. and Ohh, M. 2003a. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasiderma serricorne Journal of Stored Products Research* 39 :11-19.

Kim,S.; Roh, J.; Kim, D. Lee, H. and Ahn, Y. 2003b. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Stiophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis Journal of Stored Products Research* 39:293-303.

Nawamaki, K. and Kuroyanagi, M. 1996. Sesquiterpenods from *Acorus calamus* as Ggermination Inhibitors *Phytochemistry* 43(6) :1175-1182

Thacker, J.R.M., 2009. “An Introduction to Arthropod Pest Control” Dept. of Biological Science, University of Paisley, UK, available on http://assets.cambridge.org/97805215/61068/sample/978052156068

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. จำนวนด้วงหมัดผักที่พบในการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า ณ แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ปี 2554

กรรมวิธี	อัตราการใช้/น้ำ 20 ลิตร	ค่าเฉลี่ยจำนวนด้วงหมัดผัก/10 ต้น			นับหลังพ่นสาร/ครั้งที่		
		ก่อนพ่น	1	2	3	4	5
T1	น้ำ 20 ลิตร	4.33	10.67	11.54 b	12.67 bc	15.67 b	13.00 b
T2	100 มิลลิลิตร	3.00	8.00	3.75 a	6.33 a	7.33 a	5.67 a
T3	150 มิลลิลิตร	4.67	5.33	9.30 b	8.33 ab	8.33 a	6.67 a
T4	100 มิลลิลิตร	5.00	5.33	8.96 b	9.33 abc	11.00 ab	7.33 a
T5	25 มิลลิลิตร	6.33	5.67	9.10 b	14.33 c	11.33 ab	5.67 a
T6	1 กิโลกรัม	4.00	6.67	9.86 b	8.33 ab	11.67 ab	5.33 a
T7	17 มิลลิลิตร	4.00	7.33	3.81 a	5.67 a	10.67 ab	7.67 a
CV(%)	-	68.40	44.80	24.8	31.2	29.00	19.2
RE (%)	-	-	-	159.80	-	-	-

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แสดงไว้หลังตัวเลขต่างกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติ $P \leq 0.5$ (คำนวณโดยวิธี Duncan' s new multiple range test)

ตารางที่ 2. ผลผลิตคะน้าในการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากว่านน้ำในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า ณ แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ปี 2554

กรรมวิธี	อัตราการใช้/ น้ำ 20 ลิตร	ผลผลิตคะน้า กิโลกรัม/10 ตารางเมตร
T1	น้ำ 20 ลิตร	32.67 a
T2	100 มิลลิลิตร	46.67 a
T3	150 มิลลิลิตร	46.67 a
T4	100 มิลลิลิตร	43.87 a
T5	25 มิลลิลิตร	36.27 a
T6	1 กิโลกรัม	45.33 a
T7	17 มิลลิลิตร	51.33 a
CV(%)	-	29.3
RE (%)	-	-

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แสดงไว้หลังตัวเลขต่างกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติ $P \leq 0.5$ (คำนวณโดยวิธี Duncan' s new multiple range test)

T1 = แปลงเปรียบเทียบ

T2 = สารสกัดหนอนตายหยาก (อุตรดิตถ์) อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

T3 = สารสกัดว่านน้ำ อัตรา 150 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

T4 = สารสกัดว่านน้ำ + น้ำมันว่านน้ำ อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

T5 = น้ำมันว่านน้ำ 25 % V/V อัตรา 25 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

T6 = รากหางไหลสดแช่น้ำ อัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T7 = สารไซเปอร์เมทริน 35% W/V EC อัตรา 17 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม Pyrethroids ในน้ำ โดยใช้ Gas Liquid Chromatograph

Interlaboratory Comparison: Determination of Pyrethroids Pesticides in Water by Gas Liquid Chromatograph

มลิสา เวชยานนท์ สิริพร เหลืองสุชนกุล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ศึกษาการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อใช้ทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ รายการทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ในน้ำ โดยทดลองเตรียมและทดสอบ รวมทั้งวิเคราะห์ตัวอย่างตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 ได้แก่ ความเป็นเนื้อเดียวกัน และความคงทนของตัวอย่าง สารพิษที่ทำการทดสอบเป็นกลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lambda cyhalothrin และ permethrin ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.30-5.0 ไมโครกรัมต่อลิตร การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ ANOVA แบบ single factor ค่า $C_{critical}$ ของการทดสอบท่ากับ 3.02 ค่า C_{value} มีค่าระหว่าง 0.23-1.02 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด $C_{value} < C_{critical}$ นั่นคือตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนการทดสอบความคงทนของตัวอย่างสามารถใส่ในขวดพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 5 องศาเซลเซียส ได้นานไม่เกิน 1 วัน ยกเว้น bifenthrin ที่สามารถเก็บได้นานถึง 45 วัน การทดสอบเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 ± 3 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 3-10 วัน ยกเว้น bifenthrin และ fenvalerate ที่สามารถเก็บได้นาน 45 วัน และเก็บใน Freezer อุณหภูมิ –20 ± 5 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน ยกเว้นสารพิษชนิด lambda cyhalothrin และ cyfluthrin ที่เก็บได้เพียง 14 วัน สำหรับการเตรียมและจัดส่งตัวอย่างให้กับห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ ส.วพ. 1- 8 และห้องปฏิบัติการภาคเอกชนที่มีมาตรฐานด้านการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างร่วมกับเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรรวมทั้งหมด 20 ห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบส่วนใหญ่มีค่าที่แตกต่างกันเป็นอย่างมาก มีเพียง 1 ห้องปฏิบัติการที่รายงานผลการทดสอบครบและให้ผลเป็นที่น่าพอใจ Z-score ระหว่าง 0.2-1.9 มี 4 ห้องปฏิบัติการที่ให้ผลเป็นที่น่าสงสัย Z-score ระหว่าง 2.2-2.9 และ มี 8 ห้องปฏิบัติการให้ผลการทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ Z-score อยู่ระหว่าง 3.3-6.2 ยกเว้นผลการทดสอบของเจ้าห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจะมีผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกับค่าอ้างอิง ทั้งนี้ในการจัดเตรียมตัวอย่างน้ำสำหรับใช้ทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษในครั้งนี้ เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ข้อมูลยังไม่ครบถ้วน จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของภาชนะที่ใช้บรรจุและสภาพแวดล้อมที่มีผลกับสารพิษในระหว่างการจัดส่งตัวอย่างถึงห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบต่อไป จึงจะสามารถเป็นหน่วยจัดเตรียมตัวอย่างในรายการทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ในน้ำได้

รหัส 03-06-54-06-02-00-01-54

คำนำ

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ หรือโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) เป็นข้อกำหนด ข้อ 5.9 b ในเรื่องการประกันคุณภาพผลการทดสอบและสอบเทียบ ของข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ (ISO/IEC 17025 : 2005) ซึ่งห้องปฏิบัติการที่ต้องการขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 จะต้องเข้าร่วมการทดสอบนี้ เพื่อเป็นการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ ชี้ให้เห็นปัญหาและการแก้ไขหากผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง และเพิ่มความมั่นใจในการวิเคราะห์ (กนกพร, 2548) โปรแกรมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) จะเป็นการทดสอบตัวอย่างที่เตรียมจากองค์กรที่ได้รับการรับรองมาตรฐานในระดับสากล ได้แก่ Food Analysis Performance Scheme (FAPAS), Australian Government Analytical Laboratories-National Analytical Reference Laboratory (AGAL-NARL) (ประภาศรี และครรชิต, 2548), National Association of Testing Authority (NATA) และ National Measurement Institute (NMI) (กนกพร, 2548) ซึ่งจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมากในการนำตัวอย่างมาทดสอบ และตัวอย่างที่เตรียมจากองค์กรเหล่านี้จะไม่ครอบคลุมทุกรายการทดสอบ จะมีให้เฉพาะบางรายการเท่านั้น (กนกพร, 2548)

ในรายการทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ในน้ำ เป็นโปรแกรมการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษจัดทำขึ้นเพื่อใช้ทดสอบเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตรได้แก่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1–8 ที่ได้เข้าร่วมการฝึกอบรมวิธีการสกัดสารพิษในน้ำแล้ว โดยมีห้องปฏิบัติการของภาคเอกชนที่มีมาตรฐานด้านการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างเข้าร่วมด้วย โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้สำหรับการทดสอบเอง จึงเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและเกิดประโยชน์ต่อหน่วยงานต่างๆ ซึ่งจะเป็นการทดสอบถึงประสิทธิภาพและความสามารถของห้องปฏิบัติการ รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลในการประกันผลการทดสอบเพื่อสนับสนุนการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ ตลอดจนเป็นการเพิ่มพูนความรู้ ประสบการณ์ ในการพัฒนาตัวเอง หน่วยงาน และคุณภาพของห้องปฏิบัติการ ในอนาคตประเทศไทยจะสามารถพึ่งพาตัวเองได้ในระดับหนึ่งและเป็นแนวทางการพัฒนาประเทศได้อย่างยั่งยืน (กนกพร, 2548)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว

1.1 เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel, beaker, cylinder, Erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for auto sampler, disposable pasture pipette และ glass funnel, ขวดแก้วปริมาตรใสและขวดพลาสติกชนิด polypropylene

2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ

2.1 สารเคมีชนิด analytical grade สำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่าง ได้แก่ hexane, anhydrous sodium sulfate

2.2 สารเคมีชนิด pesticide grade สำหรับใช้ในการเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน และปรับปริมาตรตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ได้แก่ acetone, hexane และ iso-octane สารพิษมาตรฐานกลุ่มไพรีทรอยด์ pesticide grade ความบริสุทธิ์สูง ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lambda cyhalothrin และ permethrin

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องชั่งละเอียด 5 ตำแหน่ง เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด separatory funnel shaker เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator ตู้อบสารเคมี เครื่องทำสุญญากาศ เครื่องลดปริมาตรชนิด nitrogen evaporator ตู้ดูดความชื้น เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เครื่องปั่นผสมตัวอย่าง (Homogeneizer) ตู้เย็นอุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียส ตู้แช่ (Freezer) อุณหภูมิ–20± 5 องศาเซลเซียส และเครื่อง Gas Chromatograph ของบริษัท Agilent Technology รุ่น HP 6890 พร้อมหัวตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD)

4. วัสดุที่ใช้ ได้แก่ น้ำจากแหล่งต้นน้ำ (น้ำจากเขื่อนศรีนครินทร์ จ. กาญจนบุรี)

5. อุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ ถังสแตนเลส

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน เตรียม stock standard solution ของสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด ให้มีความเข้มข้น ประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเตรียม Intermediate standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นประมาณ 0.04-5.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการสกัดตัวอย่าง ตวงน้ำ 200 มิลลิลิตร ลงใน separatory funnel เติม hexane (AR) 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดย ใช้ separatory funnel shaker นาน 3 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรองสารสกัดชั้นบนผ่าน anh. $Na_2 SO_4$ ลงใน round bottom flask ทำการสกัดซ้ำอีกด้วย hexane (AR) 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เมื่อกรองเสร็จแล้ว rinse separatory funnel ด้วย hexane (AR) ประมาณ 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง rinse round bottom flask ด้วย hexane (PR) เก็บไว้ใน graduated tube ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GLC ชนิด Electron Capture Detector

3. การเตรียม fortified sample และ sample blank

เตรียม fortified sample ใช้ cylinder ตวงน้ำปริมาตรแน่นอน 10 ลิตร ใส่ในถังสแตนเลสขนาด 25 ลิตร ใช้ pipette ดูดสารละลายของสารมาตรฐานผสม ความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ต้องการทดสอบ เติมลงในตัวอย่างน้ำ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ homogenizer นานประมาณ 10 นาที เติมน้ำปริมาตรที่แน่นอนอีก 10 ลิตร และผสมต่ออีกประมาณ 45 นาที ส่วนการเตรียม sample blank จะเหมือนกับการเตรียม fortified sample แต่จะไม่เติมสารละลายของสารมาตรฐานลงในตัวอย่างดสอบ

4. การทดสอบ

4.1 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ของตัวอย่าง นำ fortified sample ที่เตรียมในข้อ 3 แบ่งใส่ในขวดแก้วปริมาตรตัวอย่างละ 400 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด และนำไปทดสอบตามวิธีการสกัดข้างต้น โดยในแต่ละขวดทดสอบ 2 ซ้ำๆ ละ 200 มิลลิลิตร ผลการทดสอบที่ได้นำไปคำนวณความเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้การวิเคราะห์ตามหลักสถิติดังนี้

แบบที่ 1 One Way ANOVA (ANOVA : Single Factor)

$$F_{value} = \frac{MSB}{MSW} < F_{critical} \text{ (F distribution, ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 \%)}$$

เมื่อ MSB : mean square between , MSW : mean square within

ค่า $F_{value} < F_{critical}$ แสดงว่า ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

แบบที่ 2 ทดสอบด้วย สมการ Horwitz equation

โดย Horwitz predicted RSD (RSDp) = $2^{1 - 0.5 \log C}$

$$\frac{RSDp}{mean} \times \frac{100,Ss}{Sdp} < 0.3$$ ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

เมื่อ C: fractional concentration, SDp: standard deviation หน่วยเป็น μg/L

Ss: sampling variance, mean: ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของผลการทดสอบ หน่วยเป็น μg/L

4.2. การทดสอบความคงทน (stability) ของตัวอย่าง

ตัวอย่าง fortified sample ที่เตรียมในข้อ 3 นำมาตวงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดพลาสติกจำนวน 48 ขวด และใส่ขวดพลาสติกสีขาวขุ่นจำนวน 27 ขวด และนำไปทดสอบทดสอบความคงทนของตัวอย่าง โดยเก็บที่สภาวะต่างๆ ดังนี้

4.2.1 ที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 5 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างน้ำที่ใส่ขวดพลาสติก จำนวน 24 ขวด เก็บในห้องอุณหภูมิ 25±5 องศาเซลเซียสและนำไปทดสอบตามวิธีการสกัดข้างต้น เมื่อครบกำหนดที่ 1, 3, 5, 7, 14, 21, 30 และ 45 วัน นำไปทดสอบตามวิธีการสกัดข้างต้น เมื่อครบกำหนดที่

4.2.2 ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 5 ± 3 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างน้ำที่ใส่ขวดพลาสติก จำนวน 24 ขวด เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียสและนำไปทดสอบตามวิธีการสกัดข้างต้น เมื่อครบกำหนดที่ 1, 3, 5, 7, 14, 21, 30 และ 45 วัน นับจากวันที่เตรียมวันละ 3 ขวด

4.2.3 ที่ Freezer อุณหภูมิ–20±5 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างน้ำที่ใส่ขวดพลาสติก 27 ขวด เก็บไว้ใน freezer ที่อุณหภูมิ –20±5 องศาเซลเซียสและนำไปทดสอบตามวิธีการสกัดข้างต้น เมื่อครบกำหนดที่ 1, 5, 14, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นับจากวันที่เตรียมวันละ 3 ขวด

4.3 การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

4.3.1 เชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบ โดยการส่งหนังสือเชิญห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่สนใจเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบประกอบด้วย ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 (สวพ. 1-8) รวมทั้งศูนย์วิจัยย่อย และห้องปฏิบัติการของภาคเอกชนได้แก่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาต่างๆ ซึ่งได้รับการตอบรับการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบ 15 ห้องปฏิบัติการ รวมทั้งให้เจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรที่ปฏิบัติงานทดสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบ 5 ท่าน รวมห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบในครั้งนี้เป็น 20 ห้องปฏิบัติการ

4.3.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบ เตรียมตัวอย่าง spiked sample สำหรับใช้ทดสอบ 2 ชุด คือ spiked sample S1 และ S2 ในแต่ละชุดเตรียมชุดละ 20 ลิตร ส่วนการเตรียม sample blank จะไม่เติมสารละลายของสารมาตรฐานในตัวอย่าง ตัวอย่างแต่ละชุดที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว ตวงใส่ขวดพลาสติกขาวขุ่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท จะได้ตัวอย่างทั้งหมดชุดละ 40 ขวด ติดป้ายแสดงรายละเอียดข้างขวด สุ่มตัวอย่างจำนวน 7 ขวด เพื่อนำไปทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน) และในระหว่างรอการจัดส่ง จะเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้วัสดุกันกระแทกห่อหุ้มเพื่อป้องกันไม่ให้ภาชนะบรรจุตัวอย่างแตกเสียหายจากนั้นบรรจุใส่กล่องพัสดุไปรษณีย์ นำส่งให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษ (EMS) ซึ่งแต่ละห้องปฏิบัติการจะได้ตัวอย่าง 1 ชุด ประกอบด้วย sample No. 1, sample No.2 และ sample blank อย่างละ 1 ขวด

4.3.3 วิธีทดสอบ ไม่ได้กำหนดวิธีที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งนี้ห้องปฏิบัติที่เข้าร่วมการทดสอบสามารถใช้วิธีการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่ใช้ปฏิบัติการเองเป็นวิธีการสำหรับทำการทดสอบ

4.3.4 กำหนดช่วงเวลาของโปรแกรมการทดสอบดังนี้ ส่งหนังสือตอบรับเชิญเข้าร่วมการทดสอบ 2 พฤษภาคม 2554 ส่งตัวอย่างถึงห้องปฏิบัติการ 23 พฤษภาคม 2554 กำหนดส่งรายงานผลการทดสอบ 27 มิถุนายน 2554 รวบรวมและจัดทำรูปเล่มรายงาน 15 สิงหาคม 2554

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2554

สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) พบว่าตัวอย่างที่เตรียมโดยการเติม (spiked) สารละลายของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนในตัวอย่างน้ำ 20 ลิตร ทดสอบและคำนวณผลโดยใช้ One Way ANOVA แบบ Single Factor จะต้องมี ค่า $F_{value} < F_{critical}$ และสมการ Horwitz equation ค่า $Ss/SDp < 0.3$ ตัวอย่างจึงจะมีความเป็นเนื้อเดียวกัน จากการทดลองและคำนวณผลที่ระดับความเข้มข้น 1–3 ไมโครกรัมต่อลิตร มี $F_{critical}$ เท่ากับ 3.02 ค่า F_{value} ของสารพิษ ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lambda cyhalothrin และ permethrin มีค่า 0.29, 1.02, 0.75, 0.86, 0.67, 0.23 และ 0.89 ด้วยคุณสมบัติและความ

เข้มข้นของสารพิษแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน รวมทั้งปริมาณที่เติมในตัวอย่างน้ำอยู่ในระดับหนึ่งในพันล้านส่วน (ppb) ซึ่งเป็นความเข้มข้นในระดับที่ต่ำมาก โอกาสในการละลายและกระจายตัวของสารพิษในตัวอย่างก็จะมีน้อยด้วย ผลการทดสอบในแต่ละตัวอย่างจึงเกิดความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

การทดสอบความคงทนของตัวอย่างสามารถเก็บใส่ในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง 25±5 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 1 วัน ผลการทดสอบ recovery อยู่ระหว่าง 55 – 110 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น bifenthrin ที่สามารถเก็บได้นานถึง 45 วัน ผลการทดสอบ recovery 86-110 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบเก็บที่สภาวะตู้เย็นอุณหภูมิ 5±3 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ไม่เกิน 7 วัน ผลการทดสอบ recovery 65-119 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น bifenthrin และ fenvalerate ที่สามารถเก็บได้นาน 45 วัน ผลการทดสอบ recovery 74-101 เปอร์เซ็นต์ การเก็บรักษาตัวอย่างใน Freezer อุณหภูมิ–20±5 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน ผลการทดสอบ recovery 65-118 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารพิษชนิด lambda cyhalothrin และ cyfluthrin ที่เก็บได้เพียง 14 วัน ผลการทดสอบ recovery 75-88 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ เตรียมโดยห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร เปรียบเทียบการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรกับห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตร และห้องปฏิบัติของภาคเอกชนที่มีมาตรฐานทางด้านการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ใช้น้ำจากแหล่งต้นน้ำ (น้ำเขื่อน) เป็น sample blank (unspiked) และ spiked sample 2 ชุด ประกอบด้วย S1และ S2 สารพิษในชุด S1 ได้แก่ bifenthrin, cypermethrin และ deltamethrin ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.85, 0.84 และ 1.40 µg/L ตามลำดับ และชุดที่ 2 ได้แก่ cyfluthrin, lambda cyhalothrin และ permethrin ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.74, 0.99 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการเตรียมตัวอย่างน้ำสำหรับใช้ทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlab-comparison) โปรแกรมการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในน้ำ มีห้องปฏิบัติการที่ตอบรับเข้าร่วมการทดสอบและได้รับตัวอย่างเพื่อทดสอบจำนวน 20 ห้องปฏิบัติการ นำผลการทดสอบไปประเมินโดยใช้หลักสถิติ พบว่า มี 5 ห้องปฏิบัติการคือ Lab Code No.16, 17, 18, 19 และ 20 ตรวจพบและรายงานผลการทดสอบสารพิษครบทั้ง 6 ชนิด มี 1 ห้องปฏิบัติการคือ Lab Code No. 16 รายงานผลการทดสอบสารพิษครบทั้ง 5 ชนิด และมีค่า $|z| \leq 2$ ให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจมี 3 ห้องปฏิบัติการคือ Lab Code No.17, 18 และ 20 มีค่า $2<|z|<3$ ให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าสงสัยมี 8 ห้องปฏิบัติการคือ Lab Code No.1, 3, 4, 5, 10, 11, 12 และ 19 ผลการทดสอบมีค่า $|z|>3$ ให้ผลการทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1. ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) โดยใช้ One way ANOVA (ANOVA: Single Factor)

pesticide	ANOVA : Single Factor F_{value} ($F_{critical}$ = 3.02)
1.bifenthrin	0.29
2. cyfluthrin	1.02
3. cypermethrin	0.75
4. deltamethrin	0.86
5. fenvalerate	0.67
6. lambda cyhalothrin	0.23
7. permethrin	0.89

ตารางที่ 2. % recovery ของการทดสอบความคงทน (stability) ของตัวอย่าง เก็บที่สภาวะต่าง ๆ

Pesticide	เก็บในห้องอุณหภูมิ 25 ± 5 °C								เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 5 ± 3 °C								เก็บใน Freezer อุณหภูมิ -20 ± 5 °C								
	1	3	5	7	14	21	30	45	1	3	5	7	14	21	30	45	1	5	14	30	60	90	120	150	180
	(วัน)								(วัน)								(วัน)								
1.bifenthrin	110	109	86	109	98	106	79	102	104	104	97	109	99	94	98	101	97	93	106	102	118	104	71	97	100
2. cyfluthrin	90	28	45	14	18	27	0	ND	97	96	113	86	62	87	92	39	75	99	84	47	50	48	34	38	32
3. cypermethrin	91	45	12	14	0	0	0	ND	112	114	85	85	59	38	34	36	94	87	106	96	68	86	77	93	92
4. deltamethrin	62	42	25	37	11	9	0	ND	87	82	67	75	59	52	54	56	88	86	97	93	52	75	65	83	83
5. fenvalerate	93	78	36	22	24	16	ND	ND	99	96	87	95	79	69	77	74	96	91	101	98	69	95	77	96	97
6. lambda cyhalothrin	55	36	22	11	35	ND	ND	ND	77	72	62	65	52	40	50	47	82	79	88	63	50	44	48	37	40
7. permethrin	100	41	7	8	11	ND	ND	ND	111	119	88	94	74	52	57	43	96	87	119	105	110	80	79	83	78

ND : ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

Lab code	S1					
	bifenthrin		cypermethrin		deltamethrin	
	result	z-Score	result	z-Score	result	z-Score
1	NR		0.02	-4.3	0.04	-4.5
2	NT		NT		NT	
3	0.05	-6.0	0.06	-3.0	0.08	-4.1
4	0.04	-6.2	0.09	-2.0	NR	
5	0.06	-5.9	0.05	-3.3	0.08	-4.1
6	0.07	-5.8	0.07	-2.7	NR	
7	NR		NR		0.005	-4.9
8	NR		NR		NR	
9	NR		NR		NR	
10	NR		0.088	-2.1	NR	
11	NR		0.06	-3.0	NR	
12	NR		0.29	4.7	0.32	-1.4
13	NT		ND		NT	
14	ND		ND		ND	
15	ND		ND		ND	
16	0.57	0.5	0.19	1.3	0.61	1.9
17	0.45	-1.0	0.21	2.0	0.63	2.2
18	0.37	-2.01	0.13	-0.7	0.56	1.4
19	0.52	-0.1	0.28	4.3	0.74	3.4
20	0.52	-0.1	0.19	1.3	0.64	2.3
Assigned Value	0.53		0.15		0.44	
Spike	0.85		0.88		1.40	
Median	0.37		0.09		0.44	
Mean	0.29		0.13		0.37	
N	9		12		10	
Maximum	0.57		0.29		0.74	
Minimum	0.04		0.02		0.005	
Robust SD	0.25		0.13		0.32	

NT : Not test

NR : Not report

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ (ต่อ)

Lab code	S2					
	cyfluthrin		Lambda cyhalothrin		permethrin	
	result	z-Score	result	z-Score	result	z-Score
1	0.04	-4.4	0.03	-4.7	NR	
2	NT		NT		NT	
3	0.08	-3.8	0.07	-4.3	NR	
4	0.39	0.7	NR		NR	
5	NR		0.05	-4.5	NR	
6	0.08	-3.8	NR		NR	
7	NR		NR		NR	
8	NR		NR		NR	
9	NR		NR		NR	
10	NR		NR		NR	
11	NR		NR		NR	
12	0.51	2.5	0.19	-2.9	0.11	-2.9
13	NT		NT		ND	
14	ND		ND		ND	
15	ND		ND		ND	
16	0.29	-0.7	0.49	0.2	0.23	-0.7
17	0.53	2.8	0.6	1.4	0.17	-1.8
18	0.49	2.2	0.61	1.5	0.35	1.5
19	0.37	0.4	0.52	0.5	0.61	6.3
20	0.24	-1.5	0.47	0.00	0.19	-1.5
Assigned Value	0.34		0.47		0.27	
Spike	0.74		0.99		0.50	
Median	0.33		0.47		0.21	
Mean	0.30		0.34		0.28	
N	10		9		6	
Maximum	0.53		0.61		0.61	
Minimum	0.04		0.03		0.11	
Robust SD	0.21		0.17		0.06	

NT : Not test

NR : Not report

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากการทดสอบค่าต่างๆ ที่จำเป็นของการเตรียมตัวอย่างสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิดในน้ำ และการทดลองเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการสามารถสรุปได้ว่า ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร สามารถเป็นหน่วยงานในการจัดเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อใช้ในการทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ให้กับหน่วยงานที่ต้องการเข้าร่วมการทดสอบความสามารถของห้องปฏิบัติการกับห้องปฏิบัติอื่น ๆ เพื่อเป็นการแสดงถึงความสามารถในการทดสอบและเป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในเรื่องการประกันคุณภาพผลการทดสอบได้ แต่ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของภาชนะที่ใช้ในการบรรจุตลอดจนสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการสลายตัวของสารพิษในตัวอย่างน้ำในระหว่างขั้นตอนการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมการทดสอบ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถถ่ายทอดได้โดย

1. ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ในน้ำสำหรับห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมการทดสอบ

2. ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตรได้มีพัฒนา และเป็นการเพิ่มประสบการณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ในน้ำ

3. ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการสามารถเตรียมตัวอย่างและจัดตั้งเครือข่ายในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในน้ำได้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข 2548 การทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์ เอกสารประกอบการสัมมนา 14 ม.ค. 2548 โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพฯ

ประภาศรี ภูวเสถียร และครรชิต จุดประสงค์ 2549 International Workshop on Laboratory Quality Standard towards Global Competition: Management Systems, Reference Materials, and Proficiency testing เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ 17-21 ก.ค. 2549 มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม

อุทุมพร จงไพบูลย์กิจ 2549 การทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ 15 มี.ค. 2549 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรุงเทพฯ

AOAC Peer – Verified Methods. Nov. 1993.

ISO 13528: 2005,“Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons”. (2005), ISO

NARL. 2002. Analytical Quality Assurance Study No. 02-02. 93 p.

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

Development and Method Validation on Analysis of Total Nitrogen in Chemical Fertilizer

ทองจันทร์ พิมพ์เพชร ปรียาภรณ์ บุญขจาย

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ซึ่งทางห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย ได้ทำการดัดแปลงและพัฒนาจากวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานสากลของ AOAC ทำการวิเคราะห์โดยใช้ Kjeldahl Method พบว่าค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.41 %TN และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.83% TN เมื่อพิสูจน์ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความเที่ยง (Precision) ของ Limit of Quantitation ได้ค่า % Recovery เท่ากับ 100.58% และ HORRAT (Horwitz' Ratio) เท่ากับ 1.28 นำผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของ CRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง และต่ำ มาคำนวณ % Recovery เพื่อพิสูจน์ความถูกต้อง และค่า HORRAT (Horwitz' Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน และการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นสูง (46% TN), ระดับความเข้มข้นกลาง (26% TN) และระดับความเข้มข้นต่ำ (1.1651% TN) % Recovery เท่ากับ 99.82%, 100.00% และ 101.28% ค่า HORRAT (Horwitz' Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability) เท่ากับ 0.29, 0.57 และ 0.85 ค่า HORRAT(Horwitz' Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.39, 0.60 และ 0.43 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด (%Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% และ HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2)

คำนำ

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ปุ๋ยจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเพาะปลูกพืช ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ย อันได้แก่ ไนโตรเจน จึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมคุณภาพปุ๋ย ทำให้เกษตรกรมีความมั่นใจในคุณภาพของปุ๋ยที่นำไปใช้ ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิควิธีการวิเคราะห์เพื่อให้มั่นใจว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว

การตรวจสอบควบคุมคุณภาพปุ๋ยเคมีตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 แก้ไขเพิ่มเติม โดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 นั้น ต้องอาศัยวิธีการทดสอบปริมาณไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักของปุ๋ยเคมี วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานสากลของ AOAC 2005th Ed. Method 955.04 ข้อ 2.4.03 จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่

เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยและเพื่อให้มีความเชื่อมั่นในผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานสากล โดยดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material: CRM) เพื่อหา Limit of Detection (LOD), Limit of Quatitation (LOQ) ประเมินค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรองที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 3 ระดับความเข้มข้น เพื่อให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน (Working Range) 0–46% ไนโตรเจน แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ย ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ยผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี (Method Validation) ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เหมาะสมสำหรับใช้ประกอบการขอการรับรองห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

วิธีดำเนินการ

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
2. Macro Kjeldahl Digestion Apparatus and Distilling Apparatus
3. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์

สารเคมี

1. Boric acid AR, Grade
2. Copper sulfate, AR Grade
3. Ethyl alcohol 90%, AR Grade
4. Methylene blue, AR Grade
5. Metyl red AR, Grade
6. Potassium sulfate, AR Grade
7. Salicylic acid, AR Grade
8. Sulfuric acid 98%, AR Grade
9. Standard hydrochloric acid 1 N, AR Grade
10. Sodium hydroxide, Commercial Grade
11. Sodium thiosulfate, AR Grade
12. Zinc granular, AR Grade
13. วัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน

13.1 Urea 46.535 ± 0.77% (CRM-BCR 179)

13.2 Ammonium Dihydrogen phosphate 12.15 ± 0.01% Nitrogen (SRM No. 194 NIST)

13.3 Calcium Ammonium Nitrate 26.019 ± 0.54% Nitrogen (CRM-BCR 178)

13.4 Sodium Carbonate, Purity 99.970 ± 0.014% (SRM 351a)

วิธีการ

1. การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

1.1 ชั่ง Sample Blank น้ำหนัก 0.3xxx - 0.4xxx กรัม ใส่ Kjeldahl Flask

1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005th Ed. Method 955.04 ข้อ 2.4.03

1.3 บันทึกข้อมูล คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.4 คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = \overline{X} + 3\,SD$$

$$LOQ = \overline{X} + 10\,SD$$

2. การศึกษาหาค่า Accuracy วิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

2.1 ชั่ง CRM ของปุ๋ยที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงคือ Urea 46.535 ± 0.77% Nitrogen (CRM-BCR 179) ความเข้มข้นกลางคือ Calcium Ammonium Nitrate 26.019 ± 0.54% Nitrogen (CRM-BCR 178) และความเข้มข้นต่ำคือ การเตรียมโดยชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง Urea 46.535 ± 0.77% น้ำหนัก 4 กรัม ใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 1.1651% Nitrogen ซึ่งแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ ไม่ต่ำกว่าความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พร้อมทำ Blank โดยดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดเหมือนการวิเคราะห์ CRM ทุกประการเพียงแต่ไม่ต้องใส่ CRM ลงไปเท่านั้น

2.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005th Ed. Method 955.04 ข้อ 2.4.03

2.3 บันทึกผลปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร) และคำนวณผลไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้

2.4 เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่ารับรองของ CRM โดยการพิจารณา % Recovery ตาม AOAC Peer–Verified method, Nov. 1998 เกณฑ์การยอมรับ อยู่ในช่วง 98-102%

$$\%\ \text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าอ้างอิง (จากใบรับรอง)}} \times 100$$

2.5 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน คือสารตัวเติม (Filler) และชั่ง CRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำเติมลงไป พร้อมกับทำ Sample Blank ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับขั้นตอน 2.1–2.4 โดยทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

หมายเหตุ CRM ที่ความเข้มข้นต่ำ เตรียมโดยนำ CRM ที่ความเข้มข้นกลาง หรือสูงมาเตรียมเป็นปุ๋ยน้ำที่ความเข้มข้นต่ำ โดยที่ความเข้มข้นต่ำนี้พิจารณาจากขอบข่ายการขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 คือ 2.6 - 46.5% TN

- Accuracy จะประเมินค่า % Recovery ตาม AOAC Peer – Verified method, Nov. 1998 เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 98 -102%

3. การศึกษาหาค่า Precision วิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

3.1 ชั่ง CRM ของปุ๋ยทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นสูงคือ Urea 46.535±0.77% Nitrogen (CRM-BCR 179) ความเข้มข้นกลางคือ Calcium Ammonium Nitrate 26.019±0.54% Nitrogen (CRM-BCR 178 และความเข้มข้นต่ำคือ การเตรียมโดยชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง Urea 46.535 ±0.77% น้ำหนัก 4 กรัม ใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 1.1651% Nitrogen ซึ่งแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ ไม่ต่ำกว่าความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล เวลา และเครื่องมือเดียวกัน

3.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005th Ed. Method 955.04 ข้อ 2.4.03

3.3 บันทึกผลไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ และคำนวณหาค่า Precision โดยใช้ Horwitz equation คำนวณแบบ Repeatability

3.4 ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับขั้นตอน 3.1– 3.3 ที่ 3 ระดับความเข้มข้น โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน ทำการวิเคราะห์วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน

3.5 การประเมินค่า Precision ในเกณฑ์การประเมิน : ใช้ HORRAT (Horwitz' Ratio)

$$\text{HORRAT (Horwitz' Ratio)} = \frac{\%RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

เกณฑ์การยอมรับ AOAC : HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

C = Concentration ratio

$$\%\ RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยการหาค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ), Accuracy และ Precision พบว่า

1. จากผลการวิเคราะห์ Sample Blank ได้ค่า %TN เฉลี่ย = 0.23 และ SD = 0.06

ดังนั้น LOD = $\overline{X}$ + 3sd = 0.23+0.18 = 0.41 %TN

LOQ = $\overline{X}$ + 10sd = 0.23+0.60 = 0.83 %TN

พิสูจน์ Accuracy และ Precision ของ LOQ โดยชั่ง CRM Urea (46.535% TN) น้ำหนัก 1.0012 กรัม ใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน (คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 0.4659% TN)

จากผลการวิเคราะห์สารละลายความเข้มข้น 0.4659% TN ได้ค่า %TN เฉลี่ย = 0.47 และ SD = 0.01

คำนวณ % Recovery = 100.58 % และค่า HORRAT (Horwitz' Ratio) = 1.28

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ เกณฑ์การยอมรับ HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2 แสดงว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ

2. การศึกษาหาค่า Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

ตารางที่ 1. แสดงผลการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

ซ้ำที่ 1-10	CRM Urea (46.535% TN)	CRM CAN (26.02%TN)	STD. (1.1651%TN)
ค่าเฉลี่ย	46.45	26.02	1.18
SD	0.20	0.92	0.04
% Recovery	99.82	100.00	101.28
HORRAT	0.29	0.57	0.85

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ เกณฑ์การยอมรับ HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2 แสดงว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

3. การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ตารางที่ 2. แสดงผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ซ้ำที่	Sample Blank (% TN)	CRM Urea (46.535% TN)	CRM CAN (26.02%TN)	STD. (1.1651%TN)
ค่าเฉลี่ย	0.00	46.41	25.87	1.16
SD	0.00	0.23	0.89	0.03
%Recovery	-	99.73	99.42	99.56

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

4. การศึกษาหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

ตารางที่ 3. แสดงผลการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

ซ้ำที่ 1-10	CRM Urea (46.535% TN)	CRM CAN (26.02%TN)	STD. (1.1651%TN)
ค่าเฉลี่ย	46.35	25.91	1.17
SD	0.27	0.25	0.02
% Recovery	99.6	99.58	100.42
HORRAT	0.39	0.60	0.43

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

เกณฑ์การยอมรับ HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2 แสดงว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี เพื่อให้ได้เทคนิควิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล ทำให้เป็นที่ยอมรับ โดยทำการศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantition (LOQ), ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ทำการทดลองโดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของ CRM 3 ระดับความเข้มข้นเพื่อให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน คือ 0–46 % TN และนำมาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยหาค่า % Recovery พบว่าค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (98–102%) และพิสูจน์ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT Horwitz's Ratio พบว่า ค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

การนำไปใช้ประโยชน์

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ย เป็นการพิสูจน์ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ย เพื่อให้มีความเชื่อมั่นในผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ และยื่นขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในขอบข่ายการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 66 หน้า

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 547 หน้า

ดุษฎี มั่นความดี. 2544. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี. กองเคมี. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ. 27 หน้า

อุมาพร สุขม่วง และ อารีย์ คชฤทธิ์. 2553. เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตร "ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ". กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ. 33 หน้า

AOAC Peer – Verified method, Nov. 1998.

Association of Official Analytical Chemises (AOAC). 2005. Official Method of Anaysis 955.04. 18th ed. International Gaithersburg, MD, USA. P. 13-14

ASTM 2001. Standard Practice for Preparation, Standardization, and Storage of Standard and Reagent Solutions for Chemical Analysis. Washington. Oct. 2001. p 336–p 350.

Official Methods of Analysis of Fertilizers. 1987. The National Institute of Agriculture Sciences. Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Japan. 130 p.

ภาคผนวก

1. **การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)**

ตารางที่ 1. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง Lab No. 53I-2342 (สูตร 0-0-60)

ซ้ำที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	Factor	ปริมาตร HCl (มิลลิลิตร)	%TN
1	0.3302	0.2825	0.3	0.26
2	0.3286	0.2825	0.3	0.26
3	0.3305	0.2825	0.3	0.26
4	0.3307	0.2825	0.4	0.34
5	0.325	0.2825	0.2	0.17
6	0.3301	0.2825	0.2	0.17
7	0.3268	0.2825	0.2	0.17
8	0.3331	0.2825	0.3	0.26
9	0.3301	0.2825	0.3	0.26
10	0.3247	0.2825	0.2	0.17
		ค่าเฉลี่ย		0.23
		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		0.06

ตารางที่ 2. พิสูจน์ Accuracy และ Precision ของ LOQ โดยชั่ง CRM Urea (46.535% TN) น้ำหนัก 1.0012 กรัม ใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน (คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 0.4659% TN)

ซ้ำที่	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	factor	ปริมาตร HCl (มิลลิลิตร)	%TN
1	1.0112	0.2831	1.7	0.4759
2	1.018	0.2831	1.7	0.4728
3	1.0091	0.2831	1.7	0.4682
4	1.0279	0.2831	1.6	0.4407
5	1.0021	0.2831	1.6	0.452
6	1.0107	0.2831	1.7	0.4762
7	1.008	0.2831	1.7	0.4775
8	1.0138	0.2831	1.7	0.4747
9	1.0098	0.2831	1.7	0.4766
10	1.0205	0.2831	1.7	0.4716
		ค่าเฉลี่ย		0.4686
		ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		0.0123

2. **การศึกษาหาค่า** Accuracy **และ** Precision **ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน** (Repeatability)

ตารางที่ 3. ผลการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง และ ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน

ซ้ำที่	CRM Urea (46.535% TN)	CRM CAN (26.02%TN)	STD. (1.1651%TN)
1	46.16	26.16	1.12
2	46.58	26.11	1.14
3	46.3	25.59	1.21
4	46.18	26.09	1.2
5	46.55	26.08	1.22
6	46.63	25.84	1.21
7	46.69	26.2	1.19
8	46.27	26.24	1.21
9	46.51	26.24	1.17
10	46.6	25.65	1.14
ค่าเฉลี่ย	46.45	26.02	1.18
SD	0.2	0.92	0.04

3. **การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร(Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป**

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร(Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ซ้ำที่	Sample Blank	CRM Urea	CRM CAN	STD.
	(% TN)	(46.535% TN)	(26.02%TN)	(1.1651%TN)
1	0.00	46.09	25.71	1.11
2	0.00	46.67	25.59	1.18
3	0.00	46.65	25.68	1.15
4	0.00	46.43	25.86	1.15
5	0.00	46.06	25.92	1.20
6	0.00	46.35	25.8	1.16
7	0.00	46.34	26.09	1.21
8	0.00	46.73	26.05	1.13
9	0.00	46.41	26.05	1.13
10	0.00	46.36	25.79	1.19
ค่าเฉลี่ย	0.00	46.41	25.87	1.16
SD	0.00	0.23	0.89	0.03
%Recovery		99.73	99.42	99.56

4. **การศึกษาหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน** (Intermediate)

ตารางที่ 5. ผลการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง และต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน

วันที่	CRM Urea (46.535% TN)	CRM CAN (26.02%TN)	STD. (1.1651%TN)
1	46.6	26.31	1.17
2	46.04	26.04	1.14
3	46.45	26.18	1.18
4	46.61	25.78	1.22
5	46.01	26.19	1.14
6	46.4	25.66	1.14
7	46.58	25.62	1.18
8	46.13	25.64	1.16
9	46.64	25.87	1.17
10	46	25.8	1.18
ค่าเฉลี่ย	46.35	25.91	1.17
SD	0.27	0.25	0.02

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

Development and Method Validation on Analysis of Ammonium Nitrogen in Chemical Fertilizer

ทองจันทร์ พิมพ์เพชร สงกรานต์ มะลิสอน

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ซึ่งทางห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย ได้ทำการดัดแปลงและพัฒนาจากวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานสากลของ AOAC จึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ทำการวิเคราะห์โดยใช้ Kjeldahl Method พบว่าค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.01% AN และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.05%AN นำผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง และต่ำ มาคำนวณ % Recovery เพื่อพิสูจน์ความถูกต้อง และค่า HORRAT (Horwitz' Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน และการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นสูง (21% AN), ระดับความเข้มข้นกลาง (12% AN) และระดับความเข้มข้นต่ำ (1.2178% AN) % Recovery เท่ากับ 99.72%, 99.92% และ 101.33% ค่า HORRAT (Horwitz' Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability) เท่ากับ 0.25, 0.24 และ 0.81 ค่า HORRAT (Horwitz' Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.20, 0.38 และ 0.72 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด (%Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% และ HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2)

คำนำ

แอมโมเนียมไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งรูปที่สำคัญของไนโตรเจน เป็นธาตุอาหารที่มีบทบาทในการเจริญเติบโตของพืชเพราะไนโตรเจนเป็นธาตุที่ช่วยให้พืชสร้างโปรตีนได้อย่างเพียงพอ พืชทุกชนิดต้องมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของโพรโทพลาซึม (Protoplasm) พืชสามารถดูดซึมไนโตรเจนในรูปของไนเตรท (NO_3^-) แล้วแตกตัวออกเป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+ - N) รวมตัวกับ Carbon skeleton เป็น Glutamic acid ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโนกว่าร้อยชนิด กรดอะมิโนมากกว่า 20 ชนิดจะจับตัวกันด้วย Peptide bond เป็นส่วนประกอบสำคัญอยู่ในโปรตีนของพืช โดยมีการรวมตัวกันของกรดอะมิโนเหล่านี้ด้วยลักษณะพันธุ์พืช ทั้งนี้ปัจจัยที่สำคัญก็คือสภาพแวดล้อม และปริมาณไนโตรเจน (ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

การตรวจสอบควบคุมคุณภาพปุ๋ยเคมีตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 นั้น ต้องอาศัยวิธีการทดสอบปริมาณไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักของปุ๋ยเคมี วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย เป็นวิธี ที่ดัดแปลงและปรับปรุงจากวิธีมาตรฐานสากลของ AOAC 2005th Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07 จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานสากล

ดำเนินการทดสอบโดยการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM) เพื่อประเมินค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) และดำเนินการทดสอบเกี่ยวกับการหา Limit of Detection (LOD) และLimit of Quatitation (LOQ) โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรองที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน 3 ระดับความเข้มข้น เพื่อให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน (Working Range) 0–21% ไนโตรเจน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เหมาะสมสำหรับใช้ประกอบการขอการรับรองห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

วิธีดำเนินการ

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
2. Macro Kjeldahl Digestion Apparatus and Distilling Apparatus
3. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์

สารเคมี

1. Ethyl Alcohol 90%, AR Grade
2. Boric Acid, AR Grade
3. Methylene Blue, AR Grade
4. Methyl Red, AR Grade
5. Pumice Stone Granular, AR Grade
6. Standard Hydrochloric Acid 1 N, AR Grade
7. Sodium Hydroxide, Commercial Grade
8. วัสดุอ้างอิงรับรอง
   - 8.1 Ammonium Chloride 26.28 % Nitrogen (Aldrich Chem. 326372)
   - 8.2 Ammonium Sulphate 99.999 % Purity 21.20% Nitrogen (Aldrich Chem. 204501)
9. วัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน
   - 9.1 Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15 ± 0.11% Nitrogen (SRM No.194 NIST)

9.2 Sodium Carbonate Purity 99.970 ± 0.014 % (SRM 351a)

วิธีการ

1. การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน

1.1 ชั่ง Sample Blank น้ำหนัก 0.3xxx - 0.4xxx กรัม ใส่ Kjeldahl Flask

1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005th Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07

1.3 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจน คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.4 คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

LOD = $\overline{X}$+ 3 SD

LOQ = $\overline{X}$ + 10 SD

2. การศึกษาหาค่า Accuracy วิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

2.1 ชั่ง SRM ของปุ๋ยที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงคือ Ammonium Sulphate 99.999% Purity 21.20% Nitrogen (Aldrich Chem. 204501) ความเข้มข้นกลางคือ Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15±0.11% Nitrogen (SRM No.194 NIST) และความเข้มข้นต่ำคือ การเตรียมโดยชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15±0.11% Nitrogen (SRM No.194 NIST) น้ำหนัก 4.0250 กรัม ใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 0.4890% AN ซึ่งแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ ไม่ต่ำกว่าความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พร้อมทำ Blank โดยดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนเหมือนการวิเคราะห์ CRM/SRM ทุกประการ

2.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005th Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07

2.3 บันทึกผลปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร) และคำนวณผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้

2.4 เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่ารับรองของ CRM โดยการพิจารณา % Recovery ตาม AOAC Peer – Verified method, Nov. 1998 เกณฑ์การยอมรับ อยู่ในช่วง 98-102%

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้ x 100}}{\text{ค่าอ้างอิง(จากใบรับรอง)}}$$

2.5 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกันคือสารตัวเติม (Filler) และชั่ง CRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำเติมลงไป พร้อมกับทำ Sample Blank ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับขั้นตอน 2.1–2.4 โดยทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

หมายเหตุ CRM ที่ความเข้มข้นต่ำ เตรียมโดยนำ CRM ที่ความเข้มข้นกลาง หรือสูงมาเตรียมเป็นปุ๋ยน้ำที่ความเข้มข้นต่ำ โดยที่ความเข้มข้นต่ำนี้พิจารณาจากขอบข่ายการขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 คือ 3.0-21.0% AN

- Accuracy จะประเมินค่า % Recovery ตาม AOAC Peer–Verified method, Nov. 1998 เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 98-102 %

3. การศึกษาหาค่า Precision วิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

3.1 ชั่ง CRM/SRM ของปุ๋ยทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นสูงคือ Ammonium Sulphate 99.999% Purity 21.20% Nitrogen (Aldrich Chem. 204501) ความเข้มข้นกลางคือ Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15±0.11% Nitrogen (SRM No.194 NIST) และความเข้มข้นต่ำคือ การเตรียมโดยชั่งวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15 ± 0.11% Nitrogen น้ำหนัก 4.0250 กรัม ใส่ Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้ เข้ากัน คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 1.2178% AN ซึ่งแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ ไม่ต่ำกว่าความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล เวลา และเครื่องมือเดียวกัน

3.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005th Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07

3.3 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ และคำนวณหาค่า Precision โดยใช้ Horwitz equation คำนวณแบบ Repeatability

3.4 ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับขั้นตอน 3.1–3.3 ที่ 3 ระดับความเข้มข้น โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน ทำการวิเคราะห์วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน

3.5 การประเมินค่า Precision ในเกณฑ์การประเมิน : ใช้ HORRAT (Horwitz' Ratio)

$$\text{HORRAT (Horwitz' Ratio)} = \frac{\%\ \text{RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

เกณฑ์การยอมรับ AOAC : HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

$$\%\ \text{RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

ผลการทดลอง

1. การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง Lab No. 53G-3179 ที่เติมสารมาตรฐานแอมโมเนียมไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ปริมาณเล็กน้อย โดยชั่งน้ำหนัก SRM ของปุ๋ยสูตร 12-60-0 ได้น้ำหนัก 4.0028 กรัม ละลายน้ำปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 0.4863 %AN

จากผลการทดลอง พบว่าค่า % NH_4^+ - N เฉลี่ย = 0.48 และ SD = 0.0048 (นำค่า SD มาคำนวณหา LOD, LOQ)

$$LOD = \bar{X} + 3\ SD = 0.00 + 0.01 = 0.01\ \%\ NH_4^+ - N$$

$$LOQ = \bar{X} + 10SD = 0.00 + 0.05 = 0.05\ \%\ NH_4^+ - N$$

2. การศึกษาหาค่า Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

ตารางที่ 1. แสดงผลการวิเคราะห์ CRM/SRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

ซ้ำที่ 1-10	Ammonium Sulphate (21.20% AN)	SRM DAP (12.15%AN)	STD. (1.2178%AN)
ค่าเฉลี่ย	21.14	12.14	1.23
SD	0.10	0.08	0.03
% Recovery	99.72	99.92	101.33
HORRAT	0.25	0.24	0.81

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98 -102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ เกณฑ์การยอมรับ HORRAT (Horwitz' Ratio)<2 แสดงว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

3. การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ตารางที่ 2. แสดงผลการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ซ้ำที่	Sample Blank (% AN)	Ammonium Sulphate (21.20% AN)	SRM DAP (12.15%AN)	STD. (1.2178%AN)
ค่าเฉลี่ย	0.00	21.11	12.11	1.24
SD	0.00	0.05	0.04	0.03
%Recovery	-	99.76	99.92	101.28

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

4. การศึกษาหาค่า Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

ตารางที่ 2. แสดงผลการวิเคราะห์ CRM/SRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

ซ้ำที่ 1-10	Ammonium Sulphate (21.20% AN)	SRM DAP (12.15%AN)	STD. (1.2178%AN)
ค่าเฉลี่ย	21.18	12.19	1.23
SD	0.07	0.08	0.02
% Recovery	99.91	100.33	101
HORRAT	0.20	0.38	0.72

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ เกณฑ์การยอมรับ HORRAT (Horwitz' Ratio)<2แสดงว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี เพื่อให้ได้เทคนิควิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล ทำให้เป็นที่ยอมรับ โดยทำการศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ), ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ทำการทดลองโดยการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนของ CRM 3 ระดับความเข้มข้นเพื่อให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน คือ 0–21% AN และนำมาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยหาค่า % Recovery พบว่าค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (98–102 %) และพิสูจน์ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT (Horwitz' Ratio) พบว่าค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

การนำไปใช้ประโยชน์

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ย เป็นการพิสูจน์ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ย และเพื่อให้มีความเชื่อมั่นในผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ และยื่นขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในขอบข่ายการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ในปุ๋ยได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 66 หน้า

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 547 หน้า

ดุษฎี มั่นความดี. 2544. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี. กองเคมี. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ. 27 หน้า

อุมาพร สุขม่วง และ อารีย์ คชฤทธิ์. 2553. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร “ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ”. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ. 33 หน้า

AOAC Peer–Verified method, Nov. 1998.

Association of Official Analytical Chemises (AOAC). 2005. Official Method of Anaysis 955.04. 18th ed. International Gaithersburg, MD, USA. P. 13-14

ASTM 2001. Standard Practice for Preparation, Standardization, and Storage of Standard and Reagent Solutions for Chemical Analysis. Washington. Oct. 2001. p 336–p 350.

Official Methods of Analysis of Fertilizers. 1987. The National Institute of Agriculture Sciences. Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Japan. 130 p.

ภาคผนวก

1. **การศึกษาหาค่า** Limit of Detection (LOD) **และ** Limit of Quantitation (LOQ)

ตารางที่ 1. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง Lab No. 53G-3179 ที่เติมสารมาตรฐานแอมโมเนียมไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบปริมาณเล็กน้อย โดยชั่งน้ำหนัก SRM ของปุ๋ยสูตร 12-60-0 ได้น้ำหนัก 4.0028 กรัม ละลายน้ำปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 0.4863% AN

ซ้ำที่	น้ำหนักตัวอย่างปุ๋ย (กรัม)	น้ำหนัก SRM (กรัม)	factor	ปริมาตร HCl (มิลลิลิตร)	% AN
1	0.3245	5.0321	0.2841	8.6	0.49
2	0.3309	5.0245	0.2841	8.5	0.48
3	0.3195	5.0491	0.2841	8.6	0.48
4	0.3248	5.0348	0.2841	8.5	0.48
5	0.3252	5.0415	0.2841	8.6	0.48
6	0.3266	5.0401	0.2841	8.7	0.49
7	0.3271	5.0382	0.2841	8.6	0.48
8	0.3284	5.0295	0.2841	8.6	0.49
9	0.3301	5.0385	0.2841	8.6	0.48
10	0.3198	5.0386	0.2841	8.6	0.48
ค่าเฉลี่ย					0.48
SD					0.0048

2. การศึกษาหาค่า Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำในครั้งเดียวกัน (Repeatability)

ตารางที่ 2. ผลการวิเคราะห์ CRM/SRM ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คือ Ammonium Sulphate 99.999% Purity 21.20% Nitrogen (Aldrich Chem. 204501) Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15 ± 0.11% Nitrogen (SRM No.194 NIST) และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.2178% AN

ซ้ำที่	Ammonium Sulphate (21.20% AN)	SRM DAP (12.15% AN)	STD. (1.2178% AN)
1	21.14	12.22	1.2
2	21.19	12.19	1.26
3	21.25	12.13	1.24
4	21.02	12.01	1.19
5	21.17	12.12	1.26
6	21.07	12.19	1.24
7	21.27	12.28	1.25
8	21.05	12.08	1.24
9	21.27	12.04	1.26
10	21	12.14	1.2
ค่าเฉลี่ย	21.14	12.14	1.23
SD	0.1	0.08	0.03

3. การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ตารางที่ 3. แสดงผลการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร(Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

ซ้ำที่	Sample Blank (% AN)	Ammonium Sulphate (21.20% AN)	SRM DAP (12.15% AN)	STD. (1.2178% AN)
1	0.00	21.08	12.14	1.26
2	0.00	21.14	12.12	1.25
3	0.00	21.19	12.04	1.26
4	0.00	21.17	12.19	1.19
5	0.00	21.07	12.12	1.2
6	0.00	21.12	12.1	1.24
7	0.00	21.11	12.06	1.3
8	0.00	21.06	12.08	1.23
9	0.00	21.12	12.07	1.26
10	0.00	21.05	12.13	1.24
ค่าเฉลี่ย	0.00	21.11	12.11	1.24
SD	0.00	0.05	0.04	0.03
%Recovery	-	99.76	99.92	101.08

4. การศึกษาหาค่า Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

ตารางที่ 4. ผลการวิเคราะห์ CRM/SRM ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คือ Ammonium Sulphate 99.999% Purity 21.20% Nitrogen (Aldrich Chem. 204501), Ammonium Dihydrogen Phosphate 12.15 ± 0.11% Nitrogen (SRM No.194 NIST) และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.2178% AN

วันที่	Ammonium Sulphate (21.20% AN)	SRM DAP (12.15% AN)	STD. (1.2178% AN)
1	21.15	12.29	1.22
2	21.26	12.15	1.26
3	21.13	12.2	1.21
4	21.07	12.04	1.24
5	21.19	12.25	1.25
6	21.18	12.06	1.26
7	21.24	12.27	1.23
8	21.28	12.21	1.25
9	21.08	12.24	1.2
10	21.17	12.23	1.2
ค่าเฉลี่ย	21.18	12.19	1.23
SD	0.07	0.08	0.02

การให้บริการวิเคราะห์ตรวจสอบคุณสมบัติดินและน้ำ

กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ ได้ให้บริการให้คำแนะนำการเก็บตัวอย่างดิน และน้ำที่ถูกต้อง ให้บริการวิเคราะห์ตรวจสอบคุณสมบัติของดินทั้งทางฟิสิกส์และทางเคมี เพื่อเป็นข้อมูลในการให้คำแนะนำการปรับปรุงดินและใช้ปุ๋ยที่เหมาะสมกับพืช ให้บริการวิเคราะห์ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำทางเคมี และให้คำแนะนำการปรับปรุงคุณภาพน้ำเพื่อใช้ในการเกษตรกรรมตามค่าวิเคราะห์น้ำผลการให้บริการ ดังนี้

ตารางที่ 1. ผลการให้บริการตรวจสอบคุณสมบัติ ดิน และ น้ำ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ประเภท	ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554								
	ดิน			น้ำ			รวม		
ผู้รับบริการ	ราย	ตัวอย่าง	รายการ	ราย	ตัวอย่าง	รายการ	ราย	ตัวอย่าง	รายการ
หน่วยราชการ	35	562	4,268	12	174	3,712	47	736	7,980
เกษตรกร	95	219	1,615	85	187	2,335	180	406	3,950
บริษัท	64	1,254	4,883	14	28	354	78	1,282	5,237
นิสิต/นักศึกษา	60	493	2,068	7	37	248	67	530	2,316
รวม	254	2,528	12,834	118	426	6,649	372	2,954	19,483

ผลการให้บริการวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน และน้ำประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

หากพิจารณาจากจำนวนผู้รับบริการ พบว่า ประเภทผู้รับบริการที่ส่งตัวอย่างมามากที่สุด คือ เกษตรกร ของทั้งตัวอย่างดินและน้ำ ซึ่งผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินมีจำนวน 95 ราย หรือคิดเป็น 37.40% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์ดินทั้งหมด และของผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมีจำนวน 85 ราย หรือคิดเป็น 72.03% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์น้ำทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรให้ความสำคัญกับการวิเคราะห์คุณภาพดินและน้ำ

รองลงมาคือ บริษัท ของทั้งตัวอย่างดินและน้ำ ซึ่งผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินมีจำนวน 64 ราย หรือคิดเป็น 25.20% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์ดินทั้งหมด และของผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมีจำนวน 14 ราย หรือคิดเป็น 11.86% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์น้ำทั้งหมด

อันดับที่ 3 คือ นิสิต/นักศึกษา สำหรับตัวอย่างดิน ซึ่งผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินมีจำนวน 60 ราย หรือคิดเป็น 23.62% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์ดินทั้งหมด แต่จำนวนผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำอยู่ในอันดับสุดท้าย มีจำนวน 7 ราย หรือคิดเป็น 5.93% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์น้ำทั้งหมด ซึ่งตัวอย่างจากนิสิต/นักศึกษานี้ส่งวิเคราะห์เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการทำวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาโท และปริญญาเอก ซึ่งจะเห็นได้ว่า สัดส่วนของการทำงานวิจัย หรืองานวิทยานิพนธ์เรื่องเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเพื่อการเกษตรยังมีสัดส่วนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับงานวิจัยทางด้านคุณภาพของดิน

อันดับสุดท้าย คือ หน่วยราชการ สำหรับตัวอย่างดิน ซึ่งผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างดินมีจำนวน 35 ราย หรือคิดเป็น 13.78% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์ดินทั้งหมด แต่จำนวนผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำอยู่ในอันดับที่ 3 มีจำนวน 12 ราย หรือคิดเป็น 10.17% ของจำนวนผู้รับบริการวิเคราะห์น้ำทั้งหมด หน่วยราชการนั้นมาจากหน่วยงานต่างๆ เช่น กรมควบคุมมลพิษ รวมถึงหน่วยงานภายในกรมวิชาการเกษตร โดยตัวอย่างจากหน่วยราชการนี้จะมีวัตถุประสงค์แตกต่างกัน เช่น วิเคราะห์เพื่อสนับสนุนงานวิจัยหรือโครงการพิเศษ หรือวิเคราะห์เพื่อให้คำแนะนำกับเกษตรกรโดยมีหน่วยราชการเป็นฝ่ายประสานงาน

หากพิจารณาจากจำนวนตัวอย่างพบว่า ประเภทผู้รับบริการที่ส่งมามากที่สุด คือ บริษัท ส่งตัวอย่างดินจำนวน 1,254 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 49.60% ของตัวอย่างดินทั้งหมด แต่ตัวอย่างน้ำจะอยู่อันดับสุดท้าย มีจำนวน 28 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 6.57% ของตัวอย่างน้ำทั้งหมด

รองลงมาคือ ราชการ ส่งตัวอย่างดินจำนวน 562 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 22.23% ของตัวอย่างดินทั้งหมด และตัวอย่างน้ำ จำนวน 174 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 40.85% ของตัวอย่างน้ำทั้งหมด

อันดับที่ 3 คือ นิสิต/นักศึกษา ส่งตัวอย่างดินจำนวน 493 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 19.50% ของตัวอย่างดินทั้งหมด และตัวอย่างน้ำ จำนวน 37 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 8.69% ของตัวอย่างน้ำทั้งหมด

และอันดับสุดท้าย คือ เกษตรกร ส่งตัวอย่างดินจำนวน 219 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 8.66% ของตัวอย่างดินทั้งหมด แต่ตัวอย่างน้ำจะอยู่อันดับที่ 1 มีจำนวน 187 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 43.90% ของตัวอย่างน้ำทั้งหมด

เมื่อพิจารณาตัวอย่างดินเปรียบเทียบระหว่างจำนวนผู้รับบริการกับจำนวนตัวอย่าง จะพบว่า จำนวนผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์ดินมากที่สุด คือ เกษตรกร แต่จำนวนตัวอย่างวิเคราะห์ดินมากที่สุด คือ บริษัท แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนผู้รับบริการกับจำนวนตัวอย่าง ของประเภทผู้รับบริการต่างกัน นั่นคือในบริษัทแต่ละรายจะส่งตัวอย่างดินหลายตัวอย่างมากกว่าของเกษตรกร เนื่องจากตัวอย่างดินที่ส่งโดยบริษัท จะเป็นตัวอย่างที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นข้อมูลประกอบงานวิจัยของทางบริษัท หรือเป็นตัวอย่างจากบริษัทที่ทำหน้าที่เป็นผู้รับเหมาช่วง หรือเป็นบริษัทผู้ส่งออกสินค้าเกษตร หรือบริษัทผู้ผลิตสินค้าเกษตรที่เข้าร่วมโครงการเกษตรอินทรีย์ ซึ่งบริษัทเหล่านี้ จะต้องมีข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินและน้ำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในกลุ่มของหน่วยราชการ และกลุ่มนิสิต/นักศึกษา ก็เป็นไปในลักษณะเช่นเดียวกัน แต่ของทางเกษตรกร จะเป็นตัวอย่างดินจากการเพาะปลูกพืช ซึ่งส่วนใหญ่จะปลูกพืชชนิดเดียวกัน และตัวอย่างที่จะนำมาส่งต่อ 1 ตัวอย่างสามารถเก็บรวบรวมแต่ละไร่ผสมกันมาได้ถึง 25 ไร่ แต่ต้องแยกชนิดพืช จึงทำให้จำนวนตัวอย่างที่ส่งในแต่ละรายน้อย ส่งผลถึงผู้รับบริการประเภทเกษตรกรมีจำนวนตัวอย่างที่ส่งน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าจะเป็นกลุ่มที่มีจำนวนผู้รับบริการมากที่สุด

เมื่อพิจารณาตัวอย่างน้ำเปรียบเทียบระหว่างจำนวนผู้รับบริการกับจำนวนตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างกับตัวอย่างดิน จะพบว่า จำนวนผู้รับบริการที่ส่งวิเคราะห์น้ำมากที่สุด คือ เกษตรกร ซึ่งเป็นประเภทเดียวกับที่มีจำนวนตัวอย่างมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนผู้รับบริการกับจำนวนตัวอย่างของผู้รับบริการแต่ละประเภทใกล้เคียงกัน อาจจะมีอัตราส่วนแตกต่างกันบ้างในกลุ่มของ หน่วยราชการ และนิสิต/นักศึกษา ที่จะเน้นไปทางด้านงานวิจัย จึงทำให้จำนวนตัวอย่างมากกว่าในแต่ละราย

การไถพรวนดินและไถกลบพืชปุ๋ยสดตามด้วยการปลูกสับปะรด

Tillage Methods and Early maturing Green manures followed by Pineapple

อรัญญ์ ขันติยวิชย์ อุชฎา สุขจันทร์ ชูศักดิ์ สัจจพงษ์ สรรเพชญ์ อิ้มพัฒน์

ศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาการไถพรวนดินและไถกลบพืชปุ๋ยสดตามด้วยการปลูกสับปะรด ในศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จังหวัดขอนแก่น วางแผนการทดลองแบบ Split plot in RCB จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 4 ปัจจัยหลัก ได้แก่ การไถผาน 3+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไถพรวนก่อนปลูกสับปะรด (A1) การไถสิ่ว+ไถแปร 2 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวนก่อนปลูกสับปะรด (A2) การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวนก่อนปลูกสับปะรด (A3) และการไถผาน 3+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวนก่อนปลูกสับปะรด (A4) ส่วนปัจจัยรอง การปลูกพืชปุ๋ยสด ได้แก่ ปลูกถั่วพร้า (B1) ปลูกถั่วมะแฮะ (B2) และปลูกปอเทือง (B3) ทำการทดลองปลูกสับปะรดบนชุดดินสตึก ที่มีเนื้อดินบนเป็นดินทรายปนดินร่วน 1 ฤดูปลูก พบว่า กรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ทำให้มีการย่อยสลายของพืชปุ๋ยสด ทำให้ปริมาณอินทรียวัตถุในดินเพิ่มสูงขึ้น ความหนาแน่นรวมของดินลดลง มีการระบายน้ำ ถ่ายเทอากาศได้ดีขึ้น ซึ่งการไถสิ่ว (ไถเบิกดาน) โดยเฉพาะการไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) และการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้สับปะรดมีการเจริญเติบโตดี เพิ่มความยาวใบ (D-Leaf) ของต้นสับปะรด ส่งผลให้สับปะรดให้ผลผลิต เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 0.38–0.47 ตันต่อไร่

คำนำ

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ สามารถปลูกได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศ การปลูกสับปะรดของเกษตรกรภาคตะวันออกและภาคตะวันตก จะเป็นการปลูกเพื่อส่งโรงงานผลไม้กระป๋อง แต่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้น เป็นการปลูกเพื่อรับประทานผลสด

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะของดินเป็นดินร่วนทรายถึงดินทราย ดินส่วนใหญ่มีความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติค่อนข้างต่ำ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) ดินที่ทำการเกษตรติดต่อนานๆ โดยใช้รถไถและเครื่องทุ่นแรงขนาดใหญ่ มักทำให้ดินแน่นทึบเกิดชั้นดินดานต่ำกว่าชั้นไถพรวน (hard pan) ซึ่งดินดานนี้เรียกว่า plow pan ดินแห้งจะแข็ง รากพืชไม่สามารถแทงผ่านไปได้ (กอบเกียรติ, 2551) และความชื้นจากดินชั้นล่างไม่สามารถเคลื่อนที่ขึ้นสู่ดินชั้นบนได้ ทำให้ความเป็นประโยชน์ของน้ำในดินรวมทั้งธาตุอาหารพืชในดินลดลง สมภพ และคณะ (2547) พบว่าระบบไม่ไถพรวน และการไถพรวนน้อยครั้ง

รหัสโครงการวิจัย 01-08-09-01

ทำให้สมบัติทางกายภาพของดินดีขึ้น โดยทำให้ดินมีปริมาณความชื้นสูง มีอัตราการไหลซึมผ่านของน้ำ และความพรุนของดินสูงขึ้น ความหนาแน่นรวมของดินลดลง โดยเฉพาะเมื่อดินมีความลึกมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกแบบไถพรวน

มุกดา (2548) กล่าวว่า การปลูกพืชปุ๋ยสดนั้น เมื่อเจริญเติบโตถึงระยะที่พืชเริ่มออกดอก ถึงระยะดอกบานและสุกแก่ จะไถกลบลงดิน อินทรียวัตถุจากการย่อยสลาย จะแทรกอยู่ระหว่างเม็ดดิน ทำให้ดินร่วนซุยและอุ้มน้ำได้ดี จึงเป็นการช่วยปรับโครงสร้างดิน ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้มีการระบายน้ำ และถ่ายเทอากาศในดินได้ดีขึ้น

ปัจจุบันเกษตรปลูกสับปะรด โดยไม่มีการให้น้ำ และไถพรวนซ้ำซากติดต่อนานๆ ซึ่งการใช้รถไถและเครื่องทุ่นแรงขนาดใหญ่ ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพเสื่อมโทรม ผลผลิตและคุณภาพ จึงต่ำว่ามาตรฐาน มีต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมีที่สูง แต่ผลตอบแทนกลับลดต่ำลงเรื่อยๆ ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีไถพรวนดิน และการเลือกชนิดของพืชปุ๋ยสดที่เหมาะสมกับพื้นที่

วิธีดำเนินการ

วิธีการ

ทำการทดลองเปรียบเทียบการไถพรวนดินและไถกลบพืชปุ๋ยสดตามด้วยการปลูกสับปะรด ในศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร เลขที่ 117 หมู่ 14 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น บนชุดดินสตึกที่มีเนื้อดินบนเป็นดินทรายปนดินร่วน (Loamy sand: Ls) โดยปลูกแบบแถวคู่ ระยะปลูก 30x50x90 เซนติเมตร (ระยะต้น x ระยะในแถว x ระยะระหว่างแถว) ขนาดแปลงย่อย 6x6 เมตร วางแผนการทดลองแบบ Split plot in RCB ประกอบด้วย 4 ปัจจัยหลัก และ 3 ปัจจัยรอง จำนวน 4 ซ้ำ

ปัจจัยหลัก: การไถ (A) 4 แบบ ประกอบด้วย

การไถผาน 3+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไถพรวน (A1)

การไถสิ่ว (ไถเบิกดาน)+ไถแปร 2 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด (A2)

การไถสิ่ว (ไถเบิกดาน)+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด (A3)

การไถผาน 3+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด (A4)

ปัจจัยรอง: การปลูกพืชปุ๋ยสดก่อนปลูกสับปะรด (B) 3 ชนิด ประกอบด้วย

ปลูกถั่วพร้า (ไม่ต้องการผลผลิต) (B1)

ปลูกถั่วมะแฮะ (ไม่ต้องการผลผลิต) (B2)

ปลูกปอเทือง (ไม่ต้องการผลผลิต) (B3)

หมายเหตุ: ปัจจัยหลักการไถ มีการไถสิ่วที่ระดับความลึกที่ 60 เซนติเมตร (A2) และ (A3) ปลูกถั่วพร้า 50 x 50 เซนติเมตร ปลูกถั่วมะแฮะ 50 x 50 เซนติเมตร ปลูกปอเทือง โรยเป็นแถวระยะห่าง 70 เซนติเมตร โดยพืชปุ๋ย

สดทุกกรรมวิธี มีการไถกลบพืชสดในอัตรา 200 กิโลกรัมน้ำหนักสดต่อแปลงย่อย (6x6 เมตร) และไม่มีการไถพรวนก่อนปลูกสับปะรด (A2), (A3) และ (A4) แต่มีการยกร่องปลูกสับปะรดตามปกติ

การบันทึกข้อมูล มีการเก็บข้อมูลต่างๆ ดังนี้

1. มีการเก็บตัวอย่างดินก่อนไถพรวนดิน และหลังปลูกสับปะรด เพื่อหาสมบัติทางกายภาพ และเคมีของดิน

2. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของสับปะรดโดยวัดความยาวใบ (D-leaf) ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมทั้งหมดในใบสับปะรด เมื่ออายุ 4 เดือน และ 6 เดือน

3. บันทึกผลผลิตสับปะรด ชั่งน้ำหนักผลผลิตที่มีจุกและไม่มีจุก

4. บันทึกความกว้างและความยาวของผลสับปะรด เปอร์เซ็นต์น้ำตาลในผล (% Brix)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการศึกษาการไถพรวนดินและไถกลบพืชปุ๋ยสดตามด้วยการปลูกสับปะรด ในศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จังหวัดขอนแก่น บนชุดดินสตึก มีชั้นดินดานไถพรวนที่ระดับความลึก 35-45 เซนติเมตร (Plow pan) เริ่มปลูกสับปะรดวันที่ 14 พฤษภาคม 2553 เร่งดอกวันที่ 6 พฤษภาคม 2554 เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อวันที่ 30 มิถุนายน ถึงวันที่ 21 ตุลาคม 2554 สามารถรายงานผลการทดลองได้ดังนี้

1. **ผลของการไถและพืชปุ๋ยสดต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินแปลงสับปะรด**

จากการทดลองบนชุดดินสตึก ที่ระดับความลึก 3 ระดับ คือ 0-20, 20-30 และ 30-60 เซนติเมตร ความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) มีค่า 1.56, 1.65 และ 1.79 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ สัมประสิทธิ์การนำน้ำของดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ มีค่า 4.56, 2.54 และ 1.37 เซนติเมตรต่อชั่วโมง ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน มีค่า 5.23, 4.93 และ 5.05 ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน มีค่า 0.448, 0.371 และ 0.158 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ มีค่า 8.00, 10.73 และ 4.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ มีค่า 35, 13 และ 17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 1)

ปริมาณอินทรียวัตถุในดินแปลงสับปะรด ระหว่างกรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบที่ระดับความลึกเดียวกันกับดินก่อนการทดลอง การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้ปริมาณอินทรียวัตถุมีค่ามากขึ้นที่สุด เท่ากับ 0.45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ความหนาแน่นรวมของดิน ระหว่างกรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ไม่แตกต่างทางสถิติ มีค่าลดลงเมื่อเทียบที่ระดับความลึกเดียวกันกับดินก่อนการทดลอง ที่ระดับความลึก 0-30 เซนติเมตร และ 30-60 เซนติเมตร พบว่า การไถสิ่ว+ไถแปร 2 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A2) และการไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) มีค่าเฉลี่ยลดลง มากที่สุด เท่ากับ 1.56, 1.58, 1.69 และ1.69 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับ สมภพ และ คณะ (2547) พบว่า การปลูกอ้อยในสภาพดินทรายชุดสตึก แบบไม่ไถพรวนและลดการไถพรวน ทำให้ความหนาแน่นรวมของดินลดลง โดยเฉพาะเมื่อดินมีความลึกมากขึ้น เมื่อ

เปรียบเทียบกับการปลูกแบบไถพรวน การปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ค่าเฉลี่ยลดลง มากที่สุด เท่ากับ 1.57 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และ 1.68 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

กรรมวิธีการไถและชนิดของพืชปุ๋ยสด ทำให้มีการเพิ่มอินทรียวัตถุในดิน ส่งผลให้สมบัติทางกายภาพดีขึ้น ปริมาณน้ำสะสมในช่องว่างของดินเพิ่มขึ้น (วิโรจน์, 2531) อินทรียวัตถุเป็นตัวเชื่อมอนุภาคเม็ดดินให้เกาะกันเป็นโครงสร้างที่ดีมีเสถียรภาพ และทำให้ดินมีช่องว่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตของรากชอนไชได้ลึก มีการแลกเปลี่ยนก๊าซ และดูดยึดน้ำได้ดี (Hamblin, 1985)

2. ผลของการไถและพืชปุ๋ยสดต่อการเจริญเติบโตของสับปะรด

ผลของการไถและพืชปุ๋ยสดทำให้ดินแปลงปลูกสับปะรด มีอินทรียวัตถุเพิ่มขึ้น ดินโปร่งขึ้น มีการแลกเปลี่ยนก๊าซ และดูดยึดน้ำได้ดี จากการวัดการเจริญเติบโตของสับปะรด โดยวิเคราะห์หาธาตุอาหารในใบพืช เมื่ออายุ 4 เดือน และ 6 เดือน พบว่า ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ระหว่างกรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยเมื่ออายุ 4 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง 0.30–0.44 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออายุ 6 เดือน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.43–0.61 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

เมื่ออายุ 6 เดือน ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ในกรรมวิธีการไถ (A) แตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95% พบว่า การไถผาน 3+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไถพรวน (A1) ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 1.62 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างกับ การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด (A3) และการไถผาน 3+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด (A4) มีค่า เท่ากับ 1.58, 1.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ระหว่างกรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่ออายุ 4 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง 1.21–1.54 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออายุ 6 เดือน มีค่าอยู่ระหว่าง 1.27–1.80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

โดยเมื่อสับปะรดอายุได้ 4 เดือน และ 6 เดือน ความยาวใบ (D-Leaf) ของสับปะรด มีการเจริญเติบโตระหว่างกรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ไม่แตกต่างทางสถิติ การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้ความยาวใบ (D-Leaf) มีการเจริญเติบโตมากที่สุด เท่ากับ 60.91 เซนติเมตร และ 67.23 เซนติเมตร ตามลำดับ และการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้ความยาวใบ (D-Leaf) มีการเจริญเติบโตมากที่สุด เท่ากับ 60.51 เซนติเมตร และ 66.16 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

3. ผลของการไถและพืชปุ๋ยสดต่อผลผลิตและคุณภาพของสับปะรด

ผลของการไถและพืชปุ๋ยสดต่อ ผลผลิต น้ำหนักผลสับปะรดมีจุกและไม่มีจุก ความกว้างและความยาวของผลสับปะรด และส่วนเปอร์เซ็นต์น้ำตาลในผล ระหว่างกรรมวิธีการไถ (A) และชนิดของพืชปุ๋ยสด (B) ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้สับปะรดให้ผลผลิต มากที่สุด เท่ากับ 9.07 ตันต่อไร่ ส่วนการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้สับปะรดให้ผลผลิต มากที่สุด เท่ากับ 9.02 ตันต่อไร่ โดยการไถสิ่ว (ไถเบิกดาน) ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 0.38 ตันต่อไร่ และการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 0.47 ตันต่อไร่ (ตารางที่ 8)

น้ำหนักผลสับปะรดมีจุกและไม่มีจุกนั้น การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้สับปะรด มีน้ำหนักผลมีจุกและไม่มีจุก มากที่สุด เท่ากับ 1275.3, 1051.0 กรัมต่อผล ตามลำดับ และการปลูก

ปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้สับปะรด มีน้ำหนักผลมีจุกและไม่มีจุก มากที่สุด เท่ากับ 1267.8, 1040.2 กรัมต่อผล ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ส่วนความกว้างและความยาวของผลสับปะรด การไถสิ่ว+ไถแปร 2 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A2) ทำให้สับปะรดความกว้างและความยาว มากที่สุด เท่ากับ 11.63, 13.48 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

สุดท้ายเปอร์เซ็นต์น้ำตาลในผลสับปะรดนั้น การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้สับปะรด มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลมากที่สุดเท่ากับ 18.26 เปอร์เซ็นต์ และการปลูกถั่วพร้าเป็นปุ๋ยพืชสด (B1) ทำให้สับปะรดมีเปอร์เซ็นต์น้ำตาล มากที่สุด เท่ากับ 18.26 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการไถและพืชปุ๋ยสดทำให้สมบัติทางกายภาพดีขึ้น ทั้งนี้พบว่า การไถสิ่ว (ไถเบิกดาน) ทำให้ความหนาแน่นรวมของดินลดลง และปริมาณอินทรียวัตถุเพิ่มขึ้น ระดับต่ำมาก

2. ผลการไถและพืชปุ๋ยสดต่อการเจริญเติบโตของสับปะรด ทำปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ในใบสับปะรด เปลี่ยนแปลงในทิศทางที่ดีขึ้น การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้สับปะรด เมื่ออายุได้ 4 เดือน และ 6 เดือน มีความยาวใบ (D-Leaf) เจริญเติบโต มากที่สุด เท่ากับ 60.91 เซนติเมตร และ 67.23 เซนติเมตร และการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้ความยาวใบ (D-Leaf) เจริญเติบโตมากที่สุดเท่ากับ 60.51 เซนติเมตร และ 66.16 เซนติเมตร

3. การไถสิ่ว+ไถแปร 1 ครั้ง ก่อนปลูกพืชปุ๋ยสด+ไม่ไถพรวน (A3) ทำให้สับปะรดให้ผลผลิต มากที่สุด มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.07 ตันต่อไร่ ส่วนการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้สับปะรดให้ผลผลิตมากที่สุด เท่ากับ 9.02 ตันต่อไร่ และการไถสิ่ว (ไถเบิกดาน) ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 0.38 ตันต่อไร่ และการปลูกปอเทืองเป็นปุ๋ยพืชสด (B3) ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 0.47 ตันต่อไร่

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถแนะนำผลงานวิจัยนี้ให้เกษตรกรผู้ปลูกสับปะรด นำไปปรับใช้ให้เหมาะสมกับพื้นที่ที่ประสบปัญหาชั้นดินดานไถพรวน ให้ได้ผลผลิตสูง

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2550. ***คู่มือการสำรวจดิน***. ส่วนมาตรฐานการสำรวจจำแนกดินและที่ดิน สำนักสำรวจและวางแผนที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 49 หน้า.

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2551. **การจัดการดินและน้ำเพื่อผลิตมันสำปะหลัง**. หน้า 82. *ใน*: สัมมนาวิชาการ การจัดการความรู้ด้านความสัมพันธ์ระหว่างดินและน้ำเพื่อการผลิตพืช. กรมวิชาการเกษตร.

มุกดา สุขสวัสดิ์. 2548. ***ชุดคู่มือการเกษตรปุ๋ยอินทรีย์***.พิมพ์ครั้งที่ 5. สายธุรกิจโรงพิมพ์: กรุงเทพฯ. วิโรจน์ อิ่มพิทักษ์. 2531. ***การจัดการดิน***. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมภพ จงรวยทรัพย์ อนุสรณ์ เทียนศิริฤกษ์ พัชรินทร์ นามวงษ์. 2547. ศึกษาระบบไถพรวนดินต่อสมบัติทางกายภาพของดินปลูกอ้อย. **วารสารวิชาการเกษตร** ปีที่ 22 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน. หน้า 49-64.

Hamblin, A.P. 1985. The influence of soil structure on water movement, crop root growth, and Water ptake. **Adv. Agron.** 95-157.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. สมบัติทางเคมีและกายภาพของชุดดินสตึกก่อนการทดลอง ที่แปลงทดลอง ศูนย์วิจัยฯ จังหวัดขอนแก่น

ระดับความลึกของดิน (ซม.)	ความหนาแน่นรวมของดิน (กรัม/ลบ.ซม.)	สัมประสิทธิ์การนำน้ำของดิน (ซม./ชม.)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ปริมาณอินทรียวัตถุ (%)	ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (มก./กก)	ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก)
0-20	1.56	4.56	5.23	0.448	8.00	35
20-30	1.65	2.54	4.96	0.371	10.73	13
30-60	1.79	1.37	5.05	0.158	4.31	17

ตารางที่ 2. ปริมาณอินทรียวัตถุในดินแปลงสับปะรด ที่ระดับความลึก 30 ซม. และ 60 ซม. (%)

การไถและพืชปุ๋ยสด	ความลึก 30 เซนติเมตร				ความลึก 60 เซนติเมตร			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	0.38	0.45	0.46	0.43a	0.45	0.38	0.47	0.43a
(A2)	0.42	0.35	0.47	0.41a	0.44	0.49	0.43	0.45a
(A3)	0.46	0.46	0.44	0.45a	0.48	0.45	0.43	0.45a
(A4)	0.47	0.45	0.43	0.45a	0.44	0.42	0.47	0.44a
ค่าเฉลี่ย (B)	0.43a[1/]	0.43a	0.45a		0.45a	0.44a	0.45a	

ปริมาณอินทรียวัตถุที่ระดับความลึก 30 ซม. C.V. การไถ (A) = 16.58 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 16.68 %

ปริมาณอินทรียวัตถุที่ระดับความลึก 60 ซม C.V. การไถ (A) = 16.44 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 17.85 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 3. ความหนาแน่นรวมของดินแปลงสับปะรด ที่ระดับความลึก 30 ซม. และ 60 ซม. (กรัม/ลบ.ซม.)

การไถและพืชปุ๋ยสด	ความลึก 30 เซนติเมตร				ความลึก 60 เซนติเมตร			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	1.61	1.57	1.56	1.59a	1.70	1.72	1.67	1.71a
(A2)	1.59	1.56	1.53	1.56a	1.67	1.72	1.68	1.69a
(A3)	1.59	1.60	1.54	1.58a	1.73	1.67	1.66	1.69a
(A4)	1.61	1.58	1.64	1.61a	1.76	1.72	1.73	1.73a
ค่าเฉลี่ย (B)	1.60a[1/]	1.58a	1.57a		1.71a	1.71a	1.68a	

ความหนาแน่นรวมของดินที่ระดับความลึก 30 ซม. C.V. การไถ (A) = 3.93 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 3.25 %

ความหนาแน่นรวมของดินที่ระดับความลึก 60 ซม C.V. การไถ (A) = 4.74 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 3.41 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 4. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในใบสับปะรด อายุ 4 เดือน และ 6 เดือน (%)

การไถและพืชปุ๋ยสด	อายุ 4 เดือน				อายุ 6 เดือน			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	0.365	0.341	0.367	0.358a	0.482	0.464	0.490	0.479a
(A2)	0.399	0.366	0.345	0.370a	0.433	0.587	0.610	0.543a
(A3)	0.437	0.389	0.395	0.407a	0.551	0.578	0.583	0.570a
(A4)	0.387	0.299	0.371	0.352a	0.574	0.598	0.598	0.590a
ค่าเฉลี่ย (B)	0.397a[1/]	0.349a	0.370a		0.510a	.557a	0.570a	

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 4 เดือน C.V. การไถ (A) = 19.55 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 19.96 %

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 6 เดือน C.V. การไถ (A) = 36.50 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 15.97 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 5. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในใบสับปะรด อายุ 4 เดือน และ 6 เดือน (%)

การไถและพืชปุ๋ยสด	อายุ 4 เดือน				อายุ 6 เดือน			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	2.13	2.11	2.24	2.16a	1.59	1.63	1.65	1.62a
(A2)	2.10	2.17	2.17	2.15a	1.40	1.45	1.47	1.44b
(A3)	2.14	2.11	2.12	2.12a	1.54	1.51	1.69	1.58ab
(A4)	2.22	2.20	2.18	2.20a	1.60	1.60	1.59	1.59ab
ค่าเฉลี่ย (B)	2.15a[1/]	2.15a	2.18a		1.53a	1.55a	1.60a	

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 4 เดือน C.V. การไถ (A) = 3.95 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 6.66 %

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 6 เดือน C.V. การไถ (A) = 11.94 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 9.86 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 6. ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในใบสับปะรด อายุ 4 เดือน และ 6 เดือน (%)

การไถและพืชปุ๋ยสด	อายุ 4 เดือน				อายุ 6 เดือน			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	1.44	1.36	1.44	1.41a	1.57	1.61	1.51	1.56a
(A2)	1.21	1.31	1.41	1.31a	1.53	1.47	1.32	1.44a
(A3)	1.64	1.40	1.46	1.50a	1.41	1.80	1.66	1.62a
(A4)	1.54	1.41	1.39	1.44a	1.35	1.55	1.27	1.39a
ค่าเฉลี่ย (B)	1.46a[1/]	1.37a	1.42a		1.47a	1.61a	1.44a	

ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด 4 เดือน C.V. การไถ (A) = 16.90 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 10.88 %

ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด 6 เดือน C.V. การไถ (A) = 26.22 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 22.79 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 7. ความยาวใบ (D-Leaf) ของสับปะรด อายุ 4 เดือน และ 6 เดือน (ซม.)

การไถและพืชปุ๋ยสด	อายุ 4 เดือน				อายุ 6 เดือน			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	61.42	59.06	59.32	59.93a	65.12	63.92	63.51	64.18a
(A2)	59.28	58.48	60.44	59.40a	64.94	64.86	66.38	65.40a
(A3)	63.13	57.67	61.93	60.91a	68.45	64.01	69.22	67.23a
(A4)	57.20	59.82	60.38	59.13a	61.70	64.90	65.55	64.04a
ค่าเฉลี่ย (B)	60.26a[1/]	58.76a	60.51a		65.05a	64.42a	66.16a	

ความยาวใบ (D-Leaf) 4 เดือน C.V. การไถ (A) = 7.28 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 4.77 %

ความยาวใบ (D-Leaf) 6 เดือน C.V. การไถ (A) = 8.48 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 3.77 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 8. ผลผลิตสับปะรด (ตัน/ไร่)

การไถและพืชปุ๋ยสด	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	8.95	8.57	8.55	8.69a
(A2)	8.81	8.93	9.38	9.04a
(A3)	9.26	8.44	9.50	9.07a
(A4)	8.12	8.94	8.64	8.56a
ค่าเฉลี่ย (B)	8.78a[1/]	8.72a	9.02a	

C.V. การไถ (A) = 10.02 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 7.83 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 9. น้ำหนักผลสับปะรดมีจุก และไม่มีจุก (กรัม/ผล)

การไถและพืชปุ๋ยสด	น้ำหนักผลมีจุก				น้ำหนักผลไม่มีจุก			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	1258.3	1205.0	1201.8	1221.7a	1047.4	988.9	985.6	1007.3a
(A2)	1238.2	1255.0	1318.6	1270.6a	1021.6	1027.5	1075.2	1041.4a
(A3)	1302.3	1187.1	1336.4	1275.3a	1075.3	971.9	1105.8	1051.0a
(A4)	1141.0	1256.6	1214.6	1204.1a	928.4	1041.3	994.2	988.0a
ค่าเฉลี่ย (B)	1234.9a[1/]	1225.9a	1267.8a		1018.2a	1007.4a	1040.2a	

น้ำหนักผลสับปะรดมีจุก C.V. การไถ (A) = 10.01 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 7.82 %

น้ำหนักผลสับปะรดไม่มีจุก C.V. การไถ (A) = 13.05 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 8.69 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 10. ความกว้างและความยาวของผลสับปะรด (ซม.)

การไถและพืชปุ๋ยสด	ความกว้าง				ความยาว			
	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	11.50	11.23	11.25	11.33a	13.45	13.13	13.15	13.24a
(A2)	11.38	11.95	11.58	11.63a	13.35	13.48	13.60	13.48a
(A3)	11.60	11.30	11.65	11.51a	13.58	12.95	13.78	13.43a
(A4)	11.10	11.90	11.25	11.42a	12.88	13.58	13.33	13.29a
ค่าเฉลี่ย (B)	11.39a[1/]	11.59a	11.43a		13.31a	13.28a	13.46a	

ความกว้าง C.V. การไถ (A) = 3.63 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 5.07 %

ความยาว C.V. การไถ (A) = 5.95 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 4.11 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD

ตารางที่ 11. เปอร์เซ็นต์น้ำตาลในผลสับปะรด (% Brix)

การไถและพืชปุ๋ยสด	พืชปุ๋ยสด (B)			ค่าเฉลี่ย
	(B1)	(B2)	(B3)	(A)
(A1)	17.50	17.78	18.13	17.80a
(A2)	17.48	17.60	17.35	17.48a
(A3)	19.93	17.48	17.38	18.26a
(A4)	18.15	17.23	17.93	17.78a
ค่าเฉลี่ย (B)	18.26a[1/]	17.53a	17.69a	

C.V. การไถ (A) = 5.77 % C.V. พืชปุ๋ยสด (B) = 8.01 %

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งและแนวนอนที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 95% โดยวิธี LSD


multi EA

