การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในพืชที่มีซัลเฟอร์สูง

Method Development for Organophosphorus Pesticide Analysis in High Sulphur Content Plant

ศศิมา มั่งนิมิตร์ ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล วิทยา บัวศรี

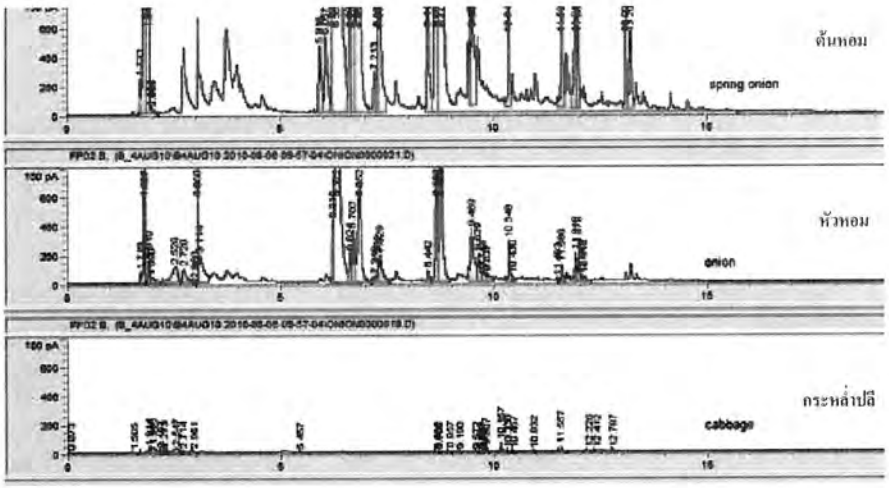
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในพืชที่มีซัลเฟอร์สูง โดยใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ที่มีหัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีสกัดสารพิษตกค้างจากวิธีต่างๆ คือ วิธี QuEChERS และ วิธีดัดแปลงจาก Steiwandter, 1985 ตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส จำนวน 21 ชนิด ทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.02 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างความเข้มข้นระดับละ 5 ซ้ำ ผลการทดสอบจาก % recovery พบว่าได้ค่าเฉลี่ยของวิธี QuEChERS เท่ากับ 70-115 % และวิธีดัดแปลงจาก Steiwandter เท่ากับ 70-118 % ตามลำดับ

คำนำ

วัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เป็นวัตถุมีพิษที่มีการใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชอย่างแพร่หลายเพราะป้องกันกำจัดแมลงได้ดี และมีราคาถูก เครื่องแกสโครมาโตกราฟชนิดหัวตรวจวัด Flame photometric detector (GC-FPD) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างวัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ให้ประสิทธิภาพของการตรวจวัดของเครื่องมือวิเคราะห์สูง แต่ปัญหาที่มักพบจากการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างพืชที่มีสารประกอบซัลเฟอร์ เช่นต้นหอม หัวหอม และกะหล่ำปลี คือตัวอย่างที่สกัดได้จะมีสารประกอบซัลเฟอร์ปนมาในตัวอย่างซึ่งจะรบกวนการวิเคราะห์ (ภาพที่ 1) มีรายงานการศึกษาการขจัดสารประกอบดังกล่าวในเบื้องต้น 2 วิธี คือนำตัวอย่างแช่แข็งแล้วนำมาบดย่อยในกรดฟอสฟอริกเจือจาง หรือให้ความร้อนระยะสั้นจากเตาไมโครเวฟแก่ตัวอย่างก่อนจะนำไปหั่นเป็นชิ้นย่อย แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีทางเคมีเพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ในพืชซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดพีครบกวนการวิเคราะห์ ซึ่งวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดคือสิ้นเปลืองเวลาและใช้สารเคมีจำนวนมากในการเตรียมตัวอย่างและเกิดการสลายตัวของสารพิษตกค้าง จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับการขจัดสารซัลเฟอร์ในตัวอย่างที่มีซัลเฟอร์สูงเพื่อลดปัญหาในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในตัวอย่างพืชดังกล่าว



ภาพที่ 1. Chromatogram ของพืชที่มีสารซัลเฟอร์สูงโดยวิธีสกัดดัดแปลงจาก Steinwandter,1985

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette, beaker, cylinder, funnel, round bottom flask, centrifuge tubes ขนาด 1.5 และ 50 มิลลิลิตร, vials for GC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, auto-pipette ขนาด 0.1- 1 มิลลิลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่งและ 2 ตำแหน่ง, Food processor, Vortex mixer, เครื่อง centrifuge

3. เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษเครื่อง Gas Chromatograph รุ่น 6890N (Agilent Technologies) ชนิดหัวตรวจวัด Flame Photometric Detector

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน กลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัส 21 ชนิด ประกอบด้วย dichlorvos, methamidophos, dicrotophos, pirimiphos-methyl, ethion, triazophos, ethoprofos, chlorpyrifos-methyl, chlorpyrifos, methyl-parathion, fenitrothion, prothiofos, diazinon, pirimiphos-ethyl dimethoate, malathion, parathion, profenofos, methidathion, phosalone และ azinphos-methyl

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดได้แก่ acetonitrile, ethyl acetate, toluene PR grade (J.T. Beaker)

3. สารเคมีทั่วไป anhydrous magnesium sulfate, sodium chloride, sodium sulfate, SPE sorbent ชนิด primary-secondary-amine (PSA)

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารและวางแผนการการทดลอง

2. เตรียมสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้ในการทดสอบให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.02-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประกอบด้วย dichlorvos, methamidophos, dicrotophos, pirimiphos-methyl, ethion triazophos, ethoprofos, chlorpyrifos-mthyl, chlorpyrifos, methyl-parathion, fenitrothion, prothiofos, diazinon, pirimiphos-ethyl, dimethoate, malathion, parathion, profenofos, methidathion, phosalone และ azinphos-methyl

3. ทดสอบในเบื้องต้นเกี่ยวกับปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการลดสารประกอบซัลเฟอร์ในพืชโดยการใช้ความร้อนจากเตาไมโครเวฟ จากนั้นทำการทดสอบโดยวิธีทางเคมี เพื่อหาประสิทธิภาพการคืนกลับได้ของวิธีการวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างต้นหอมเป็นตัวแทนทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.02, 0.05, 0.1, และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้มข้นระดับละ 5 ซ้ำ

3.1 วิธีการที่1 การสกัดโดยวิธีQuEChERSจาก Anastassiades, 2003

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัมใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างด้วย acetonitile จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ที่ความเร็วรอบสูงสุด 1 นาที เติม NaCl 1 กรัม และ $MgSO_4$ 4 กรัม เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาทีนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm. นาน 5 นาที ใช้ auto pipette ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ micro centrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร ที่ใส่ PSA 0.025 กรัม $MgSO_4$ 0.15กรัม เขย่าด้วย vortex 30 วินาที นำไป centrifuge อีกครั้ง จากนั้นใช้ autopipette ดูดสารละลายส่วนบน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรด้วยแกสไนโตรเจนจนแห้งแล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร ด้วย ethyl acetate นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/FPD

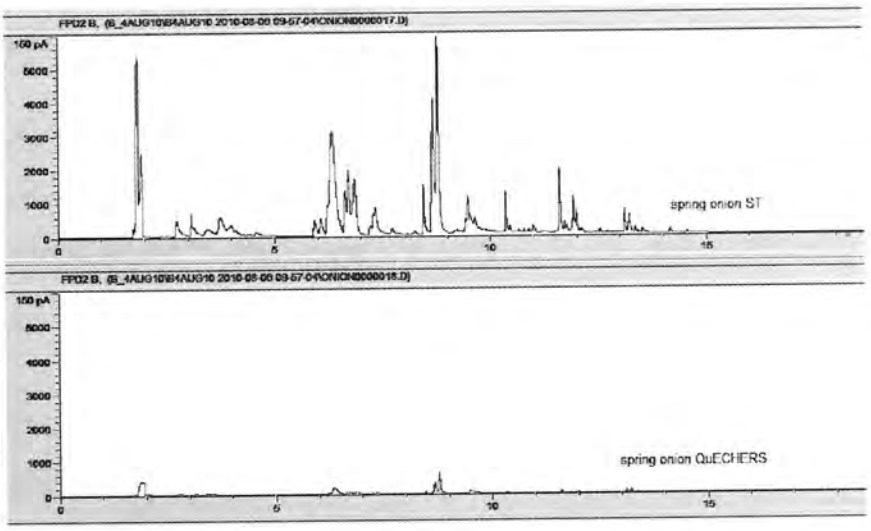
3.2 วิธีการที่ 2 การสกัดโดยวิธีการประยุกต์จาก Steinwandter,1985

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติม Acetone 50 มล. ปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer 1 นาที ที่ 11,000 รอบ/นาที. เติม dichlomethane 40 มิลลิลิตร. และ NaCl 8 กรัม ปั่นอีกครั้งนาน 1 นาที เทส่วนใสใส่ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร.ที่มีฝาปิดเติม sodium sulfate 20 กรัม เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้นาน 10 นาที กรองสารละลายผ่าน sodium sulfate ถ่ายสารที่กรองได้จำนวน 50 มิลลิลิตร.ลงใน flat bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ล้าง cylinder ด้วย dichloromethane ครั้งละ 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง รวมสารละลายใส่ใน flat bottom flask ใบเดิม นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้งด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 ^{0} C นำไปเป่าด้วยแกสไนโตรเจนจนแห้ง เติม ethyl acetate เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ด้วย GC-FPD ต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบวิธีสกัดสารพิษตกค้างจากตัวอย่างโดยวิธีดัดแปลงจาก Steinwandter,1985 และวิธี QuEChERS พบว่าตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี QuEChERS มีความสะอาดและมีพีคปนเปื้อนน้อยกว่า (ภาพที่ 2) เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างจะเกิดความร้อนจากปฏิกิริยาของ

แมกนีเซียมซัลเฟตกับน้ำซึ่งความร้อนที่เกิดอาจลดการเกิดสารประกอบซัลเฟอร์จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในพืชดังกล่าวได้ คล้ายกับการให้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ เพราะความร้อนจะทำให้เอนไซม์ในพืชสลายตัว นอกจากนั้นวิธี QuEChERS มีขั้นตอนการการขจัดสิ่งปนเปื้อน ซึ่งทำให้ตัวอย่างที่สกัดได้มีความสะอาดมากขึ้น



ภาพที่ 2. Chromatogram เปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดยวิธีดัดแปลงจาก Steinwandter,1985 (บน) และการสกัดโดยวิธี QuEChERS (ล่าง)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการคืนกลับได้ของวิธีวิเคราะห์ (% recovery) ของวัตถุพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยวิธี QuEChERS และวิธีดัดแปลงจาก Steinwandter โดยทำการทดสอบวัตถุมีพิษออร์กาโนฟอสฟอรัส จำนวน 21 ชนิด ทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.02 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างต้นหอมความเข้มข้นระดับละ 5 ซ้ำ พบว่าประสิทธิภาพการคืนกลับได้ของวิธีวิเคราะห์ (%recovery) โดยวิธี QuEChERS อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ 70-110% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดัดแปลงจาก Steinwandter พบว่าสารออร์กาโนฟอสฟอรัสบางชนิด ให้ผลใกล้เคียงกัน เช่นใน ethion ได้ค่า % recovery ที่ระดับ 0.02 0.05 0.1และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเท่ากับ 107 94 108 และ 70 % ตามลำดับ ส่วนวิธี Steinwandter ได้ 81 106107 และ 89% เป็นต้น (ตารางที่ 1) ส่วนสารบางตัวให้ค่า % recovery สูงเกินเกณฑ์ยอมรับซึ่งอาจมีผลจาก matrix effects ทำให้ได้ค่าสูงกว่าค่าที่ spike สารมาก แต่วิธี QuEChERS เกิดผลของ matrix effects น้อยกว่าวิธีดัดแปลงจาก Steinwandter

ตารางที่ 1. ผลของประสิทธิภาพการคืนกลับได้ของวิธีวิเคราะห์ QuEChERS และวิธีดัดแปลงจาก Stainwander

Pesticide	QuEChERS				Stainwander			
	Spiking level (mg/kg) n=5				Spiking level (mg/kg) n=5			
	0.02 Recovery %	0.05 Recovery %	0.1 Recovery %	0.2 Recovery %	0.02 Recovery %	0.05 Recovery %	0.1 Recovery %	0.2 Recovery %
dichlorvos	102	84	109	61	-	-	-	-
methamidophos	-	-	-	83	-	101	-	-
ethoprofos	93	99	101	60	102	67	87	-
diazion	68	76	94	56	-	-	-	-
dicrotophos	-	-	-	108	-	82	107	72
chlorpyrifos-methyl	107	111	107	70	84	-	73	86
dimethoate	88	-	-	77	116	-	-	-
pirimiphos-methyl	89	85	101	60	78	69	86	103
chlorpyrifos	91	104	115	70	-	-	-	-
pirimiphos	95	99	106	69	89	118	116	107
parathion-methyl	-	112	107	73	83	-	79	-
malathion	95	106	100	70	-	-	-	-
fenitrothion	82	101	104	67	91	88	107	-
parathion	86	98	102	63	-	-	81	-
prothiofos	79	84	96	58	70	97	102	-
profenofos	109	115	112	74	-	-	-	-
methidathion	63	109	106	77	106	-	-	-
ethion	107	94	108	70	81	106	107	89
triazophos	-	-	-	101	106	116	-	112
phosalone	-	-	109	75	-	-	-	-
azinphos-methyl	-	-	83	80	-	-	-	-

- ค่า % recovery สูงมากเกินเกณฑ์การยอมรับ

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยวิธี QuEChERS สามารถลดปริมาณสารประกอบซัลเฟอร์ในตัวอย่างพืชที่มีสารประกอบซัลเฟอร์สูง ให้ chromatogram ของตัวอย่างที่สะอาดไม่รบกวนการวิเคราะห์ เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-FPD เมื่อเทียบกับวิธีดัดแปลงจาก Stainwander ที่กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรใช้ตรวจวิเคราะห์พืชผักในปัจจุบัน ให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพการคืนกลับได้ของวิธีทดสอบวัตถุพิษกลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัส อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยขึ้นกับคุณสมบัติการละลายน้ำและคุณสมบัติอื่นๆ ของแต่ละสาร เนื่องจากวิธี QuEChERS เป็นการตรวจวิเคราะห์โดยรวม จึงอาจไม่ครอบคลุมสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่เลือกมาเป็นตัวแทนการทดสอบทั้งหมด

การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ผลการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ลดปริมาณสารประกอบซัลเฟอร์ในพืชที่มีซัลเฟอร์สูง ที่ประหยัดเวลา แรงงานและสารเคมี ซึ่งสามารถนำไปตรวจสอบความใช้ได้ เพื่อนำไปขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักเพื่อการรับรองสำหรับการส่งออก และเผยแพร่ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร และผู้สนใจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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

Wang. S., Yang. S., Ren. L., Qian. C., Liu. F. and Jiang.S. 2009. Determination of Organophorphourus Pesticide in Leek (*Allium porrum* L.) by GC-FPD. J.Chromatographia. vol.69,79-84