

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
- กิจกรรม : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ
- กิจกรรมย่อย : -
3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ในดิน
- : Development and validation of a method for determination of triazole in soil
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- หัวหน้าการทดลอง : นายประจักษ์ จันทร์ดีบ
- กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- ผู้ร่วมงาน : นางผกาสินี คล้ายมาลา นางสาวจันทิมา ผลกอง นางสาวพนิชชา เตชะใจ
- กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
5. บทคัดย่อ

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไตรอะโซล (triazole) ชนิด เตตราโคนาโซล (tetraconazole) เฮกซะโคนาโซล (hexaconazole) โพรพิโคนาโซล (propiconazole) และ ไดฟีโนโคนาโซล (difenoconazole) ในตัวอย่างดินทราย โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีอิเล็กตรอนแคพเจอร์ ดีเทคเตอร์ (GC-ECD) ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม ได้ค่า retention time เท่ากับ 12.560 15.574 19.405 และ 32.525 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี พบว่าวิธีการสกัดด้วย acetonitrile ให้ค่า ร้อยละการได้กลับคืน (% recovery) ที่ดีกว่าการสกัดอีกสองวิธี โดยได้ % recovery เฉลี่ย สำหรับ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole เท่ากับ 99 105 104 และ 113 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วย acetonitrile สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี วิเคราะห์ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในตัวอย่างดินทราย ได้ช่วง

การใช้งาน/ความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ (range/linearity) สำหรับ tetraconazole อยู่ในช่วง 0.0100 ถึง 0.2411 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม hexaconazole อยู่ในช่วง 0.0103 ถึง 0.3697 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม propiconazole อยู่ในช่วง 0.0207 ถึง 0.7460 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ difenoconazole อยู่ในช่วง 0.0255 ถึง 0.6119 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า R^2 มากกว่า 0.995 ได้ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.005 0.005 0.010 และ 0.013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.01 0.01 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากการประเมิน accuracy มีค่า %recovery เท่ากับ 74-82 เปอร์เซ็นต์ 72-109 เปอร์เซ็นต์ 82-113 เปอร์เซ็นต์ และ 88-95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และความเที่ยง (precision) ประเมินจากค่า %RSD พบอยู่ในช่วง 6-10 เปอร์เซ็นต์ 4-9 เปอร์เซ็นต์ 4-12 เปอร์เซ็นต์ และ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้าง tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินร่วนปนทราย และดินเหนียวที่ระดับ LOQ ได้โดยมีความถูกต้องแม่นยำ

Abstract

The analysis method of tetraconazole, hexaconazole, propiconazole, and difenoconazole residue in sandy soil samples was developed and validated by using the gas chromatography-electron capture detector (GC-ECD) technique. Under the optimum conditions, the retention time of these pesticides at 12.560, 15.574, 19.405, and 32.525 minutes were obtained, respectively. Three extraction methods were compared for the selection of the best method for conducting the validation study. It was found that the acetonitrile extraction method gave the best result in terms of percentage recovery evaluation. The obtained mean recoveries for tetraconazole, hexaconazole, propiconazole, and difenoconazole are 99%, 105%, 104%, and 113%, respectively. Therefore, the acetonitrile extraction method was selected for further study of the validation of the analytical method. The obtained linearity for tetraconazole was 0.0100 to 0.2411 mg/kg, hexaconazole was 0.0103 to 0.3697 mg/kg, propiconazole was 0.0207 to 0.7460 mg/kg, and difenoconazole was 0.0255 to 0.6119 mg/kg ($R^2 > 0.995$) with limit of detection of 0.005, 0.005, 0.010, and 0.013 mg/kg and limit of quantitation of 0.01, 0.01, 0.02, and 0.03 mg/kg, respectively. The obtained recoveries were 74-82%, 72-109%, 82-113% และ 88-95%. The precision of the method was considered in terms of relative

standard deviation (%RSD), which were 6-10%, 4-9%, 4-12%, and 5-10%, respectively. This developed method was successfully applied for the determination of tetraconazole, hexaconazole, propiconazole, and difenoconazole in sandy loam and clay at the LOQ level.

6. คำนำ

จากข้อมูลการขึ้นทะเบียน การนำเข้าสารเคมีทางการเกษตรกลุ่มสารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide) เป็นสารที่นำเข้ามากที่สุดเป็นอันดับสองรองจากสารกำจัดวัชพืช พบข้อมูลการนำเข้าสารพิษชนิด hexaconazole difenoconazole propiconazole และ tetraconazole มีการนำเข้ามากที่สุดตามลำดับ แสดงถึงภาคผนวก ก. ตารางที่ 1 (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2562) สารกลุ่มนี้นิยมใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชในพืชผักผลไม้ หรือเพื่อป้องกันรักษาเมล็ดพันธุ์ เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด แป้งสาลี องุ่น แอปเปิ้ล แอสพาราแกส กาแฟ และกล้วย เป็นต้น เมื่อพิจารณาถึงข้อมูลทางด้านพิษวิทยาสิ่งแวดล้อมที่เป็นข้อมูลประเมินผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมภาคผนวก ก. ตารางที่ 2 อีกทั้งมีโอกาสที่สารพิษเหล่านี้จะกระจายและปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนสู่ดินและแหล่งน้ำบริเวณแหล่งปลูกพืชและผลไม้ที่มีการใช้สารพิษกลุ่มนี้ซึ่งเป็นแหล่งรองรับสารพิษตกค้างชนิดต่างๆ เมื่อเกิดการกัดเซาะชะจากดินลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ โครงสร้างโมเลกุลของสารกลุ่ม triazole แสดงดังภาพที่ 1

ผลการศึกษาพัฒนาเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่ม triazole ในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำผิวดิน น้ำธรรมชาติ น้ำประปา ดิน องุ่น ทำให้ทราบว่าสารพิษกลุ่มนี้สามารถตกค้างได้ในสิ่งแวดล้อมในปริมาณแตกต่างกันตามแหล่งที่มา ผลการศึกษาของ Cheng *et al.* (2013) รายงานการตรวจพบ propiconazole ในตัวอย่างองุ่นปริมาณ 0.12-0.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างดินพบปริมาณ 0.10-0.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในน้ำตรวจไม่พบหรือต่ำกว่าค่า LOD จึงได้ทำการ spiked สารมาตรฐานลงไปใต้น้ำ ปริมาณระหว่าง 0.02-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ร้อยละการกลับคืนระหว่าง 90-99 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างน้ำประปาและน้ำแม่น้ำก็ได้รับการตรวจวิเคราะห์จากงานวิจัยของ Tang *et al.* (2010) โดยตรวจสารพิษชนิด tricyclazole triadimefon tebuconazole และ diniconazole และศึกษาความถูกต้องแม่นยำของวิธีโดยทำการ spiked สารมาตรฐานเหล่านี้ลงไปใต้น้ำปริมาณระหว่าง 0.5-10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าได้ร้อยละการกลับคืนระหว่าง 82-96 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานการตรวจพบ difenoconazole ในตัวอย่างน้ำผิวดินจำนวน 2 ตัวอย่าง จาก 4 ตัวอย่างในแหล่งจำหน่ายดอกไม้ทางตะวันออกของ Azarbaijan Province (อิหร่าน) พบในปริมาณ 8.0-19.0 นาโนกรัมต่อกรัม จากการตรวจสารพิษตกค้างทั้งหมด 5 ชนิดคือ penconazole hexaconazole diniconazole tebuconazole และ difenoconazole นอกจากนั้นยังได้สรุปรายงานการศึกษาวิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างอีกหลายชนิดได้แก่ ตัวอย่างถั่วเหลือง น้ำ น้ำอุน น้ำแอปเปิ้ล เลือดกระต่าย และตัวอย่างผัก นั้นแสดงว่าการตรวจสอบสารพิษตกค้างกลุ่มนี้มีความสำคัญและจำเป็นเพราะมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมจริง Farajzadeha *et al.* (2014) เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุที่มีพิษการเกษตร จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ในดิน

วิธีวิเคราะห์และทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม triazole พบว่าสารพิษตกค้างกลุ่ม triazole สามารถตรวจวัดได้หลายเทคนิค ทั้งเทคนิคทาง Gas chromatography (GC) และ High performance liquid chromatography (HPLC) ด้วยตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ อาทิเช่น GC-ECD GC-NPD normal phase HPLC-UV และ LC-MS/MS เป็นต้น

การศึกษาพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ propiconazole ในตัวอย่างน้ำ ดินและอุน แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีของการใช้เทคนิค normal phase HPLC ที่ได้รับการปรับสภาพการทำงานของระบบที่เหมาะสมแล้วทำให้ได้ช่วงของการทำงานที่กว้างและได้ค่า LOD และ LOQ ที่ต่ำเพียงพอต่อการวิเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น นั่นคือได้ค่า LOD ที่ต่ำกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ มีค่าไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิธีที่นำเสนอนี้สามารถประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างจริงซึ่งงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคการสกัด ด้วย SPE ทำให้สามารถสกัดตัวอย่างได้รวดเร็วและใช้สารเคมีน้อยสามารถลดของเสียเคมีที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการสกัด (Cheng *et al.*, 2013)

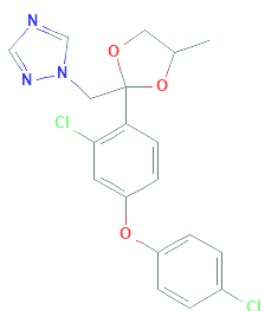
Farajzadeha *et al.* (2014) ได้รายงานผลการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole 5 ชนิด ได้แก่ penconazole hexaconazole diniconazole tebuconazole และ difenoconazole ตัวอย่างน้ำผึ้ง ด้วยการใช้เครื่อง gas chromatograph-nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD) ได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.05–0.21 นาโนกรัมต่อกรัม และ 0.15–1.1 นาโนกรัมต่อกรัม ในน้ำผึ้ง ตามลำดับ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำ ได้ร้อยละการกลับคืนของสารกลุ่ม triazole ที่ศึกษาในช่วง 97-100 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่าง 4-6 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีของการพัฒนาวิธีนี้

Xue *et al.* (2015) ได้รายงานผลการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดเชื้อรา 9 ชนิด ได้แก่ triadimefon picoxystrobin kresoxim-methyl diniconazole epoxiconazole trifloxystrobin triticonazole difenoconazole และ azoxystrobin ในดอกเบญจมาศ ด้วยการใช้เทคนิคการสกัดตัวอย่าง matrix extraction-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (ME-VADLLME) ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatograph-electron capture detector (GC-ECD) ซึ่งให้ประสิทธิภาพการ

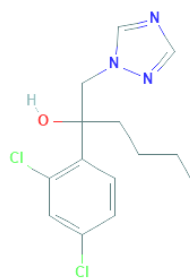
ตรวจวิเคราะห์ที่ดี ด้ร้อยละการกลับคืนของสารกลุ่ม triazole ในช่วง 73.9-95.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการศึกษาได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค LC-MS/MS เพื่อใช้ในการพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ enantiomeric ของ triazole 8 ชนิดพร้อมกัน ได้แก่ tetraconazole fenbuconazole epoxiconazole diniconazole hexaconazole triadimefon paclobutrazol และ myclobutanil ในตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ ทำการประเมินความถูกต้องแม่นยำของวิธีด้วยการเติมสารมาตรฐานลงไปตัวอย่างแล้วคำนวณร้อยละการได้กลับคืนสำหรับน้ำ อยู่ระหว่าง 81.2-106.5 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่าง 2.1-11.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า LOD (S/N=3) ที่ได้ต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่า LOQ (S/N=10) มีค่าไม่เกิน 3.0 ไมโครกรัมต่อลิตร (Li *et al.*, 2012)

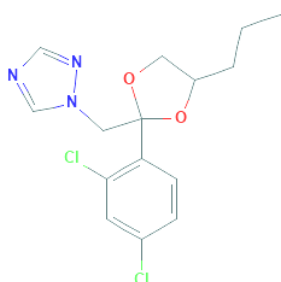
ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินโดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยได้มีการดัดแปลงและปรับปรุงมาจากวิธีการต่าง ๆ เช่น จากวิธีที่เป็นมาตรฐานสากล ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน และมีพัฒนาวิธีทดสอบขึ้นเอง (In-house method) จึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างให้เหมาะสมกับวัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพรวดเร็วทันและปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติ รวมทั้งจะต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อยืนยันความถูกต้องแม่นยำ และยังสามารถถ่ายทอดให้หน่วยงานอื่น ๆ ทั้งหน่วยงานรัฐและเอกชนที่มีความสนใจ



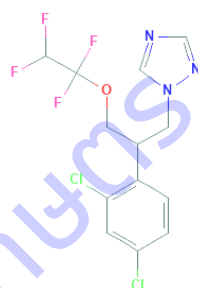
ก. difenoconazole



ข. hexaconazole



ค. propiconazole



ง. tetraconazole

ภาพที่ 1. โครงสร้างของสารกลุ่ม triazole (Pubchem, 2020)

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1) เครื่องแก้ว

เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel, beaker, cylinder, erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for auto sampler, pipette, volumetric flask, glass funnel และ centrifuge tube เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ auto pipette volumetric pipette และ volumetric flask class A

2) เคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ

2.1) สารเคมีชนิด analytical grade สำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่าง ได้แก่ anhydrous sodium sulfate, acetone, ethyl acetate, hexane, magnesium sulfate, primary secondary amine (PSA), sodium chloride, graphitized carbon black (GCB), VertiPak PSA/Carboglyph (SPE), water และ toluene

- 2.2) สารเคมีชนิด pesticide grade ได้แก่ acetonitrile, hexane และ iso-octane
- 2.3) สารมาตรฐาน pesticide grade กลุ่ม triazole 4 ชนิด ประกอบด้วย hexaconazole, difenoconazole, propiconazole และ tetraconazole
- 2.4) ตัวแทนดินชนิด ดินทราย ดินร่วนปนทราย และดินเหนียว
- 3) เครื่องมือวิทยาศาสตร์
 - 3.1) เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง
 - 3.2) เครื่องสกัดวัตุภูมิพิช separatory funnel และ shaker
 - 3.3) เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator และ nitrogen evaporator
 - 3.4) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
 - 3.5) ตู้แช่ (freezer) อุณหภูมิ - 25 ถึง -10 องศาเซลเซียส
 - 3.6) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
 - 3.7) เครื่อง gas chromatograph (GC) รุ่น HP 6890 พร้อมตัวตรวจวัดชนิด electron capture detector (ECD) และคอลัมน์ชนิด DB5-ms, ขนาด 30m x 0.25 mm. i.d. x 0.25 μ m film thickness
 - 3.8) เครื่อง gas chromatograph (GC) รุ่น HP 7890B พร้อมตัวตรวจวัดชนิด nitrogen phosphorus detector (NPD) และคอลัมน์ชนิด DB-35, ขนาด 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness

7.2 วิธีการ

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม stock standard solution ของสารพิษแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น ประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม intermediate standard solution ให้ได้สารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง ประมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม mix working standard solution ให้ได้สารละลายมาตรฐานผสมให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.01 - 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณจากสูตรในภาคผนวก ข.

2) การหาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเครื่อง GC-ECD

2.1) ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของบางพารามิเตอร์สำคัญของ GC conditions ที่ทำให้ได้ค่า response ของสารมาตรฐานสูงขึ้นเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ไป 1 ค่า อาทิเช่น การเปลี่ยนอุณหภูมิ Inlet temperature และ การหา flow rate ของแก๊สตัวพาที่เหมาะสม เป็นต้น ได้สภาวะของ GC ที่เหมาะสมดังนี้ ตารางที่ 1 สภาวะการทำงานที่เหมาะสมของ GC

Parameters	Optimized conditions
Mode	splitless
Inlet temperature	260 °C
Injection volume	1 µL
Detector type	ECD
Detector temperature	300 °C
Column	DB-5ms, 30m x 0.25mm x 0.25µm film thickness
Carrier gas	He, make up N ₂ 58.8 ml/min
Flow rate	1.5 ml/min

2.2) อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิการแยกสารในคอลัมน์ (Oven ramp) ทำให้เกิดการแยกของสารมาตรฐานที่เหมาะสมต่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ จำเป็นต้องศึกษาอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิการแยกสารในคอลัมน์ ดังแสดงตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิการแยกสารในคอลัมน์ (Oven ramp)

Program	Hold (min)	Initial (°C)	Final (°C)	Rate (°C/min)	Run time (min)
ramp 1	1	120	120	-	1
ramp 2	3	120	210	10	13
ramp 3	1	210	245	3	25.67
ramp 4	9	245	270	20	35.92
post run	1	280	-	-	36.92

3) ศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

โดยการเปรียบเทียบวิธีเตรียมตัวอย่างดิน ตัวอย่างที่สกัดได้นำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่องมือประกอบด้วย 3 วิธีดังนี้

3.1) วิธีการสกัดดิน In house method TM-T04-I02 (AOAC, 2016)

ชั่งดิน 20 กรัม เติม ethyl acetate (AR) 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker นาน 4 ชั่วโมง กรองผ่าน sodium sulfate anhydrous ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย ethyl acetate 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง กรองผ่าน sodium

sulfate anhydrous รวมกัน ลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร ดูดสารสกัด 1 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้งด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 2.5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม triazole

3.2) วิธีการสกัดดิน In house method TM-T04-I02 (AOAC, 2016) เพิ่มขั้นตอนการขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย SPE

สกัดดินตามวิธีในข้อ 3.1 เมื่อได้สารละลายที่สกัดนำสารสกัดไปผ่านขั้นตอนการขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย SPE โดยการ condition SPE ด้วยสารละลาย elution solution (acetonitrile: toluene, 3:1) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดูดสารสกัดในข้อ 3.1 มา 2 มิลลิลิตร ลง SPE column ที่เตรียมไว้ เก็บส่วน eluate ที่ได้ใน test tube 10 มิลลิลิตร แล้วชะด้วย 3 มิลลิลิตร elution solution 2 ครั้ง เป่าสารละลายจนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย hexane PR ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ลง vial นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD

3.3) วิธีการสกัดดิน Acetonitrile ขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย SPE (Cheng *et al.*, 2013)

Extraction ชั่งดิน 10 กรัม ลง PTFE centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดฝา (ดินแห้งให้เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนัก กรณี spike std., vortex 30 วินาที, ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที) เติมน้ำ ultrapure 3 มิลลิลิตร เติม acetonitrile AR 20 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วย vortex mixer อย่างแรง 5 นาที เติม 3 กรัมของ anh. MgSO₄ และ 1.5 กรัมของ NaCl, vortex mixer 3 นาที นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4000 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลาย 15 มิลลิลิตร ลงขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร ระเหยด้วย rotary evaporator จนเกือบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติม acetonitrile AR ละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร (vortex) ใช้สารสกัดทั้งหมด นำสารสกัดที่ได้ไป clean up เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE *Clean up* ทำการ condition SPE ด้วยสารละลาย elution solution (acetonitrile: toluene, 3:1) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดูดสารสกัดที่ได้มา 2 มิลลิลิตร ผ่าน SPE column ที่เตรียมไว้ ล้างด้วยน้ำ deionized 3 มิลลิลิตร เก็บ eluate ที่ได้ใน test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วชะ SPE column ด้วยสารละลายปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง (acetonitrile: toluene, 3:1) นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ ไปลดปริมาตรจนเกือบแห้งด้วย nitrogen evaporator ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วย hexane PR ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ลง vial นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD

4) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

เมื่อได้สถานะของเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์และวิธีการสกัดตัวอย่างดินที่เหมาะสม จึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ โดยทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Performance Analytical Characteristics of method) ได้แก่ range, linearity, accuracy, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) (Eurachem, 2014)

4.1) ตรวจสอบช่วงการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรง (range/linearity) ของวิธีทดสอบ

โดยการทดสอบ reagent blank และ fortified sample 7 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 1 ซ้ำ ตามวิธีการที่พัฒนาขึ้น สำหรับ linearity ทำการทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้นภายใน range 7 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ตามวิธีการที่พัฒนาขึ้น ด้วยการ spiked สารมาตรฐานกลุ่ม triazole 4 ชนิด ประกอบด้วย tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ลงไปในดินทราย ทำการสกัดด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC - ECD เมื่อได้สัญญาณ นำค่าสัญญาณที่ได้พล็อตกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีค (แกน Y) กับค่าความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด (แกน X) เพื่อหาค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟ coefficient of determination (R^2) แล้วพิจารณาค่าความเป็นเส้นตรง โดยเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient (r) มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995

4.2) ความถูกต้อง (accuracy)

โดยทดสอบ reagent blank sample blank และ fortified sample ด้วยการ spiked สารมาตรฐานกลุ่ม triazole 4 ชนิด ประกอบด้วย tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ลงไปในดินทรายให้ได้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือที่ระดับ ต่ำ กลางและสูง ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ประเมิน accuracy จาก

4.2.1) ค่า %recovery คำนวณได้ดังนี้

$$\%recovery = C_{cal} / C_{fortified} \times 100$$

เมื่อ C_{cal} = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)

$C_{fortified}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม (mg/kg)

กำหนดเกณฑ์การยอมรับ recovery 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANTE/11813, 2017)

4.2.2) ความเที่ยง (precision)

ประเมินค่า precision จากการคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) โดย %RSD คำนวณได้ดังนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

กำหนดเกณฑ์การยอมรับ precision คือมีค่า %RSD น้อยกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (AOAC, 2016)

4.3) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

ทดสอบ sample blank และ fortified sample ด้วยการ spike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำ (0.005 – 0.013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จำนวน 7 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ LOD จาก Signal to Noise Ratio; S/N Ratio กำหนดค่าการยอมรับการตรวจวัด S/N Ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 3 (Eurachem, 2014)

4.4) ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบ sample blank และ fortified sample อ้างอิงจากความเข้มข้นของสารที่ระดับใกล้เคียงหรือต่ำกว่า 10 S/N Ratio ด้วยการ spike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.01 – 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 7 ซ้ำ ประเมิน accuracy โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า % recovery 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (AOAC, 2016)

4.5) Reproducibility

โดยทดสอบกับดินเหนียวและดินร่วนปนทราย โดยวิเคราะห์ sample blank และ fortified sample ที่มีความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 1 ความเข้มข้นในตัวอย่างดินเหนียวและดินร่วนปนทราย จำนวนชนิดละ 7 ซ้ำ ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น ตรวจสอบ accuracy และ precision จากการประเมิน %recovery และ %RSD โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า % recovery 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (AOAC, 2016)

7.3 เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2561 - สิ้นสุดเดือนกันยายน 2563 รวมระยะเวลา 2 ปี

สถานที่ทำการทดลองห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาผลงานวิจัย การทบทวนวรรณกรรม เอกสารวิธีวิเคราะห์และทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ชนิด tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ พบว่าสารพิษตกค้าง tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole สามารถตรวจวัดได้ทั้งเทคนิคทาง GC และ HPLC สำหรับงานวิจัยนี้เทคนิคที่ถูกเลือกใช้ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ คือ GC โดยตัวตรวจวัดที่ให้ความไวในการวัดสูงสุดคือ อิเล็กตรอนแคปเจอร์ดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Electron Capture detector, GC-ECD) เนื่องจากในโครงสร้างโมเลกุลของสารพิษกลุ่ม triazole (ภาพที่ 1) มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนสูงทำให้องค์ไวต่อการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดนี้มาก (Xue *et al.*, 2015) อีกทั้งยังเหมาะสมกับการใช้งานเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ

เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นสูงของสารพิษชนิด tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ความเข้มข้น 1121.380 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1002.792 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1904.760 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 995.940 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานใช้งานที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ สำหรับดินตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ทำการอบตัวอย่างดินเพื่อกำจัดสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่ระเหยได้ง่าย และสารรบกวนที่อาจส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์วิจัย โดยหลังจากอบเก็บรักษาในภาชนะปิดสนิทป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน intermediate standard (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ mixed working standard ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 6 ระดับความเข้มข้น สำหรับทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานแต่ละชนิด (linearity) โดยการสร้าง calibration curve และพิจารณาค่า correlation coefficient ต้องไม่น้อยกว่า 0.995 ซึ่งจากการทดสอบสารทั้ง 4 ชนิด พบว่าค่า correlation coefficient ที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 0.997-0.999

8.1) การหาสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเครื่อง GC-ECD

จากผลการทดสอบการตรวจวัดสารพิษกลุ่ม ชนิด tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีอิเล็กตรอนแคปเจอร์ดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Electron Capture detector, GC-ECD) พบว่าให้สัญญาณที่ดีที่สุด โดยได้ค่า signal/noise ratio สูงกว่าตัวตรวจวัดชนิด Nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD) เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกัน จึงเลือกใช้ในการพัฒนาวิธีการต่อไป โดยคอลัมน์ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ ได้แก่ DB-5ms ซึ่งมีคุณสมบัติเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่ต้องการวิเคราะห์อื่น ๆ และสามารถทำให้สารทั้ง 4 ชนิดแยก

นอกจากนี้เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ทดสอบสภาวะการทำงานของเครื่อง GC-ECD ที่เหมาะสม (optimized condition) สำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole โดยการใช้อุณหภูมิวิเคราะห์ที่เหมาะสม ชนิด DB-5ms แล้วปรับอัตราการไหลของแก๊สตัวพา อุณหภูมิส่วนนำสารเข้าสู่ระบบ GC เพื่อให้ได้การแยกและสัญญาณที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากค่า sensitivity หรือ slope (Hz*s. $\mu\text{L}/\text{ng}$) พบว่าอัตราการไหลที่เหมาะสมได้แก่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิส่วนนำสารเข้าสู่ระบบที่เหมาะสมคือ 260 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ฉีดเข้าระบบ 1 ไมโครลิตร และอุณหภูมิของตัวตรวจวัดคือ 300 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะการทำงานที่เหมาะสมนี้ สำหรับการศึกษาดังกล่าว สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-ECD สำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole แสดงดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ซึ่งทำให้ได้เวลาที่สารพิษแยกออกมาจากคอลัมน์ retention time (t_R) มีหน่วยเป็นนาที (min) เป็นดังนี้ tetraconazole มี retention time เท่ากับ 12.560 นาที hexaconazole มี retention time เท่ากับ 15.574 นาที propiconazole มี retention time เท่ากับ 19.405 นาที และ difenoconazole มี retention time เท่ากับ 32.525 นาที ตามลำดับ สารทั้ง 4 ชนิดแยกออกจากกันอย่างเหมาะสมต่อการวิเคราะห์

8.2) ศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในตัวอย่างดินทรายตรวจวัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี โดยใช้วิธีการสกัดเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน 3 วิธี พบว่าได้ค่าประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร (%recovery) ของทั้งสามวิธีอยู่ในช่วงระหว่าง 35-170 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร (%recovery) ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างในดินทราย

วิธีที่เสนอ	%Recovery
วิธีการสกัดดิน (In house method TM-T04-I02)	127-170
วิธีการสกัดดิน (In house method TM-T04-I02) clean up ด้วย SPE ขนาด 3 มิลลิลิตร	38-65
วิธีการสกัดดินด้วย Acetonitrile clean up ด้วย SPE ขนาด 3 มิลลิลิตร	35-60

จากผลการทดสอบวิธีการสกัดดินพบว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์บางชนิดยังให้ผลการวิเคราะห์ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ เนื่องจาก matrix effect เพราะการสกัดไม่ได้ผ่านการ clean up และขณะเดียวกันสารที่ต้องการวิเคราะห์บางชนิดจะเกิดการสูญเสียในขั้นตอน clean up จึงต้องมีการพัฒนาเลือกใช้วัสดุ clean up ที่เหมาะสม

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร ให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับค่าการคืนกลับ ที่อยู่ในช่วงระหว่าง 70-120 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองปรับเปลี่ยนวัสดุสำหรับ clean up ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ปริมาณของแข็งที่บรรจุใน SPE column มากขึ้นจากขนาด 3 มิลลิลิตร เป็นขนาด 6 มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่า ได้ค่าการคืนกลับ (%recovery) มากขึ้นและอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร (%recovery) ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างในดินทรายด้วยวิธีที่ต่างกัน และใช้ขนาดของ SPE column ที่ต่างกัน

วิธีที่เสนอ	%Recovery	
	SPE column 3 มิลลิลิตร	SPE column 6 มิลลิลิตร
1. วิธีการสกัดดิน (In house method TM-T04-I02)	127-170	*NA
2. วิธีการสกัดดิน (In house method TM-T04-I02) แล้ว clean up ด้วย SPE	38-65	103-120
3. วิธีการสกัดดินด้วย acetonitrile แล้ว clean up ด้วย SPE	35-60	99-113

*NA = not analysis

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ดินที่ให้ผลการทดสอบที่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (%recovery) อยู่ในช่วง 70-120 เปอร์เซ็นต์ มี 2 วิธี เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร วิธีที่ 3 คือวิธีการสกัดดินด้วย acetonitrile clean up ด้วย SPE สำเร็จรูปขนาด 6 มิลลิลิตร ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด มากไปกว่านั้นวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้สารเคมีในการสกัดน้อยกว่าและสะดวกรวดเร็วกว่า จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมและถูกเลือกในการศึกษาทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างดินชนิดอื่นที่เหมาะสม เช่น ดินทราย ดินร่วน และดินเหนียว และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

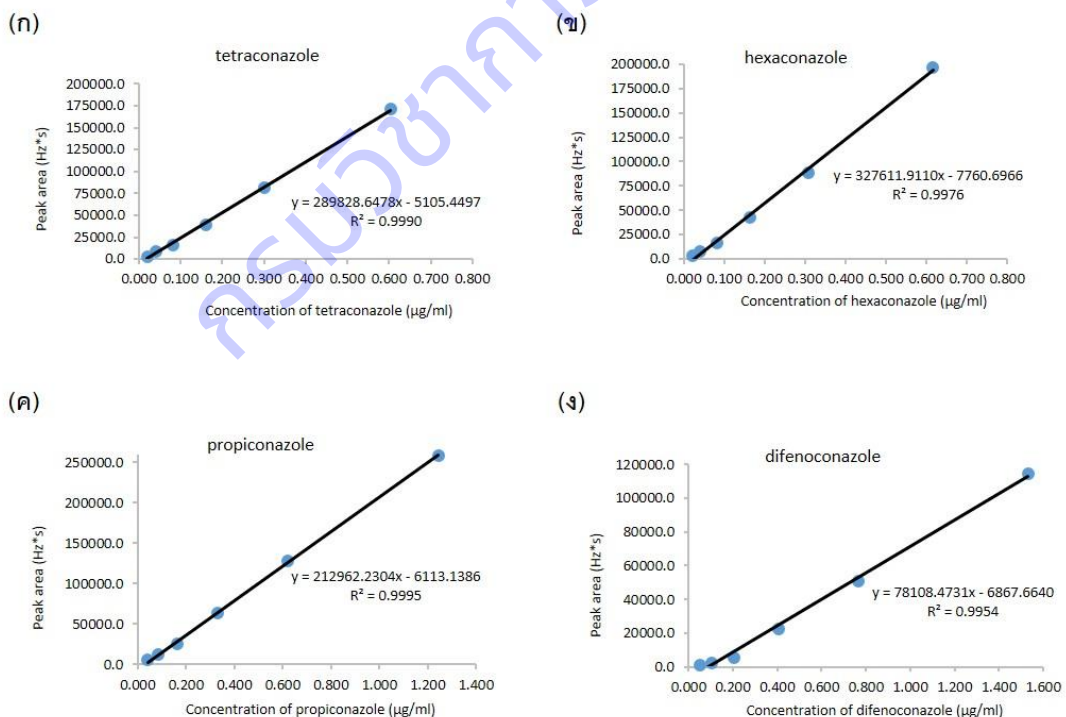
เลือกใช้วิธีการสกัดดินด้วย acetonitrile แล้ว clean up ด้วย SPE สำเร็จรูปขนาด 6 มิลลิลิตร ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด และใช้สภาวะการทำงานที่เหมาะสมของ GC-ECD ที่ได้ดังตารางที่ 1 และ 2 สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม triazole ประกอบด้วย difenoconazole hexaconazole propiconazole และ tetraconazole ในดินทราย ดินร่วนและดินเหนียว พบว่าผลการทดลองที่ได้ ได้ประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร (%recovery) difenoconazole hexaconazole propiconazole และ tetraconazole สำหรับดินทรายอยู่ในช่วงระหว่าง 81-100 เปอร์เซ็นต์ ดินร่วนอยู่ในช่วงระหว่าง 88-105 เปอร์เซ็นต์ และดินเหนียวอยู่ในช่วงระหว่าง 78-99 เปอร์เซ็นต์ โดยภาพรวมของวิธีการสกัดดินทั้งสามชนิด ได้ประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร (%recovery)

difenoconazole hexaconazole propiconazole และ tetraconazole อยู่ในช่วงระหว่าง 81-105 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ %recovery ที่อยู่ในช่วง 70-120 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ดินทั้งสามชนิดคือ ดินทราย ดินร่วน และดินเหนียวด้วยวิธีการสกัดด้วย acetonitrile แล้ว clean up ด้วย SPE แล้วตรวจด้วยเครื่อง GC-ECD ซึ่งจากการพิจารณาค่าประสิทธิภาพการสกัดคืนของสาร (%recovery) ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และวิธีที่พัฒนาขึ้นมาถูกนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ชนิด difenoconazole hexaconazole propiconazole และ tetraconazole ในดินต่อไป

8.3) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

8.3.1 ความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานกลุ่ม triazole

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานกลุ่ม triazole 4 ชนิด ได้แก่ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ด้วยสารละลาย working standard solution กลุ่ม triazole ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ tetraconazole ในช่วง 0.0201 ถึง 0.6029 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร hexaconazole ในช่วง 0.0205 ถึง 0.6161 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร propiconazole ในช่วง 0.0414 ถึง 1.2434 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ difenoconazole ในช่วง 0.0510 ถึง 1.5300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9990 0.9976 0.9995 และ 0.9954 ตามลำดับ แสดงกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด ดังภาพที่ 2 (ก - ง)

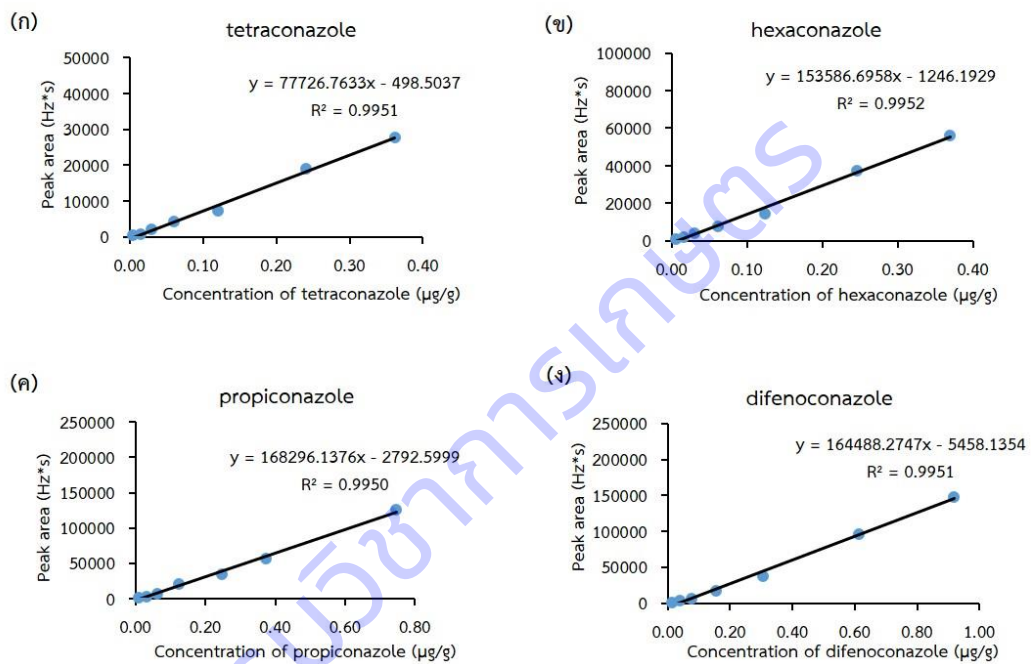


ภาพที่ 2 ความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานกลุ่ม triazole

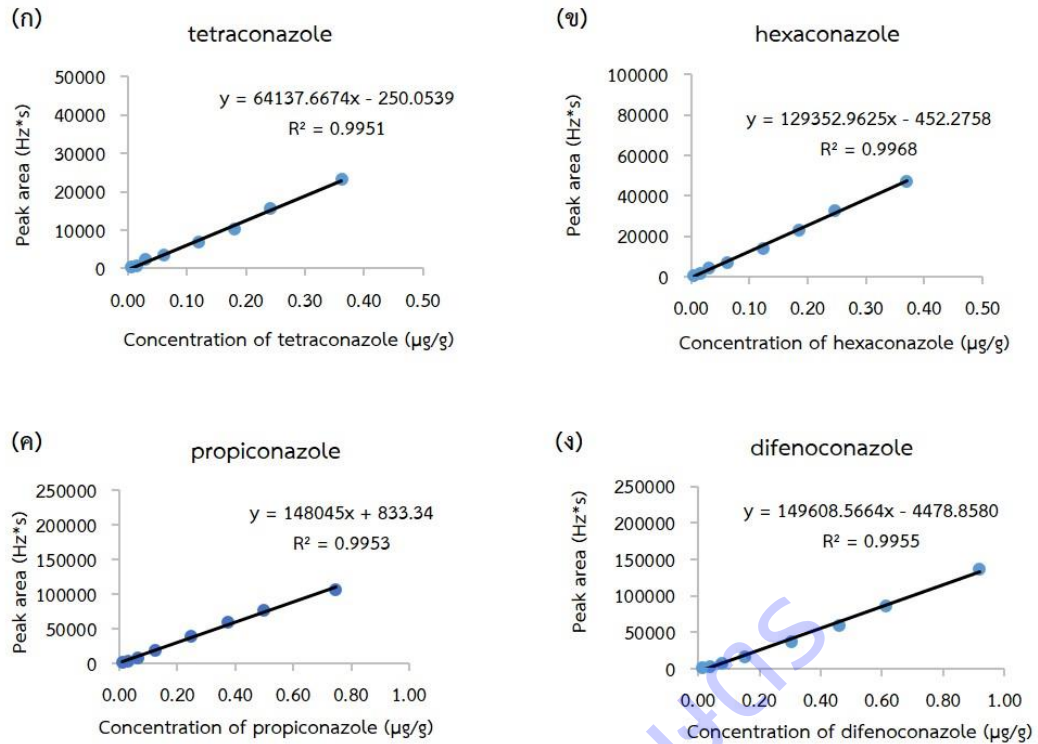
ก) tetraconazole ข) hexaconazole ค) propiconazole และ ง) difenoconazole

8.3.2) ตรวจสอบช่วงการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรง (range/linearity) ของวิธีทดสอบ

ผลการศึกษา range ของสารทั้ง 4 ชนิดประกอบไปด้วย tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole มีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.9950 ถึง 0.9952 ส่วนผลการศึกษา linearity ได้ทำการศึกษาสารชนิด tetraconazole ในช่วงระหว่าง 0.0050 ถึง 0.3617 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม hexaconazole ในช่วงระหว่าง 0.0051 ถึง 0.3697 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม propiconazole ในช่วงระหว่าง 0.0104 ถึง 0.7460 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ difenoconazole ในช่วงระหว่าง 0.0127 ถึง 0.9179 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการศึกษา range และ linearity แสดงดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4 ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษา linearity ได้ผลการทดลองที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า coefficient of determination (R^2) โดย R^2 มีค่ามากกว่า 0.995

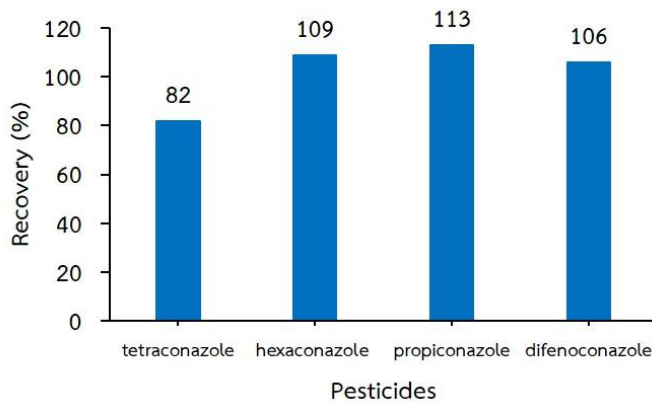


ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของการศึกษา range ของสารมาตรฐานกลุ่ม triazole
ก) tetraconazole ข) hexaconazole ค) propiconazole และ ง) difenoconazole



ภาพที่ 4 ความเป็นเส้นตรงของการศึกษา linearity ของสารมาตรฐานกลุ่ม triazole
 ก) tetraconazole ข) hexaconazole ค) propiconazole และ ง) difenoconazole

นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาการทดสอบค่าการคืนกลับ (%recovery) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่าการคืนกลับอยู่ในช่วง 70-120 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการ spiked สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ลงในตัวอย่างดินทรายให้ได้ความเข้มข้น 0.0100 0.0103 0.0207 และ 0.0255 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ อย่างน้อย 3 ซ้ำ ทำการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD นำข้อมูลที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรมของ GC มาคำนวณทางสถิติเพื่อพิจารณาการคืนกลับ พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้คือ 0.0082 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.0112 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 0.0235 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.0269 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของการคืนกลับสำหรับ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole คือ 82 109 113 และ 106 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินในช่วง 70-120 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารมาตรฐานกลุ่ม triazole ในดินทราย ด้วยการทดสอบค่าการคืนกลับ (%recovery)

8.3.3) ความถูกต้อง (accuracy)

ได้ทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Performance analytical characteristics of method) ได้แก่ ความถูกต้อง (accuracy) ทดลอง 7 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น โดย spiked สารมาตรฐาน tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ลงไปในดินทรายให้ได้ความเข้มข้น ที่ระดับ ต่ำ กลางและสูง ทำการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ผลการศึกษาพบว่า ได้ค่าการคืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วง 72-113 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (AOAC, 2016) ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 5 ตารางที่ 5 ค่า %recovery และ %RSD จากการศึกษา ความถูกต้อง (accuracy) ของสารพิษชนิด tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินทราย ที่ความเข้มข้นระดับ ต่ำ กลางและสูง

Pesticides	Spiked level (mg/kg)								
	low			medium			high		
	Conc.	%recovery	%RSD	Conc.	%recovery	%RSD	Conc.	%recovery	%RSD
tetraconazole	0.0100	82	10	0.1206	74	7	0.2411	82	6
hexaconazole	0.0103	109	4	0.1232	72	7	0.3697	87	9
propiconazole	0.0207	113	4	0.2487	84	10	0.7460	82	12
difenoconazole	0.0255	106	5	0.1530	88	7	0.6119	95	10

8.3.4) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

ผลการทดสอบ sample blank และ fortified sample ด้วยการ spike สารมาตรฐาน tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.005 0.005 0.010 และ 0.013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จำนวน 7 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ LOD จาก Signal to Noise Ratio; S/N Ratio กำหนดค่าการยอมรับการตรวจวัด S/N Ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 3 พบว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้และมีค่า S/N Ratio มากกว่า 3 (ตารางที่ 6)

8.3.5) ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ผลการทดสอบ sample blank และ fortified sample อ้างอิงจากความเข้มข้นของสารมาตรฐาน tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ที่ระดับใกล้เคียงหรือต่ำกว่า 10 S/N Ratio ด้วยการ spike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.01 0.01 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 7 ซ้ำ จากการประเมินความถูกต้อง (accuracy) พบว่าผลการศึกษาผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า % recovery 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (AOAC, 2016) ตารางที่ 5 จึงเลือกค่า LOQ ของสาร tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole เท่ากับ 0.01 0.01 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีทดสอบสารพิษ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินทราย

Pesticide	LOD		LOQ	
	conc. (mg/kg)	S/N>3	conc. (mg/kg)	S/N>10
tetraconazole	0.005	7.0	0.01	46.2
hexaconazole	0.005	12.3	0.01	62.2
propiconazole	0.010	8.5	0.02	48.1
difenoconazole	0.013	8.0	0.03	33.2

8.3.7) Reproducibility

ผลการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ในดินร่วนปนทรายและดินเหนียว ได้แก่ accuracy โดยทำการทดลอง 7 ซ้ำ โดยทดสอบ reagent blank และ fortified sample ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น

spiked สารมาตรฐาน 4 ชนิด ประกอบด้วย tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ลงไปในดินร่วนปนทรายและดินเหนียว ให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับ LOD และ LOQ ของดินทราย เพื่อพิสูจน์ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แล้วทำการสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ผลการศึกษาพบว่า ได้ค่าการคืนกลับ (% recovery) อยู่ในช่วง 82-88 เปอร์เซ็นต์ และ 73-102 เปอร์เซ็นต์ สำหรับดินร่วนปนทรายและดินเหนียวตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (AOAC, 2016) ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า %recovery และ %RSD จากการศึกษา trueness และ precision ของสารพิษ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินร่วนปนทรายและดินเหนียว

Pesticides	Spiked at LOQ level (mg/kg)					
	sandy loam			clay		
	Conc.	%recovery (n=7)	%RSD	Conc.	%recovery (n=7)	%RSD
tetraconazole	0.0100	88	4	0.0100	82	3
hexaconazole	0.0103	82	17	0.0103	73	10
propiconazole	0.0207	82	11	0.0207	102	14
difenoconazole	0.0255	86	13	0.0255	102	15

limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีทดสอบสารพิษ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินร่วนปนทรายและดินเหนียวสรุปข้อมูลได้ดังตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ และสรุปค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบในดินทั้งสามชนิดดังตารางที่ 10 ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินร่วนปนทรายและดินเหนียวที่ระดับ LOQ ได้โดยมีความถูกต้องแม่นยำ

ตารางที่ 8 ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีทดสอบสารพิษ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินร่วนปนทราย

Pesticide	LOD		LOQ	
	conc. (mg/kg)	S/N>3	conc. (mg/kg)	S/N>10
tetraconazole	0.005	7.5	0.01	13.5
hexaconazole	0.005	10.7	0.01	18.4
propiconazole	0.010	9.5	0.02	15.2
difenoconazole	0.013	6.3	0.03	16.2

ตารางที่ 9 ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีทดสอบสารพิษ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินเหนียว

Pesticide	LOD		LOQ	
	Conc. (mg/kg)	S/N>3	Conc. (mg/kg)	S/N>10
tetraconazole	0.005	4.5	0.01	16.5
hexaconazole	0.005	3.4	0.01	16.6
propiconazole	0.010	3.3	0.02	20.2
difenoconazole	0.013	4.8	0.03	19.4

ตารางที่ 10 สรุปค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของวิธีทดสอบสารพิษ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินทราย ดินร่วนปนทราย และดินเหนียว

Pesticides	Limit of detection (mg/kg)			Limit of quantitation (mg/kg)		
	sand	sandy loam	clay	sand	sandy loam	clay
tetraconazole	0.005			0.01		
hexaconazole	0.005			0.01		
propiconazole	0.010			0.02		
difenoconazole	0.013			0.03		

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินทราย สกัดด้วยวิธี acetonitrile แล้ว clean up ด้วย SPE ชนิด VertiPak PSA/Carbograp และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-ECD นั้น ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง จากการประเมิน accuracy ได้ %recovery เท่ากับ 72-113 เปอร์เซ็นต์ และ %RSD เท่ากับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ ได้ช่วงการใช้งานของสารพิษ tetraconazole มีความเป็นเส้นตรงในช่วงระหว่าง 0.0100 ถึง 0.2411 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม hexaconazole ในช่วงระหว่าง 0.0103 ถึง 0.3697 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม propiconazole ในช่วงระหว่าง 0.0207 ถึง 0.7460 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ difenoconazole ในช่วงระหว่าง 0.0255 ถึง 0.6119 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOD เท่ากับ 0.005 0.005 0.010 และ 0.013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LOQ เท่ากับ 0.01 0.01 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำไปใช้

ตรวจวิเคราะห์ tetraconazole hexaconazole propiconazole และ difenoconazole ในดินร่วนปนทราย และดินเหนียวที่ระดับ LOQ ได้โดยมีความถูกต้องแม่นยำต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ในตัวอย่างดิน
2. เผยแพร่วิธีการที่พัฒนาขึ้นไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ ของหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้อง
3. เป็นข้อมูลสนับสนุนงานวิจัยสำหรับนักวิจัยหรือผู้เกี่ยวข้องกับการวิจัยสารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ในสิ่งแวดล้อมบริเวณเกษตรกรรมพื้นที่อื่น ๆ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ นักวิชาการเกษตรและเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตรทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2562. ข้อมูลสถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15 มิถุนายน 2563. [Available online: http://www.doa.go.th/ard/?page_id=386]

AOAC. 2016. Organochlorine and Organophosphorus Pesticide. Official Method 970.52. General Multiresidue Method, 11p.

Cheng Y., F. Dong, X. Liu, J. Xu, J. Li, X. Chen, Y. Li, X. Wu, and Y. Zheng. 2013. Stereoselective separation and determination of the triazole fungicide propiconazole in water, soil, and grape by normal phase HPLC. *Analytical Methods*. 5. 755–761.

Eurachem. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. 70p. Available online: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf (25 Mar, 2020).

- Farajzadeha M. A., M. R. A. Mogaddam, and H. Ghorbanpour 2014. Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*. 1347. 8-16.
- Li Y., F. Dong, X. Liu, J. Xu, J. Li, Z. Kong, X. Chen, X. Liang, and Y. Zheng. 2012. Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1224. 51-60.
- PPDB. 2020. Pesticide Properties DataBase, University of Herfordshire. 10 มิถุนายน 2563. [Available online: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/>]
- Pubchem. 2020. โครงสร้างโมเลกุลสารกลุ่ม triazole. 1 กุมภาพันธ์ 2564. [Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>]
- SANTE/11813. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. 21-22 November 2017 rev.0, 5 กุมภาพันธ์ 2564. [Available online: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf]
- Tang T., K. Qian, T. Shi, F. Wang, J. Li, and Y. Cao. 2010. Determination of triazole fungicides in environmental water samples by high performance liquid chromatography with cloud point extraction using polyethylene glycol 600 monooleate. *Analytica Chimica Acta*. 680. 26-31.
- Xue J., X. Chen, W. Jiang, F. Liu, and H. Li. 2015. Rapid and sensitive analysis of nine fungicide residues in chrysanthemum by matrix extraction-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography B*. 975. 9-17.

13. ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. ข้อมูลการนำเข้าสารป้องกันและกำจัดโรคพืช กลุ่ม triazole

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารป้องกันและกำจัดโรคพืช กลุ่ม triazole

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ปริมาณ (กก.)	มูลค่า (บาท)	สารสำคัญ (กก.)
1	hexaconazole	512,941	54,014,990	45,387
2	difenoconazole	425,200	1,726,139,154	394,245
3	propiconazole	375,010	729,829,613	341,997
4	tetraconazole	16,640	3,831,048	666

ที่มา : สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2562)

2. ข้อมูล Ecotoxicological data ของสารกลุ่ม triazole

ตารางที่ 2 ค่า LD50, DT50, LC50 และ Solubility in water ของสารกลุ่ม triazole

ชื่อสามัญ	Mammals- Acute oral (Rat)	Soil degradation (DT)		Fish - Acute 96 hr. (Rainbow trout)	Solubility In water at (20°C)
	LD50	(DT50) typically	(DT50) field	(LC50)	
	(mg/kg)	(days)	(days)	(mg/L)	
difenoconazole	1453 moderate	130 persistent	85 moderate	1.1 moderate	15.0 low
hexaconazole	2189 low	122 persistent	225 persistent	3.4 moderate	18 low
propiconazole	550 moderate	71.8 moderate	35.2 moderate	2.6 moderate	150 moderate
tetraconazole	1031 moderate	61 moderate	430 very persistent	4.3 Moderate	156.6 moderate

ที่มา : Pesticide Properties DataBase, University of Herfordshire (PPDB, 2020)

ภาคผนวก ข

1. การคำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (stock standard solution)

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

2. การคำนวณความเข้มข้น intermediate standard solution

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น ($\mu\text{g/mL}$)

N_2 = ความเข้มข้นของสารที่ได้ ($\mu\text{g/mL}$)

V_1 = ปริมาตรของสารเริ่มต้นที่ปิเปตมา (mL)

V_2 = ปริมาตรสุดท้ายของสารที่เตรียม (mL)

3. ค่าเวลาที่สารมาตรฐานแยกออกจากคอลัมน์ Retention time (t_R) วิเคราะห์ด้วย GC-ECD

ตารางที่ 3 Retention time ของสารแต่ละชนิดที่แยกออกจากคอลัมน์ด้วยการวิเคราะห์ด้วย GC-ECD

Pesticides	Retention time (t_R) (min)
tetraconazole	12.560
hexaconazole	15.574
propiconazole	19.405
difenoconazole	32.525