การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ในผัก

Method Development of Cyproconazole, Hexaconazole, Propiconazole, Tebuconazole and Tetraconazole Residue Analysis in Vegetables

ยงยุทธ ไผ่แก้ว *น้ำเย็น ศิริพัฒน์* *ประภัสสรา พิมพ์พันธุ์*

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

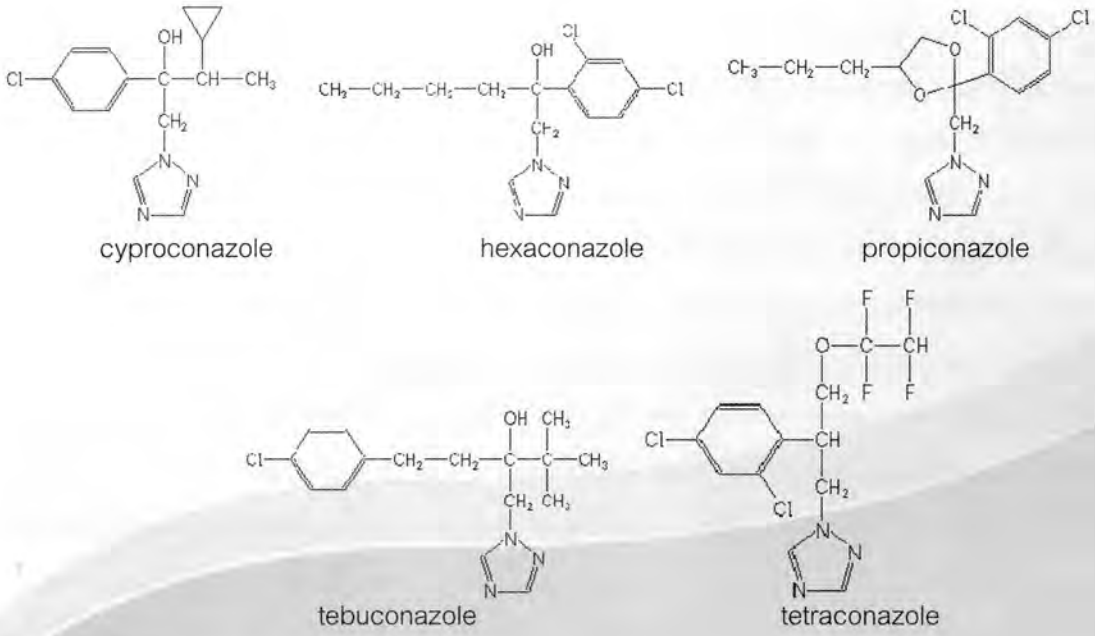
การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ในผักชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วฝักยาว ผักกาดขาว กะหล่ำปลี และพริก สามารถใช้วิธีการของ Navarro *et al* (2002) หรือ Nguyen *et al* (2008) หรือดัดแปลงวิธีการของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 TM-T04-R02 โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ GC-ECD ได้สารกลับคืนในช่วงร้อยละ 41.7–133.2, 77.1–106.6 และ 79.6–109.7 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 – 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ ต้องมีการบำรุงรักษาเครื่อง GC-ECD ในทุก Batch ที่ทดลอง จึงจะตรวจวัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำนำ

การผลิตพืชอาหารในปัจจุบันมักพึ่งพาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นหลัก เพื่อการผลิตพืชให้มากพอกับตามความต้องการของมนุษย์ แต่วัตถุมีพิษการเกษตรเหล่านี้ทำให้เกิดสารพิษตกค้างในพืช และสร้างปัญหาให้กับการค้าพืชผลเกษตรในตลาดการค้าเสรี วิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อให้รู้ถึงคุณภาพของผลผลิตจึงต้องมีการพัฒนาโดยเร่งด่วน กอร์ปกับองค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติที่จัดตั้งคณะกรรมการ Codex ได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (MRL) ขึ้น รวมทั้งประเทศคู่ค้าก็ได้กำหนดค่า MRL ขึ้น บังคับใช้ควบคุมดูแลเพื่อความปลอดภัยของอาหาร ค่า MRL เหล่านี้นับวันจะมีค่าต่ำลง จึงต้องมีวิธีทดสอบที่ตอบสนองความต้องการ และยังคงมีความเฉพาะและมีความไวต่อสารที่จะวิเคราะห์ วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ดีจึงควรเป็นวิธีการวิเคราะห์แบบรวม (Multi-residue method) หรือการวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้หลายชนิดจากการสกัดตัวอย่างเพียงครั้งเดียว (Fodor-Csorba, 1992) อย่างไรก็ตามวิธีการอาจต้องปรับเปลี่ยนไปตามคุณสมบัติของสารพิษและตัวอย่างพืชที่วิเคราะห์ ให้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี ทั้งนี้ ยังต้องให้ผลที่มีความถูกต้อง แม่นยำและเชื่อถือได้ (Anonymous, 1998) เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมากในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ตั้งแต่ปี 1952 ใช้เทคนิค Paper Chromatography ต่อมาเริ่มใช้เทคนิค Gas Liquid Chromatography ในปี 1959 และสามารถวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้มากชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว (Zweig, 1964) เทคนิคดังกล่าวมีการใช้กันมากขึ้นจนถึงปัจจุบันนี้

มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกันอย่างมาก วิธีการวิเคราะห์แบบรวมโดยการสกัดตัวอย่างเพียงครั้งเดียว ไม่เฉพาะสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมท และไพรีทรอยด์เท่านั้น วิธีการสำหรับตรวจสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม triazine หรือ thiocarbamate และสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชหลายชนิด ก็มีการพัฒนาหาวิธีการที่เหมาะสมกันมากเพื่อการตรวจสอบรับรองคุณภาพของผลิตผลเกษตร (Fodor-Csorba, 1992) กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้ปรับปรุงและได้ขอรับรองวิธีการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ไปแล้วนั้น ใช้ได้ผลดีกับสารที่เป็น non-polar ส่วนสารที่เป็น polar เล็กน้อย จะเป็นปัญหากับประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบรวมสำหรับสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช ที่ใช้ในการผลิตพืชในประเทศไทย เพื่อสร้างมาตรฐานและขยายขอบข่ายการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชให้ครอบคลุมสารเคมีที่ใช้ให้มากที่สุด เพื่อการยอมรับสินค้าเกษตรของไทยทั้งเพื่อการบริโภคภายในประเทศและการค้าในประชาคมโลก

สารพิษตกค้างที่ทำการทดลองเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช (fungicides) กลุ่ม conazole fungicides หรือ triazoles จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ทุกสารจะประกอบด้วยกลุ่ม triazole ($C_2H_3N_3$) เป็น benzonitrile และมีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ แต่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันบ้าง (Wood, 2010) ดังแสดงในภาพที่ 1 มีชื่อทางเคมี รหัสที่ขึ้นทะเบียนสากล และสูตรโมเลกุล แสดงไว้ในตารางที่ 1 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา (2544) ได้แนะนำให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช เช่น โรคใบจุดสีดำ โรคราสนิมขาว และโรคราแป้งในไม้ดอกไม้ประดับ โรคกาบใบเน่าและโรคเมล็ดด่างในข้าว โรคเน่าดำในถั่วเขียว โรคลำต้นเน่าในถั่วลิสง โรคแส้ดำและโรคกลิ่นสับปะรดในอ้อย เป็นต้น สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2553) ได้รายงานว่า มีการนำเข้าสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชทั้ง 5 ชนิดนี้ ช่วงปี 2548-2552 ในปริมาณรวม 853,860 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 424 ล้านบาท



ภาพที่ 1. สูตรโครงสร้างของสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช 5 ชนิด ที่ทดสอบ (Wood, 2010)

ตารางที่ 1. ชื่อทางเคมี รหัสที่ขึ้นทะเบียนสากล และสูตรโมเลกุล ของสารพิษที่ทดลอง

สารพิษ	ชื่อตาม IUPAC	เลขทะเบียนสากล	สูตรโมเลกุล
cyproconazole	(2*RS*,3*RS*;2*RS*,3*SR*)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol	94361-06-5	$C_{15}H_{18}ClN_3O$
hexaconazole	(*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol	79983-71-4	$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$
propiconazole	(2*RS*,4*RS*;2*RS*,4*SR*)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1*H*-1,2,4-triazole	60207-90-1	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$
tebuconazole	(*RS*)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol	107534-96-3	$C_{16}H_{22}ClN_3O$
tetraconazole	(*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propyl 1,1,2,2-tetrafluoroethyl ether	112281-77-3	$C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$

ที่มา : Wood (2010)

วิธีการวิเคราะห์แบบรวมโดยการสกัดตัวอย่างเพียงครั้งเดียว สำหรับสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช กลุ่ม conazole fungicides มีผู้ศึกษากันมากแต่ยังคงต้องมีการพัฒนาหาวิธีที่เหมาะสม Navarro *et.al.* (2002), Anastassiades และ Lehotay (2003), Rissato *et.al.* (2005), Nguyen *et.al.* (2008) และ Banerjee *et.al.* (2009) ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบรวมโดยการสกัดตัวอย่างเพียงครั้งเดียว แต่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้อยู่ในตัวทำละลาย มีการกำจัดสิ่งเจือปนที่ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างพืช Navarro *et.al.* (2000) สกัดตัวอย่างองุ่นด้วย acetone และ dichloromethane แล้วกรองโดยไม่มีการกำจัดสิ่งเจือปน วิเคราะห์ hexaconazole ได้สารกลับคืนร้อยละ 87.3 และ 97 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากนั้น Navarro *et.al.* (2002) ได้ใช้วิธีเดียวกันนี้ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักผลไม้ เช่น ส้ม แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และแครอท เป็นต้น ได้สารกลับคืนร้อยละ 62-102 ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 – 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม Anastassiades และ Lehotay (2003) มีการกำจัดสิ่งเจือปนประเภท polar หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ สี และน้ำตาล เป็นต้น ด้วย dispersive solid-phase extraction โดยการเติม magnesium sulfate และ PSA (primary secondary amine) ลงไปในตัวอย่างที่สกัดด้วย acetonitrile ได้สารกลับคืนร้อยละ 85-101 ส่วนใหญ่อยู่ที่ร้อยละ 95 โดยเฉพาะสารพิษตกค้างที่เป็น non-polar เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS ส่วน Rissato *et.al.* (2005) ได้ใช้ SFE (super critical fluid extraction) ในการสกัดและกำจัดสิ่งเจือปนในบรรยากาศที่ความดัน 400 bar โดยใช้ methanol ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผ่านคอลัมน์ C-18 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.04 – 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้สารกลับคืนร้องละ 70 – 97 และ detection limit ต่ำกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-ECD สำหรับ Nguyen *et.al.* (2008) ชาวเกาหลีใต้ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบรวมสำหรับหาสารพิษตกค้าง 156 ชนิดในแตงโม ด้วย acetonitrile และ dispersive

solid-phase extraction ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 – 0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้ววิเคราะห์ด้วย GC-MS ได้สารกลับคืนร้องละ 70 – 121 มีค่าความแปรปรวน 17% และหาค่า LOQ (limit of quantitation) อยู่ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานสารพิษในอาหารของประเทศเกาหลีใต้ ส่วน Banerjee *et.al.* (2009) จากสถาบัน National Research Centre for Grapes ของประเทศอินเดีย ได้วิเคราะห์ด้วย LC-MS-MS สามารถวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้ต่ำสุดที่ระดับ 2.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือ 0.0025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีนี้ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องมือหลายชนิดขึ้นกับทรัพยากรที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ และความชำนาญของผู้ทดสอบ ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาค ได้ติดตั้งเครื่อง GC-ECD/FPD/NPD และมีความชำนาญในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างมาเป็นเวลานานแล้ว การวิเคราะห์สารพิษตกค้างประเภทสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชกลุ่ม triazoles นี้ เนื่องจากมีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถวิเคราะห์ด้วย GC-ECD ได้ การเตรียมตัวอย่างที่ต้องพัฒนาวิธีการให้เหมาะสมโดยใช้สารเคมีที่เป็นพิษน้อยและสิ่งอำนวยความสะดวกที่มีอยู่จึงมีความสำคัญ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำและง่ายต่อการปฏิบัติงาน สามารถตรวจสอบรับรองสารพิษตกค้างได้มากขึ้น ทั้งยังช่วยลดงบประมาณและเวลาของเจ้าหน้าที่ได้อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

1. จัดเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์

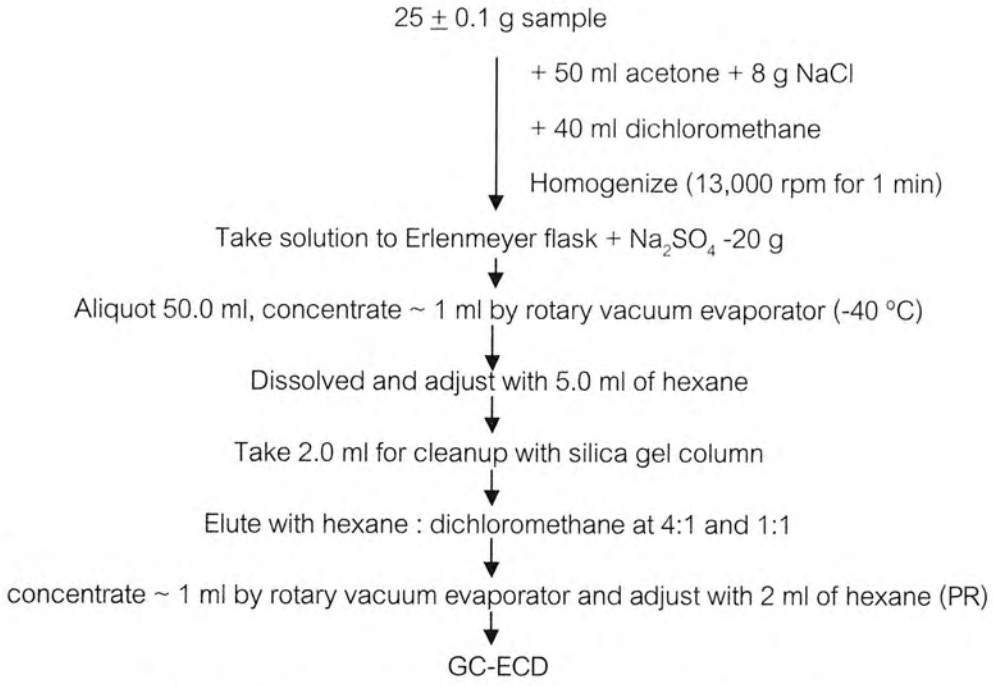
สารเคมี ได้แก่ cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole จาก Dr.Ehrenstorfer GmbH ความบริสุทธิ์ 96.5 – 99.5% ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ acetone, A.R. grade; dichloromethane, A.R. grade; acetonitrile, A.R. grade; hexane, P.R. grade; sodium sulfate anhydrous, A.R. grade; sodium chloride, A.R. grade; magnesium sulfate, A.R. grade; PSA และ graphite carbon

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างพร้อมฝา ขนาด 250 มิลลิลิตร เครื่องชั่งชนิด 2 และ 4 ตำแหน่ง ที่ได้รับการสอบเทียบแล้ว กรวยกรองทำด้วยแก้ว Cylinder ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดก้นแบน (flat bottom flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดปรับปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ได้รับการสอบเทียบแล้ว เครื่องสกัดความเร็วสูง (Homogenizer) Ultra Turrax รุ่น T 25 Basic หัวจ่ายสารละลาย (Dispenser) ขนาด 1 – 50 มิลลิลิตร Auto-pipette ขนาด 100 – 1,000 ไมโครลิตร ปิเปต ขนาด 1-10 มิลลิลิตร ที่ได้รับการสอบเทียบแล้ว เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) Vials สำหรับบรรจุตัวอย่างเข้าเครื่อง GC และเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างชนิด Gas Chromatograph (GC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890 มีหัวตรวจวัดชนิด Electron Captured Detector (ECD)

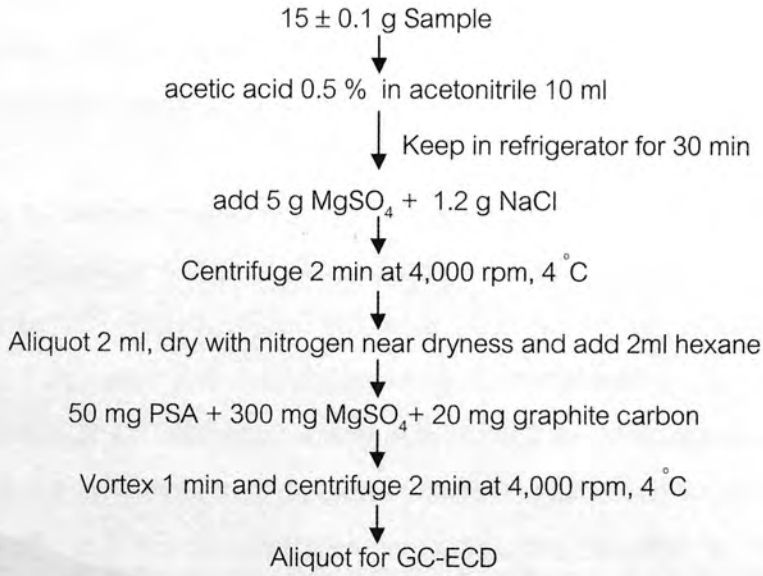
2. วิธีการ

พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ในผัก โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟชนิด GC-ECD ด้วยวิธีการทดสอบหาปริมาณสารพิษตกค้าง ของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้างที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างแบบรวม (Multiresidue Analysis) (ดังแสดงในภาพที่ 2) จากนั้นจึง

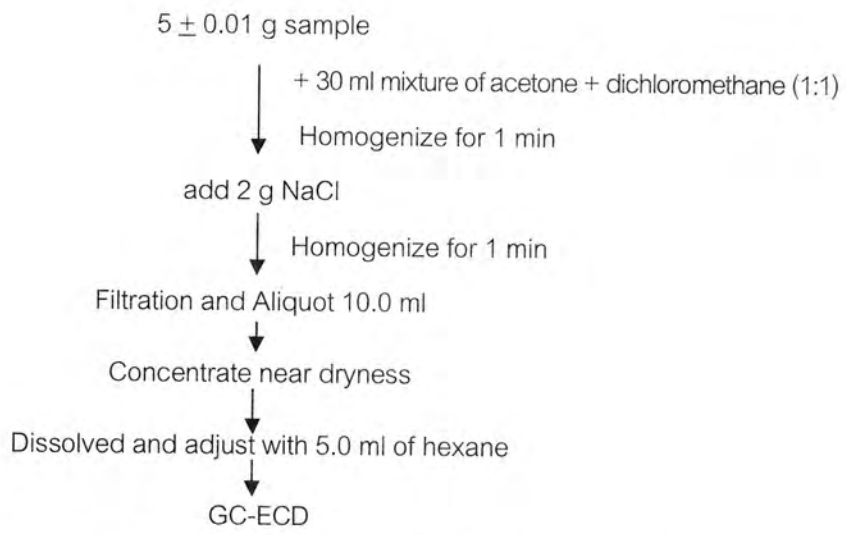
ดำเนินการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชตามวิธีการของ Nguyen *et.al.* (2008) (ภาพที่ 3) และวิธีการของ Navarro *et.al.* (2000) (ภาพที่ 4) บันทึกผล %Recovery แล้วนำทุกวิธีการเปรียบเทียบกัน



ภาพที่ 2. วิธีการวิเคราะห์แบบ Multi-residues ตาม TM-T04-R03 ที่ทำการทดสอบ



ภาพที่ 3. วิธีการวิเคราะห์แบบ Multi-residues ของ Nguyen *et.al.* (2008)



ภาพที่ 4. วิธีการวิเคราะห์แบบ Multi-residues ของ Navarro *et.al.* (2002)

3. การเตรียมสารมาตรฐานและ GC-ECD

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock solution โดยผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชทั้ง 5 ชนิดให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ isooctane (PR) เป็นตัวทำละลาย เตรียม Intermediate solution ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม Working stock solution ที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียม Working solution โดยดูด Working stock solution แล้วเจือจางด้วย hexane (PR) ให้ได้สารละลายมาตรฐานสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายมาตรฐานสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชไปวิเคราะห์แล้วสร้าง calibration curve วิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างในตัวอย่างพืชที่ความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชที่ระดับ 0.05, 0.2 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC) โดยมีสภาวะการใช้งานดังนี้

Column : HP-Ultra 1, 0.17μm thickness, 25m length, 0.32mm.id.

Temperature: injector 260°C, detector 300°C, oven temperature program ดังนี้
: 120°C (1 min) ⟶ 20°C/min 220°C (2 min) ⟶
1°C/min 230°C (3 min) ⟶ 10°C/min 250°C (3 min)

Inject mode : splitless **Carrier gas** : helium, flow rate 2 ml/min

Make up gas : nitrogen, flow rate 60 ml/min

Injection volume : 1 μl

4. การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

คำนวณปริมาณสารพิษตกค้าง โดยวัดค่า retention time ของพีค นำไปเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน พีคของสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในสารละลายตัวอย่าง ต้องมี retention time เท่ากับสารละลายมาตรฐานหรือมีการเคลื่อนไปจากเดิมไม่เกินร้อยละ 5 ของ retention time คำนวณความเข้มข้นของสารพิษตกค้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในสารละลายตัวอย่าง ด้วยฟังก์ชั่น ESTD (External Standard) คำนวณโดยโปรแกรมสำเร็จรูปในเครื่อง GC ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับ Calibration curve ที่มีค่า Correlation ไม่น้อยกว่า 0.99 หาความเข้มข้นของสารในตัวอย่างตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$C_{sample} = C_{calib.} \times V_{sample} \times F / W_{sample}$$

โดยที่ C_{sample} = ความเข้มข้นของสารพิษในสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

$C_{calib.}$ = ความเข้มข้นของสารพิษในสารละลายตัวอย่าง ที่ได้จากการเทียบ Calibration curve ใน GC Report (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ดังนี้

$$C_{calib.} = \frac{\text{Area of sample x Conc. of Standard}}{\text{Area of Standard}}$$

V_{sample} = ปริมาตรที่ปรับครั้งสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างก่อนการฉีด

W_{sample} = น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาสกัด

F = Correction Factor ขึ้นกับวิธีการการสกัด

5. การวิเคราะห์และประเมินผลข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ หาค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของข้อมูล นำผลการวิเคราะห์ทั้งหมดมาสรุปข้อมูลช่วงความเข้มข้นของสารพิษตกค้างที่ตรวจวิเคราะห์ได้ เปรียบเทียบวิธีการและชนิดของตัวอย่างพืช

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด) ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553

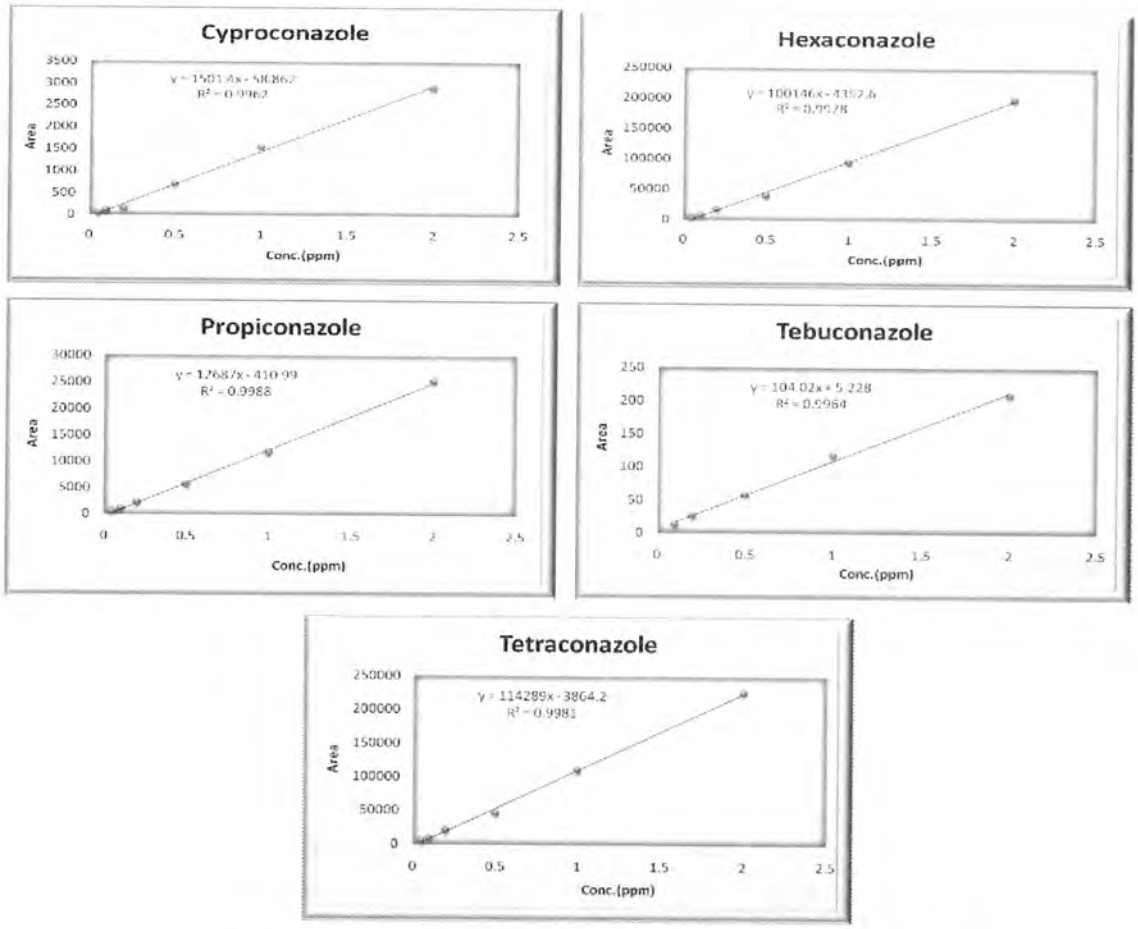
สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ช่วงความเข้มข้นที่ตรวจวิเคราะห์

วิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ได้แก่ 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามี retention time ดังนี้ คือ 6.266, 7.093, 7.516, 8.452, 8.594 และ 8.882 นาที ของสาร tetraconazole, hexaconazole, cyproconazole, propiconazole และ tebuconazole ตามลำดับ โดยที่สาร propiconazole มี 2 พีคที่ 8.452 และ 8.594 นาที จากนั้นจึงนำพื้นที่ใต้พีคในแต่ละความเข้มข้น มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ ได้สมการเส้นตรงที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยมี Correlation (R^2) มากกว่า 0.99 ทุกสารที่ทำการทดสอบ (ดังแสดงในภาพที่ 5)



ภาพที่ 5. สมการเส้นตรงของสารป้องกันกำจัดโรคพืช ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ

2. ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์

ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดโรคพืช ด้วยวิธี TM-T04-R03 กวพ. พบว่ามีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ อยู่ในช่วงร้อยละ 0 – 20 เท่านั้น โดยผักที่ทดลองได้แก่ ถั่วฝักยาว ผักกาดขาว กะหล่ำปลี และพริก ขั้นตอน Cleanup ด้วยคอลัมน์ silica gel และชะด้วยสารละลายผสม hexane และ dichloromethane น่าจะทำให้สารพิษตกค้างเหล่านี้ค้างอยู่ในคอลัมน์ ทำให้ตรวจพบสารกลับคืนได้น้อยมาก แต่วิธีการสกัดสารพิษตกค้างที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย acetone และ dichloromethane น่าจะยังคงมีความเหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบวิธีการกับ Nguyen *et.al.* (2008) จากนั้นจึงทำการทดลองสกัด ด้วยวิธีการ TM-T04-R02 กวพ. ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์คาร์บาเมต โดยการเติม magnesium sulfate, PSA และ graphite carbon เพื่อกำจัดสารอินทรีย์อื่นๆ เขย่าด้วยเครื่อง Centrifuge แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดโรคพืช 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก TM-T04-R02

ชื่อสารพิษ	ปริมาณสารพิษตกค้าง (mg/kg)							Ave.	SD	%CV
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 6	Rep 7			
ถั่วฝักยาว										
cyproconazole	102.3	100.5	105.1	124.4	118.3	121.0	103.2	110.7	10.11	9.1
hexaconazole	75.4	61.1	69.8	85.3	76.9	67.2	104.3	77.1	14.24	18.5
propiconazole	82.7	79.3	80.6	99.2	89.6	83.4	90.3	86.4	7.02	8.1
tebuconazole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	-
tetraconazole	79.7	66.0	76.4	86.9	76.0	70.7	107.2	80.4	13.53	16.8
ผักกาดขาว										
cyproconazole	138.0	68.2	118.3	125.4	64.3	177.8	160.3	121.8	42.97	35.3
hexaconazole	93.0	95.1	103.3	101.2	105.5	217.2	114.2	118.5	44.08	37.2
propiconazole	108.4	103.0	120.5	111.1	121.4	215.6	152.3	133.2	39.73	29.8
tebuconazole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	-
tetraconazole	110.8	107.7	114.7	106.3	122.3	230.4	125.4	131.1	44.36	33.8
กะหล่ำปลี										
cyproconazole	80.0	99.8	104.1	73.0	111.0	108.2	81.0	93.9	15.45	16.5
hexaconazole	39.4	45.6	47.1	39.8	40.1	42.6	37.2	41.7	3.59	8.6
propiconazole	99.1	104.9	106.0	115.5	101.0	104.3	97.6	104.1	5.95	5.7
tebuconazole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	-
tetraconazole	49.0	53.7	54.6	52.3	46.7	52.3	47.2	50.8	3.19	6.3
พริก										
cyproconazole	70.2	60.6	71.2	65.0	62.1	55.6	58.6	63.3	5.82	9.2
hexaconazole	73.2	64.3	72.8	62.3	72.4	66.3	65.8	68.1	4.55	6.7
propiconazole	78.2	63.7	53.2	91.0	54.8	72.6	85.3	71.3	14.65	20.6
tebuconazole	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	-
tetraconazole	107.5	109.4	105.4	107.7	105.6	95.6	91.1	103.2	6.98	6.8

จากการทดลองพบว่า ไม่สามารถวิเคราะห์สารพิษตกค้าง tebuconazole สำหรับ %recovery ของถั่วฝักยาว อยู่ในช่วงร้อยละ 80.4 – 110.7 ส่วนผักกาดขาว และกะหล่ำปลี อยู่ระหว่างร้อยละ 41.7 – 133.2 เนื่องจากในผักกาดขาวและกะหล่ำปลีมีสารซัลเฟอร์รบกวนการวิเคราะห์ ทำให้ผลการทดลองมีความแปรปรวนสูง สำหรับพริกเป็นพืชที่มีสารอินทรีย์อื่นรบกวนมาก มีเพียง tetraconazole ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากนั้นจึงทำการทดลองสกัดเฉพาะตัวอย่างพริก ตามวิธีการของ Nguyen *et.al.* (2008) พบว่าสามารถวิเคราะห์ % recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (70 – 110%) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นสาร propiconazole ที่ระดับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ได้ 68.2% ส่วนสาร tebuconazole ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ (ดังแสดงในตารางที่ 3)

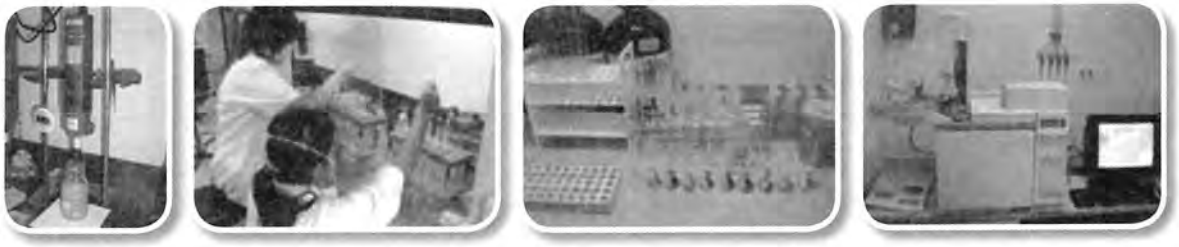
ตารางที่ 3. ประสิทธิภาพของการสกัดสารพิษตกค้าง 5 ชนิดในพริก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามวิธีการของ Nguyen *et.al.* (2008)

สารพิษ	Conc.	1	2	3	4	5	Ave.	SD	%CV
cyproconazole	0.2	70.2	60.6	71.2	65.0	62.1	78.3	14.44	18.4
	0.2	88.5	91.6	98.7	95.9	79.2			
	0.4	70.4	78.3	75.0	94.5	89.1	81.5	10.03	12.3
hexaconazole	0.02	104.6	107.4	94.5	107.3	76.5	98.1	13.16	13.4
	0.04	119.0	90.1	112.6	109.0	102.5	106.6	11.02	10.3
	0.2	70.6	92.0	94.2	87.8	93.0	80.2	10.06	12.5
	0.2	73.2	74.3	72.8	72.3	72.4			
propiconazole	0.02	78.2	63.7	53.2	91.0	54.8	68.2	16.14	23.7
	0.2	71.0	80.8	84.6	73.9	73.0	77.1	5.63	7.3
	0.2	78.2	87.8	73.5	72.4	76.5			
tebuconazole	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
tetraconazole	0.02	94.3	86.5	90.6	87.9	86.1	89.1	3.40	3.8
	0.04	93.3	71.0	70.1	95.6	78.7	81.7	12.09	14.8
	0.2	107.5	109.4	105.4	107.7	105.6	99.9	8.79	8.8
	0.2	97.0	92.3	97.5	82.0	94.5			

เพื่อเป็นการลดขั้นตอนในการสกัด โดยเตรียมตัวอย่างที่ไม่ผ่านการ Cleanup เพียงแต่ผ่านกระดาษกรองตามวิธีการของ Navarro *et.al.* (2002) พบว่า สามารถสกัดสารพิษตกค้างทั้ง 5 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงความเข้มข้นที่ระดับ 0.02 – 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้สารกลับคืนในช่วงร้อยละ 79.6 – 109.7 (ดังแสดงในตารางที่ 4) แต่วิธีการนี้สร้างปัญหาให้กับเครื่อง GC-ECD ประสิทธิภาพจะลดลงอย่างมาก เนื่องจากสารอินทรีย์อื่นๆ ในพืชที่รบกวนการวิเคราะห์ จำเป็นต้องมีการบำรุงรักษาเครื่องในทุก Batch ที่ทดลอง จึงจะตรวจวัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดลองเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ในผักชนิดต่างๆ ได้แก่ ถั่วฝักยาว ผักกาดขาว กะหล่ำปลี และพริก สามารถใช้วิธีการของ Navarro *et.al.* (2002) หรือ Nguyen *et.al.* (2008) หรือดัดแปลงวิธีการของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 TM-T04-R02 แต่ใช้เครื่องวิเคราะห์ GC-ECD ได้สารกลับคืนในช่วงร้อยละ 41.7–133.2, 77.1–106.6 และ 79.6–109.7 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 – 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ ต้องมีการบำรุงรักษาเครื่องในทุก Batch ที่ทดลอง จึงจะตรวจวัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างสารป้องกันกำจัดโรคพืช 5 ชนิด ในผัก

ตารางที่ 4. ประสิทธิภาพของการสกัดสารพิษตกค้าง 5 ชนิด ในพริก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จำนวน 5 ซ้ำ ตามวิธีการของ Navarro *et.al.* (2002)

สารพิษ	Conc.	1	2	3	4	5	Ave.	SD	%CV
cyproconazole	0.02	84.2	107.3	86.5	86.0	84.5	89.7	9.86	11.0
	0.05	84.2	110.0	81.0	80.2	107.0	92.5	14.74	15.9
	0.2	80.6	90.4	93.1	91.7	76.4	85.4	8.76	10.3
	0.2	92.7	84.1	70.3	71.3	97.6			
	0.2	78.0	92.2	80.2	94.5	87.9			
	0.4	103.1	93.0	84.2	84.8	93.7	91.7	7.73	8.4
	0.6	81.0	83.5	86.0	99.2	82.3	86.4	7.40	8.6
hexaconazole	0.02	83.7	84.8	79.5	93.1	85.2	93.7	10.30	11.0
	0.02	104.6	107.4	94.5	107.3	96.5			
	0.04	108.8	99.2	86.3	89.1	102.3	97.2	9.34	9.6
	0.05	104.0	93.1	93.6	99.2	103.1	98.6	5.13	5.2
	0.1	106.1	105.0	83.5	103.6	114.0	102.4	11.34	11.1
	0.2	95.1	105.1	95.5	107.7	91.1	89.2	9.70	10.9
	0.2	81.0	91.3	80.6	98.3	86.1			
	0.2	78.6	89.7	82.1	79.1	77.3			
	1	79.4	87.9	71.8	83.8	75.2	79.6	6.48	8.1
propiconazole	0.02	95.9	104.4	84.9	97.5	105.2	97.6	8.19	8.4
	0.2	76.0	96.0	83.5	79.1	76.6	91.6	10.76	11.7
	0.2	79.5	89.5	76.7	93.4	86.3			
	0.2	99.4	91.2	98.3	99.0	87.3			
	0.2	109.7	108.5	100.2	105.9	95.5			
	0.5	104.8	116.8	106.0	104.7	111.6	108.8	5.33	4.9
	1	91.3	95.9	83.8	84.2	89.6	89.0	5.06	5.7
tebuconazole	1	90.3	88.4	84.3	91.6	93.4	91.9	6.09	6.6
	1	100.9	97.4	82.7	90.1	99.8			
tetraconazole	0.02	80.9	109.5	90.6	126.0	108.6	96.1	14.07	14.6

สารพิษ	Conc.	1	2	3	4	5	Ave.	SD	%CV
	0.02	94.3	86.5	90.6	87.9	86.1			
	0.04	89.1	87.3	85.7	82.4	88.3	86.6	2.68	3.1
	0.05	95.2	87.0	74.6	80.1	75.2	82.4	8.70	10.6
	0.1	112.9	114.2	100.2	106.7	114.8	109.8	6.24	5.7
	0.2	87.5	80.2	81.6	79.8	79.0	81.3	3.45	4.2
	0.2	83.5	85.1	78.5	82.2	75.6			

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. จัดพิมพ์เอกสารการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง cyproconazole, hexaconazole, propiconazole, tebuconazole และ tetraconazole ในผัก เพื่อเผยแพร่แก่นักวิชาการทั้งภาครัฐ เอกชน และผู้สนใจ

2. ใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้า ที่เป็นงานประจำวันของห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตรทั้งในส่วนกลาง ส่วนภูมิภาค และห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างของเอกชน

3. นำวิธีการที่ได้พัฒนาแล้วอย่างเหมาะสม ไปตรวจสอบการใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2005 เพื่อยื่นรายงานขอขยายขอบข่ายสารพิษตกค้างที่ตรวจวิเคราะห์ ของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

1. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2544. คำแนะนำการป้องกันกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมี. เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 171 หน้า.

2. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2553. ปริมาณนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชปี 2548 – 2552. กรมวิชาการเกษตร. http://m.doa.go.th/ard/stat2

3. Anastassiades, M. and S. J. Lehotay. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction / partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *J. of AOAC Inter.* 86 (2) : 412-431.

4. Anonymous. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Method; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURCHEM Guide, First English edition. (www.eurachem.bam.de/guide/vald.pdf)

5. Banerjee, K., D.P. Oulkar, S.B. Patil, M.R. Jadhav, S. Dasgupta, S.H. Patil, S. Bal and P.G. Adsule. 2009. Multiresidue determination and uncertainty analysis of 87 pesticides in mango by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (10) : 4068–4078.

6. Fodor-Csorba, K. 1992. Chromatographic methods for the determination of pesticides in foods. *Journal of Chromatography*, 624 : 353-367.

7. Garland, S.M., R.C. Menary and N.W. Davies. 1999. Dissipation of propiconazole and tebuconazole in peppermint crops (*Mentha piperita* (Labiatae)) and their residues in distilled oils. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1) : 294–298.

8. Navarro, M., Y. Pico, R.Marin and J. Manes. 2002. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 968 : 201–209.

9. Navarro, S., A. Barba, G. Navarro, N.Vela and J. Oliva. 2000. Multiresidue method for the rapid determination in grape, must and wine of fungicides frequently used on vineyards. *Journal of Chromatography A*, 882 : 221-229.

10. Nguyen, T.D., M.H. Lee and G.H. Lee. 2008. Multiresidue determination of 156 pesticides in watermelon by dispersive solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 29 (12) : 2482-2486.

11. Rissato, S.R., M.S. Galhiane, B.M. Apon and M.S.P. Arruda. 2005. Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction / gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (1) : 62–69.

12. Wood, A. 2010. Fungicides Data Sheet. http://www.alanwood.net/pesticides/class_fungicides.html Available on-line 27 Jan 2010.

13. ZWEIG, G. 1964. Chromatographic Techniques for Pesticide Residue Analysis. Agricultural Toxicology and Residue Research Laboratory, University of California, U.S.A. 19 p.