การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม fungicide ในผักและผลไม้ โดยใช้ Gas Chromatograph/Mass Spectrometry

Method Development of fungicide Residues Analysis in Fruits and Vegetables

พนิดา ไชยยันต์บูรณ์ จินตนา ภู่มงกุฎชัย บุญทวีศักดิ์ บุญทวี สุพัตรี หนูสังข์
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม fungicide 15 ชนิดได้แก่ caboxin, dicloran, edifenphos, etridiazole, flutolanil, fomozadon, hexaconazole, iprobenfos, iprodione, myclobutanil, oxadixyl, pyrazophos, tricyclazole, trifloxystrobin และ triflumizole ในหน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้ Gas Chromatograph/Mass Spectrometry, Large Volumn Injection และใช้ mode SIM โดยทดสอบวิธีวิเคราะห์ 2 วิธีคือ วิธีการที่ 1 ใช้วิธีการสกัดที่ ปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) สกัดตัวอย่างด้วย acetone และ dichloromethane โดยใช้เครื่อง homogenizer ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ส่วนคือ ตัวอย่างที่ไม่มีการ clean up และมีการ clean up โดยวิธี dispersive SPE วิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) โดยใช้ PSA และ GCB วิธีการที่ 2 วิธีการ QuEChERS (Lehotay, 2007) โดยสกัดตัวอย่างด้วย acetonitril โดยการเขย่าด้วยมือ และใช้เครื่อง centrifuge และ clean up โดยวิธี dispersive SPE โดยใช้ PSA ผลการทดสอบใช้การผ่านหลักเกณฑ์ % recovery , %RSD และ matching ของ mass ของสารเพื่อยืนยันชนิดสาร พบว่า วิธีการที่ 1 (Steinwandter (1985)) โดยมีการ clean up ตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่าวิธีการอื่น เนื่องจากตัวอย่างมีความสะอาด มีคลอโรฟิลล์น้อย และมีการลดปริมาตรตัวอย่างให้มีความเข้มข้นขึ้น ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ 9 ชนิดในปริมาณที่ต่ำระดับ 0.01 mg/kg และที่ระดับ 0.05 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารได้ 13 ชนิด วิธีการนี้ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ได้รับการรับรองห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ในปัจจุบัน จึงสามารถนำไปขยายขอบข่ายวิธีวิเคราะห์ได้ วิธีการที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีรองลงมาได้แก่ วิธีการที่ 2 QuEChERS (Lehotay, 2007) วิธีการนี้สามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดี ที่ความเข้มข้นที่ 0.05 mg/kg ขึ้นไป (ที่ 0.05 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารได้ 7 ชนิด) และที่ความเข้มข้น 1 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารได้ทั้ง 15 ชนิด แต่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สารปริมาณที่ต่ำได้ดีโดยที่ระดับ 0.01 mg/kg สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้เพียง 2 ชนิด วิธีการนี้เป็นวิธีที่น่าสนใจ เพราะง่าย ใช้สารเคมีและเครื่องมือน้อย ตัวอย่างสะอาด แต่ต้องมีการปรับวิธีโดยลดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นจึงสามารถตรวจวิเคราะห์สารในตัวอย่างที่ระดับต่ำได้ ส่วนวิธีการสกัดวิธีการที่ 1 โดยไม่มีการ clean up ตัวอย่าง เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากตัวอย่างมีความสกปรกทำให้มีปัญหากับเครื่อง GC/MS และไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สาร ปริมาณที่ต่ำได้ดี โดยที่ระดับ 0.01 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารได้เพียง 3 ชนิด วิธีการนี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดี ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg ขึ้นไป(ตรวจวิเคราะห์สารได้ 8 ชนิด) สำหรับสารที่มีปัญหาการตรวจวิเคราะห์ได้แก่ edifenphos และ iprodione ซึ่งมี response กับเครื่อง MS ต่ำ จึงต้องใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ชนิดอื่นที่เหมาะสมกว่า

คำนำ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ ว่ามีความสามารถของวิธีวิเคราะห์ว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ โดยมีปรับวิธีการตามความเหมาะสม โดยวิธีการที่ได้ต้องมีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับและมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ได้ในระดับต่ำที่น้อยกว่าหรือเท่ากับค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างที่ยอมให้มีได้ในผลผลิตทางการเกษตร (maximum residue limit : MRL) วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างมีหลายวิธี การเลือกใช้ขึ้นกับความเหมาะสมของเครื่องมือ อุปกรณ์และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน รวมทั้งต้องคำนึงถึงต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ การใช้สารเคมีต้องมีความปลอดภัย ลดการใช้สารเคมี และลดเวลาในการปฏิบัติงาน

วิธีการของ Steinwandter (1985) มีการสกัดตัวอย่างด้วย acetone และ dichloromethane โดยใช้เครื่อง homogenizer และลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator เป็นวิธีการที่กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรใช้ขอการรับรองห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างในระบบ ISO/IEC 17025 ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphorus, organochlorine, pyrethroid และ carbamate ในมะม่วง เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการมีความพร้อมทั้งด้าน เครื่องมือ อุปกรณ์และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

วิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดย Anatassiades และคณะ (2003) ใช้การสกัดโดยการเขย่าด้วยมือและเครื่อง votex mixer ส่วนการ clean up ใช้เทคนิค dispersive SPE โดยเขย่าสารละลายตัวอย่างกับสารที่ใช้ clean up วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมีความรวดเร็ว ใช้สารเคมีน้อย มีต้นทุนถูก ใช้เครื่องมือน้อยและมีประสิทธิภาพ โดยกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรได้ทำการศึกษากับสารพิษตกค้างหลายชนิด สำหรับสารกลุ่ม fungicide ได้ดำเนินการศึกษารวม 24 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, benalaxyl, biteranol, chlorothalonil, cyproconazole, difenoconazole, diflufenican, dimethomorph, epoxiconazole, flusilazole, folpet, imazalil, iprovalicarb, kresoxim-methyl, metalaxyl ,prochloraz, procymidone, propiconazole, quintozene, tebuconazole, tetraconazole, tolclofos–methyl, triadimefon และ vinclozolin ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างมะม่วง โดยใช้เทคนิค GC/MS โดยใช้ Large Volume Injection (ประชาธิปัตย์ และปฏิมาภรณ์, 2552) และมีการศึกษาสาร 10 ชนิดได้แก่ vinclozolin, metalaxyl, tetraconazole, kresoxim-methyl, cyproconazole, propiconazole, tebuconazole, epoxiconazole, chlorothalonil และ azoxystrobin ในตัวอย่างผักกาดหอม โดยใช้เทคนิค GC/MS โดยใช้ Large Volume Injection เช่นกัน (ศศิมา และคณะ, 2552) ซึ่งในการศึกษาสารพิษตกค้าง กลุ่ม fungicide 15 ชนิดในหน่อไม้ฝรั่งในครั้งนี้ ได้เลือกชนิดของสารพิษตกค้าง ที่แตกต่างจากที่เคยศึกษามาแล้ว เพื่อขยายให้สามารถตรวจชนิดของสารพิษตกค้างที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีการนำวิธีการและชนิดของสารพิษตกค้างที่เคยศึกษา มาปรับใช้เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในครั้งเดียว และนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตร อีกทั้งมีการทดสอบเพื่อตรวจวิเคราะห์พืชชนิดอื่นๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัตถุมีพิษมาตรฐาน fungicide 15 ชนิด ความบริสุทธิ์ 93.5-99.9 %

2. สารเคมี ได้แก่ acetone, dichloromethane, ethyl acetate, actonitrile, soldium sulfate, soldium chloride, sodium acetate, anhydrous magnesium sulfate, primary secondary amine (PSA) และ graphite carbon black (GCB)

3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, food processor , rotary evaporator, homogenizer และ centrifuge

4. เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิด, กระบอกตวง, บิกเกอร์ ,volumetric pipet, test tube, volumetric flask, กรวยแก้ว และ centrifuge tubes ขนาด 15 และ 50 ml

5. เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง GC/MS Single Quadrupole, Agilent:7890, MSD:5973 N

6. ตัวอย่างผัก ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง

วิธีการ

การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง fungicide 15 ชนิด ในตัวอย่าง หน่อไม้ฝรั่ง โดยทดสอบวิธีสกัด 2 วิธีการ คือ วิธีการของ Steinwandter (1985) และวิธีการ QuEChERS (Lehotay, 2007) โดยวิธีการสกัดของ Steinwandter (1985) ได้ทดสอบตัวอย่างที่ไม่มีการ clean up และตัวอย่างที่มีการ clean up ด้วยวิธี Dispersive-SPE ตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) ทำการศึกษา acuracy และ precision ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยการ spike สารที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg (วิธีการของ Steinwandter, 1985) ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 1 mg/kg (วิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003)) แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 5 ซ้ำ

เตรียมตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง โดยนำมาปั่นละเอียดด้วย food processor และชั่งน้ำหนักตามวิธีการที่ตรวจวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

1.1 วิธีการที่ 1 วิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ปรับตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003)

1.1.1 การสกัด

ตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง 25 g สกัดด้วย acetone, dichloromethane และ soldium chloride โดยใช้เครื่อง homogenizer กรองสารละลายผ่าน sodium sulfate นำสารละลาย 50 ml ไปลดปริมาตรตัวทำละลายด้วยเครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40^0 C จนเกือบแห้งแล้วเป่าด้วย แก๊สไนโตรเจนจนแห้ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml ด้วย ethyl acetate นำตัวอย่างใส่ vial และนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC/MS

1.1.2 การ clean up

นำสารละลายตัวอย่างจากการสกัดปริมาตร 2 ml ใส่ลงใน centrifuge tubes ขนาด 15 ml เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง เติม acetonitrile 2 ml เขย่าให้ละลาย เติม $MgSO_4$ 300 mg, PSA 200 mg และ GCB 50 mg ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer นาน 30 วินาที นำไป centrifuge ด้วยที่ระดับความเร็วรอบ >3,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดสารละลาย ใส่ใน GC-vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC/MS

1.2 วิธีการที่ 2 วิธีการสกัดและ clean up วิธีการ QuEChERS (Lehotay, 2007)

1.2.1 ตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง 15 g ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 ml เติม 1% acetic acid ใน acetonitile 15 ml เขย่าด้วยมือ เติม magnesium sulfate 6 g และ sodium acetate 1.5 g ปิดฝาเขย่าด้วยมือ และเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำสารละลายตัวอย่าง 5 ml ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml

1.2.2 เติม $MgSO_4$ 750 mg และ PSA 250 mg ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer นาน 30 วินาที นำไป centrifuge ด้วย ที่ระดับความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดสารละลายใส่ใน GC-vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC/MS

2. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC / MS

2.1 เครื่อง GC/MS Single Quadrupole ยี่ห้อ Agilent รุ่น Agilent-7890A, MSD:5975C

2.1.1 capillary column ชนิด DB-5MS เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิลม์ liquid phase ที่ใช้เคลือบใน column 0.25 μm carrier gas ใช้ mode : constant flow อัตราไหล 1.5 ml/นาที

2.1.2 oven อุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 60° C คงไว้นาน 6.13 นาที เพิ่มอุณหภูมิอัตรา 30° C /นาที จนถึง 150°C คงไว้นาน 2 นาที และ อัตรา 3° C /นาที จนถึง 205°C คงไว้นาน 0 นาที และเพิ่มอุณหภูมิอัตรา 10° C/นาที จนถึง 250° C คงไว้นาน 25 นาที ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง (run time) 58.9 นาที

2.1.3 inlet ใช้ Mode PTV Solvent vent ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ 60° C คงไว้นาน 3.2 นาที เพิ่มอุณหภูมิอัตรา 200° C /นาที จนถึง 320 °C ตั้งอัตราการไหลของ carrier gas ดังนี้ Vent Flow 400 มล./นาที Vent Pressure 0 psi จนกระทั่ง 3 นาที ,Vent Purge Flow to split Vent 50 มล./นาที ที่ 5.5 นาที และ gas saver 50 มล./นาที ที่ 7 นาที

2.1.4 ปริมาณสารที่ฉีด 10 μl

2.1.5 Mass Spectrometer ตั้งสภาวะของเครื่องดังนี้ อุณหภูมิ transfer line 280 °C, Quadrupole 150 °C และ MS source 230 °C ใช้ solvent delay 10 นาที ใช้ Mode SIM และใช้ Atune.u

3. **การเตรียมสารละลายมาตรฐาน**

เตรียม mixed working standard solution ของ fungicide 15 ชนิด ในสารละลายที่สกัดจาก Blank Sample ตามวิธีการสกัด เพื่อทำ calibration curve รวม 5 ระดับความเข้มข้นครอบคลุมช่วงของการวิเคราะห์

ระยะเวลา : ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ : กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ. กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง fungicide 15 ชนิด ได้แก่ caboxin, dicloran, edifenphos, etridiazole, flutolanil, fomozadon, hexaconazole, iprobenfos, iprodione, myclobutanil, oxadixyl, pyrazophos, tricyclazole, trifloxystrobin และ triflumizole ในหน่อไม้ฝรั่ง มีรายละเอียดดังนี้

1. **วิธีการสกัดและการ clean up**

หาปริมาณสารพิษตกค้างโดยเปรียบเทียบกับ calibration curve (จากสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น) มีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.995 ผลการวิเคราะห์ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับคือมี % recovery ในช่วง 60-120 (Codex, 1995) % RSD ของ Horwitz ที่ 0.01 = 21.1 % 0.05 = 16.6 % 0.5=11.7 % ค่า% RSD ที่ยอมรับคือไม่เกิน 2 เท่าของ % RSD ของ Horwitz (Horwitz, 2000) และมีการเปรียบเทียบความเหมือนของอัตราส่วนของ response ของ mass ที่เป็น Quantifier ion และ Qualifier ion เทียบกับสารมาตรฐานเพื่อยืนยันชนิดของสาร (Q value) มีค่า > 80 % แต่ที่พบส่วนใหญ่มีค่า 95-100 %

1.1 **วิธีการที่ 1** วิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ปรับตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) สรุปได้ดังนี้

วิธีการที่ไม่มีการ clean up ตัวอย่าง ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg พบว่าสารที่ผลการตรวจวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg มี 3 , 4 และ 8 ชนิดตามลำดับ(จากสาร 15 ชนิด) เนื่องจากตัวอย่างมีสี และสิ่งปนเปื้อน ที่ให้มี background ของ MS สูงไม่ผ่านเกณฑ์ % recovery และ Q value (ตารางที่ 1-2)

วิธีการที่มีการ clean up ปรับตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) พบว่าสารที่ผลการตรวจวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg มี 9 , 13 และ 13 ชนิดตามลำดับ (จากสาร 15 ชนิด) เนื่องจากมีการขจัดสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างด้วยสาร PSA และขจัดสีในตัวอย่างด้วย GCB ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลายชนิดที่ความเข้มข้นต่ำระดับ 0.01 mg/kg วิธีการนี้สามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดี ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 mg/kg ขึ้นไป (ตารางที่ 3-4) สารที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ได้แก่ edifenphos และ iprodione ซึ่งมี response กับ MS ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนชนิดของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากวิธีการที่ปรับจากวิธีของ Steinwandter (1985) พบว่าวิธีที่มีการ clean up ตัวอย่างในผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่าวิธีที่ไม่มีการ clean up ตัวอย่าง โดยวิธีที่มีการ clean up สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01 mg/kg ได้ 9 ชนิด

และ 0.05 และ 0.5 mg/kg ได้ 13 ชนิด และ วิธีที่ไม่มีการ clean up ตัวอย่างสามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ 0.01 mg/kg ได้ 3 ชนิด 0.05 mg/kg ได้ 4 ชนิด และ 0.5 mg/kg ได้ 8 ชนิด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1. ผลการทดสอบวิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) และไม่มีการ clean up ตัวอย่าง ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg ทดสอบ 5 ซ้ำ

Conc. Mg/kg	No.	Name	% Recovery						
			R1	R2	R3	R4	R5	average	%RSD
0.01	1	flutolanil	92	88	90	88	84	88	3.3
	2	hexaconazole	86	70	90	78	89	83	10.3
	3	pyrazophos	94	93	85	109	101	96	9.3
0.05	1	dicloran	99	95	102	93	89	96	5.1
	2	flutolanil	83.6	79	91	79	89	84	6.9
	3	hexaconazole	82	83	92	82	93	86	6.8
	4	pyrazophos	76	73	101	69	90	82	16.3
0.5	1	dicloran	91	104	76	89	74	87	14.0
	2	etridiazole	78	95	88	86	66	83	13.5
	3	flutolanil	84	107	68	88	71	84	18.4
	4	hexaconazole	78	102	67	85	65	79	19.0
	5	iprobenfos	86	94	72	86	73	82	11.3
	6	myclobutanil	86	113	62	89	64	83	25.2
	7	pyrazophos	99	111	79	93	72	91	17.1
	8	trifloxystrobin	103	119	76	91	66	91	23.1

ตารางที่ 2. % recovery เฉลี่ย และ % RSD ของวิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) และไม่มีการ clean up ตัวอย่าง ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg ทดสอบ 5 ซ้ำ

No.	Name	0.01		0.05		0.5	
		average	%RSD	average	%RSD	average	%RSD
1	caboxin	-	-	-	-	-	-
2	dicloran	-	-	96	5.1	87	14.0
3	edifenphos	-	-	-	-	-	-
4	etridiazole	-	-	-	-	83	13.5
5	flutolanil	88	3.3	84	6.9	84	18.4
6	fomozadon	-	-	-	-	-	-
7	hexaconazole	83	10.3	86	6.8	79	19.0
8	iprobenfos	-	-	-	-	82	11.3
9	iprodione	-	-	-	-	-	-
10	myclobutanil	-	-	-	-	83	25.2
11	oxadixyl	-	-	-	-	-	-
12	pyrazophos	96	9.3	82	16.3	91	17.1
13	tricyclazole	-	-	-	-	-	-
14	trifloxystrobin	-	-	-	-	91	23.1
15	triflumizole	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบวิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) และมีการ clean up ตัวอย่างปรับตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg ทดสอบ 5 ซ้ำ

Conc. mg/kg	No.	Name	% Recovery						
			R1	R2	R3	R4	R5	average	%RSD
0.01	1	caboxin	85	85	87	78	81	83	4.3
	2	dicloran	94	94	84	80	87	88	7.1
	3	flutolanil	79	79	84	67	73	76	8.8
	4	hexaconazole	96	96	88	75	81	87	10.5
	5	iprobenfos	83	83	79	72	67	77	9.5
	6	myclobutanil	90	90	97	77	60	83	17.6
	7	oxadixyl	95	95	97	85	90	92	5.3
	8	pyrazophos	96	96	97	83	84	91	7.8
	9	trifloxystrobin	92	92	95	83	85	90	5.7
0.05	1	caboxin	73	69	65	64	72	69	6.0
	2	dicloran	74	79	72	72	77	75	4.4
	3	etridiazole	73	72	77	74	78	75	3.4
	4	flutolanil	82	80	82	78	83	81	2.6
	5	fomozadon	67	72	68	72	83	72	8.8
	6	hexaconazole	76	73	75	72	77	75	3.0
	7	iprobenfos	85	87	80	82	85	84	3.5
	8	myclobutanil	85	71	86	81	75	80	7.9
	9	oxadixyl	87	84	84	83	88	85	2.5
	10	pyrazophos	80	79	79	77	84	80	2.9
	11	tricyclazole	74	71	74	71	77	73	3.4
	12	trifloxystrobin	82	82	82	80	84	82	2.0
	13	triflumizole	76	73	76	71	78	75	3.9
0.5	1	caboxin	81	96	94	88	90	90	6.5
	2	dicloran	88	103	82	87	86	89	8.9
	3	etridiazole	62	76	66	64	80	70	11.5
	4	flutolanil	85	111	82	78	87	89	14.4
	5	fomozadon	78	113	79	71	74	83	20.7
	6	hexaconazole	76	101	73	71	79	80	15.1
	7	iprobenfos	91	110	84	89	90	93	10.7
	8	myclobutanil	83	110	79	77	85	87	15.3
	9	oxadixyl	79	104	77	76	82	83	14.4
	10	pyrazophos	81	107	79	79	86	87	13.7
	11	tricyclazole	67	95	67	65	74	74	16.7
	12	trifloxystrobin	86	112	84	83	88	90	13.5
	13	triflumizole	81	110	56	74	85	81	24.1

1.2 **วิธีการที่** 2 วิธีการสกัดและ clean up วิธีการ QuEChERS (Lehotay, 2007) สรุปได้ดังนี้

ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 1 mg/kg ผลการศึกษา (ตารางที่ 6-7) พบว่าสารที่ผลการตรวจวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 1 mg/kg มี 2, 7, 12, 14 และ 15 ชนิดตามลำดับ (จากสาร 15 ชนิด) วิธีการนี้มีการ clean up ตัวอย่าง เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยสาร PSA จึงลดปัญหา background ของ MS สูงได้ แต่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลายชนิดที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ที่เนื่องจากวิธีการนี้ไม่มีการลด

ปริมาตรตัวอย่างทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นของสารในสารละลายต่ำเกินไป จึงไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย MS วิธีการนี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดี เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีที่ความเข้มข้น 0.05 mg/kg ขึ้นไป และที่ความเข้มข้น 1 mg/kg สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ทั้ง 15 ชนิด

ตารางที่ 4. % recovery เฉลี่ย และ % RSD ของวิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) และ มีการ clean up ตัวอย่าง ปรับตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg ทดสอบ 5 ซ้ำ

No.	Name	0.01		0.05		0.5	
		average	%RSD	average	%RSD	average	%RSD
1	caboxin	83	4.3	69	6.0	90	6.5
2	dicloran	88	7.1	75	4.4	89	8.9
3	edifenphos	-	-	-	-	-	-
4	etridiazole	-	-	75	3.4	70	11.5
5	flutolanil	76	8.8	81	2.6	89	14.4
6	fomozadon	-	-	72	8.8	83	20.7
7	hexaconazole	87	10.5	75	3.0	80	15.1
8	iprobenfos	77	9.5	84	3.5	93	10.7
9	iprodione	-	-	-	-	-	-
10	myclobutanil	83	17.6	80	7.9	87	15.3
11	oxadixyl	92	5.3	85	2.5	83	14.4
12	pyrazophos	91	7.8	80	2.9	87	13.7
13	tricyclazole	-	-	73	3.4	74	16.7
14	trifloxystrobin	90	5.7	82	2.0	90	13.5
15	triflumizole	-	-	75	3.9	81	24.1

ตารางที่ 5. % recovery เฉลี่ย (5 ซ้ำ) ของผลการทดสอบวิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) และ ไม่มีการ clean up ตัวอย่าง และมีการ clean up ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg

No.	Name	No clean up						Clean up					
		0.01		0.05		0.5		0.01		0.05		0.5	
		% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD
1	caboxin	-	-	-	-	-	-	83	4.3	69	6.0	90	6.5
2	dicloran	-	-	96	5.1	87	14.0	88	7.1	75	4.4	89	8.9
3	edifenphos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	etridiazole	-	-	-	-	83	13.5	-	-	75	3.4	70	11.5
5	flutolanil	88	3.3	84	6.9	84	18.4	76	8.8	81	2.6	89	14.4
6	fomozadon	-	-	-	-	-	-	-	-	72	8.8	83	20.7
7	hexaconazole	83	10.3	86	6.8	79	19.0	87	10.5	75	3.0	80	15.1
8	iprobenfos	-	-	-	-	82	11.3	77	9.5	84	3.5	93	10.7
9	iprodione	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	myclobutanil	-	-	-	-	83	25.2	83	17.6	80	7.9	87	15.3
11	oxadixyl	-	-	-	-	-	-	92	5.3	85	2.5	83	14.4
12	pyrazophos	96	9.3	82	16.3	91	17.1	91	7.8	80	2.9	87	13.7
13	tricyclazole	-	-	-	-	-	-	-	-	73	3.4	74	16.7
14	trifloxystrobin	-	-	-	-	91	23.1	90	5.7	82	2.0	90	13.5
15	triflumizole	-	-	-	-	-	-	-	-	75	3.9	81	24.1

ตารางที่ 6. ผลการทดสอบวิธีการ QuEChERS ((Lehotay, 2007)ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 1 mg/kg ทดสอบ 5 ซ้ำ

Conc. mg/kg	No.	Name	% Recovery						
			R1	R2	R3	R4	R5	average	%RSD
0.01	1	hexaconazole	82	71	90	95	94	86	11.7
	2	pyrazophos	85	94	91	-	-	90	5.1
0.05	1	dicloran	105	98	96	92	91	97	6.0
	2	etridiazole	102	102	105	96	92	99	5.3
	3	flutolanil	105	103	89	98	88	97	8.0
	4	hexaconazole	99	97	84	91	97	94	6.6
	5	oxadixyl	102	101	87	107	113	102	9.5
	6	pyrazophos	109	101	87	101	99	99	8.1
	7	trifloxystrobin	103	99	85	88	98	95	8.2
0.1	1	dicloran	87	85	81	100	98	90	9.3
	2	etridiazole	89	112	91	85	84	92	12.4
	3	flutolanil	75	72	76	92	87	80	10.8
	4	hexaconazole	79	76	75	92	90	82	9.8
	5	iprobenfos	83	81	78	98	88	85	9.3
	6	iprodione	74	70	74	97	89	81	14.6
	7	myclobutanil	77	74	75	95	91	82	11.8
	8	oxadixyl	76	76	70	90	94	81	12.6
	9	pyrazophos	80	80	77	99	94	86	11.3
	10	tricyclazole	89	85	84	96	91	89	5.6
	11	trifloxystrobin	77	78	74	94	87	82	10.0
	12	triflumizole	79	79	76	89	86	82	6.6
0.2	1	caboxin	74	75	72	77	74	75	2.3
	2	dicloran	91	93	108	99	94	97	6.8
	3	etridiazole	84	86	70	77	75	78	8.6
	4	flutolanil	96	97	95	94	91	95	2.5
	5	fomozadon	95	112	85	90	90	94	11.1
	6	hexaconazole	94	94	89	93	89	92	2.9
	7	iprobenfos	102	101	108	99	98	102	3.9
	8	iprodione	89	101	103	99	97	98	5.8
	9	myclobutanil	95	96	93	94	90	93	2.3
	10	oxadixyl	99	95	102	98	96	98	3.0
	11	pyrazophos	99	97	104	99	99	100	2.6
	12	tricyclazole	99	97	93	104	96	98	4.0
	13	trifloxystrobin	98	95	97	96	92	96	2.2
	14	triflumizole	94	92	94	94	88	92	2.7
1.0	1	caboxin	92	99	85	89	68	86	13.4
	2	dicloran	93	97	90	96	86	92	5.0
	3	edifenphos	76	72	81	87	80	79	6.7
	4	etridiazole	91	103	95	100	96	97	4.7
	5	flutolanil	96	100	92	93	88	94	4.7
	6	fomozadon	103	99	100	87	89	95	7.4
	7	hexaconazole	94	99	91	93	87	93	4.9
	8	iprobenfos	93	97	90	98	88	93	4.9
	9	iprodione	98	101	98	101	91	98	4.0
	10	myclobutanil	95	99	91	91	87	92	5.1
	11	oxadixyl	95	100	93	94	89	94	4.3
	12	pyrazophos	96	99	91	93	86	93	5.4
	13	tricyclazole	96	99	89	91	89	93	4.8
	14	trifloxystrobin	96	100	92	94	87	94	5.0
	15	triflumizole	91	95	87	90	82	89	5.6

ตารางที่ 7. % recovery เฉลี่ย และ % RSD ของวิธีการ QuEChERS ((Lehotay, 2007) ในตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 และ 1 mg/kg ทดสอบ 5 ซ้ำ

No.	Name	0.01		0.05		0.1		0.2		1	
		% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD	% Rec.	% RSD
1	caboxin	-	-	-	-	-	-	75	2.3	86	13.4
2	dicloran	-	-	97	6.0	90	9.3	97	6.8	92	5.0
3	edifenphos	-	-	-	-	-	-	-	-	79	6.7
4	etridiazole	-	-	99	5.3	92	12.4	78	8.6	97	4.7
5	flutolanil	-	-	97	8.0	80	10.8	95	2.5	94	4.7
6	fomozadon	-	-	-	-	-	-	94	11.1	95	7.4
7	hexaconazole	86	11.7	94	6.6	82	9.8	92	2.9	93	4.9
8	iprobenfos	-	-	-	-	85	9.3	102	3.9	93	4.9
9	iprodione	-	-	-	-	81	14.6	98	5.8	98	4.0
10	myclobutanil	-	-	-	-	82	11.8	93	2.3	92	5.1
11	oxadixyl	-	-	102	9.5	81	12.6	98	3.0	94	4.3
12	pyrazophos	90	5.1	99	8.1	86	11.3	100	2.6	93	5.4
13	tricyclazole	-	-	-	-	89	5.6	98	4.0	93	4.8
14	trifloxystrobin	-	-	95	8.2	82	10.0	96	2.2	94	5.0
15	triflumizole	-	-	-	-	82	6.6	92	2.7	89	5.6

2. **การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง** GC / MS

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง fungicide 15 ชนิด ซึ่งมี molecular weight อยู่ในช่วง 189-408 ทดสอบสภาวะของเครื่องเพื่อหา Retention Time, Quantifier ion และ Qualifier ion ที่เหมาะสม โดยการฉีดสารแต่ละชนิด ได้สภาวะของเครื่องตามวิธีการ (ข้อ 2) สารพิษตกค้างมีค่า retention time , Quantifier ion เพื่อใช้ในการหาปริมาณ และ Qualifier ion รวม 3 ion เพื่อใช้ในการยืนยันผล ดังตารางที่ 8

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง fungicide 15 ชนิด ได้แก่ caboxin, dicloran, edifenphos, etridiazole, flutolanil, fomozadon, hexaconazole, iprobenfos, iprodione, myclobutanil, oxadixyl, pyrazophos, tricyclazole, trifloxystrobin และ triflumizole ในหน่อไม้ฝรั่ง โดยเทคนิค GC/MS, Large Volumn Injection และใช้ mode SIM ผลการทดสอบใช้การผ่านหลักเกณฑ์ % recovery , %RSD และ matching ของ mass ของสารเพื่อยืนยันชนิดสาร พบว่า **วิธีการที่ 1** วิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) มีการ clean up ตัวอย่างตามวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003) ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่าวิธีการอื่น เนื่องจากตัวอย่างมีความสะอาด มีคลอโรฟิลล์น้อยเนื่องจากมีการใช้ PSA และ GCB ในการ clean up และมีการลดปริมาตรตัวอย่างทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้น ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ 9 ชนิดในปริมาณที่ต่ำระดับ 0.01 mg/kg และที่ระดับ 0.05 mg/kg สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ 13 ชนิด วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ได้รับการรับรองห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 ในปัจจุบัน จึงสามารถนำไปขยายขอบข่ายวิธีวิเคราะห์ได้ วิธีการที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์

ที่ดีรองลงมาได้แก่ **<u>วิธีการที่ 2</u>** สกัดและ clean up วิธีการ QuEChERS ((Lehotay, 2007) วิธีการนี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดี ที่ความเข้มข้นที่ 0.05 mg/kg ขึ้นไป (ที่ 0.05 mg/kg สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ 7 ชนิด) และที่ความเข้มข้น 1 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารได้ทั้ง 15 ชนิด เป็นวิธีที่น่าสนใจเพราะง่าย ใช้สารเคมีและเครื่องมือน้อย ตัวอย่างสะอาด แต่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สาร ปริมาณที่ต่ำได้ดีโดยที่ระดับ 0.01 mg/kg สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้เพียง 2 ชนิด ต้องมีการปรับวิธีโดยลดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นจึงสามารถตรวจวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างระดับต่ำได้ ส่วนวิธีการสกัด **<u>วิธีการที่ 1</u>** โดย<u>ไม่มีการ clean up ตัวอย่าง</u> เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากตัวอย่างมีความสกปรก ทำให้มีปัญหากับเครื่อง GC/MS และไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สาร ปริมาณที่ต่ำได้ดี โดยที่ระดับ 0.01 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารได้เพียง 3 ชนิด วิธีการนี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดี ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg ขึ้นไป (ตรวจวิเคราะห์สารได้ 8 ชนิด) สารที่มีปัญหาการตรวจวิเคราะห์ได้แก่ edifenphos และ iprodione ซึ่งมี response กับเครื่อง MS ต่ำ จำเป็นต้องใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ชนิดอื่นที่เหมาะสม

ตารางที่ 8. แสดงค่า Retention Time Quantifier ion และ Quantifier Ion จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph /Mass Spectrometer

No.	Name	Retention Time	Molecular Formular	m.w	Quant. ion(s) (*m/z*)	Qual. ion 1 (*m/z*)	Qual. ion 2 (*m/z*)	Qual. ion 3 (*m/z*)
1	etridiazole	12.43	$C_5H_5Cl_3N_2OS$	247.5	211	185	213	183
2	dicloran	17.56	$C_6H_4Cl_2N_2O_2$	207	176	124	206	208
3	iprobenfos	20.56	$C_{13}H_{21}O_3PS$	288.3	91	204	123	122
4	triflumizole	27.75	$C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$	345.7	278	179	206	287
6	hexaconazole	29.07	$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$	314.1	214	216	231	256
5	tricyclazole	29.19	$C_9H_7N_3S$	189.2	189	162	161	135
7	flutolanil	29.48	$C_{17}H_{16}F_3NO_2$	323.3	173	145	281	323
8	carboxin	30.03	$C_{12}H_{13}NO_2S$	235.3	143	235	87	236
9	myclobutanil	30.25	$C_{15}H_{17}ClN_4$	288.8	179	150	181	288
10	iprodione	31.59	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	330.2	187	124	244	189
11	oxadixyl	31.77	C14H19N2O4	278.3	163	120	132	133
12	edifenphos	32.61	$C_{14}H_{15}O_2PS_2$	310.4	310	201	218	173
13	trifloxystrobin	33.18	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$	408.4	116	131	132	222
14	pyrazophos	34.12	$C_{14}H_{20}N_3O_5PS$	373.4	221	373	237	232
15	famoxadone	49.71	$C_{22}H_{18}N_2O_4$	374.4	330	329	196	224

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง fungicide ในผัก
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ของห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง
4. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างในพืชอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ และปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย. 2552. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 53 ชนิด อย่างรวดเร็วด้วยวิธี QuECheRS โดยใช้ GC/MS-PTV Inlet. กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร, สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

ศศิมา มั่งนิมิตร์ ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล และวิทยา บัวศรี. 2552. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์สารกำจัดโรคพืชในผักโดยวิธี QuEChERS ด้วย Gas Chromatography/Mass Spectrometry. กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร, สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaher. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Actonitrile Extraction/Paritioning and "Dispersive solid- Phase Extraction" for determination of Pesticide Residues in Produce. J.AOAC. Int.86, 412-431.

Codex. 1995. Codex Alimentarius volume 3. Residues of Veterinary Drugs in Food.

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 Pesticides Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium sulfate : Collaborative Study. J.AOAC. Int. 90, 485-520.

Steinwandter H.1985. Universal 5 min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residue and Industral Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem. No. 1155.