

การศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตตกค้างใน ผลไม้โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography/

Photo Diode Array Detector

The Study of an Appropriate Method for Some Carbamate Insecticide Residue Analysis in Fruits Using High Performance Liquid Chromatography/Photo Diode Array Detector

วิลัย เส (Wilai Sae)¹

ชุตินา คุณุสมุทร (Chutima Kukusamude)^{2*}

ทิพย์วัลย์ คำเหม็ง (Tipwon Khummeng)²

ลักขณา ลือประเสริฐ (Luksana Lueprasert)³

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างผลไม้ 5 ชนิด คือ องุ่น ชมพู พุทรา แคนตาลูป และแตงโม เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต 4 ชนิด คือ เมทโธมิล คาร์โบฟีวแรน คาร์บาริล และ เมทไรโอคาร์บ ด้วยเทคนิค HPLC/PDA พบว่าวิธีเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม คือ สกัดด้วยสารละลายผสม dichloromethane:petroleum ether:acetone (1:1:1; v/v) ระเหยแห้งในบรรยากาศไนโตรเจน ละลายด้วย 1 มิลลิลิตร ของไดคลอโรมีเทน แยกเอาสารรบกวนออกโดยผ่าน aminopropyl cartridge ซะด้วย 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน นำไประเหยแห้งอีกครั้งแล้วละลายด้วย 1 มิลลิลิตรของสารละลายผสม acetonitrile:น้ำ (20:80; v/v) วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ C₁₈ โดยเครื่อง HPLC/PDA ใช้เฟสเคลื่อนที่ระบบ gradient ดังนี้ ที่สภาวะเริ่มต้นใช้ acetonitrile:น้ำ (v/v) เท่ากับ 20:80 ที่ 30 นาที เปลี่ยนเป็นอัตราส่วน 55:45 ที่ 35-45 นาที เปลี่ยนเป็น 20:80 เเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเฉลี่ยของสารฆ่าแมลงทั้ง 4 ชนิดเมื่อเติมสารมาตรฐานเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ในองุ่น ชมพู พุทรา และ แคนตาลูป อยู่ในช่วง 82.00-102.00, 77.54-104.38, 92.48-104.82 และ 99.60-122.75 ตามลำดับ ส่วนในแตงโมที่ความเข้มข้น 0.02-0.040 ไมโครกรัม/กรัม ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน 48.87 ถึง 111.33 LOD (3 SD_b/S) และ LOQ (10 SD_b/S) อยู่ในช่วง 0.0046-0.0215 และ 0.0150-0.0717 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ได้ทดลองนำวิธีที่นำเสนอนี้มาวิเคราะห์ตัวอย่างองุ่น ชมพู พุทรา แคนตาลูป และแตงโม ที่เก็บจากตลาดรถไฟ ตลาดบางลำภู ห้างสรรพสินค้าโลตัส และห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม 2546 รวมทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง ได้ผลดังนี้ ตรวจพบเมทโธมิล ในองุ่น 7 ตัวอย่างจากองุ่น 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 63.64 เปอร์เซ็นต์ และพบคาร์บาริลในองุ่น 1 ตัวอย่างจาก 11 ตัวอย่างคิดเป็น 9.09 เปอร์เซ็นต์ พบเมทโธมิล ในชมพู 1 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่างคิดเป็น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคนตาลูป แตงโม และพุทรา ตรวจไม่พบสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตดังกล่าว ปริมาณของเมทโธมิลที่พบอยู่ในช่วง 0.0439-1.8109 และคาร์บาริลอยู่ในช่วง 0.0212-0.0232 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งไม่เกินค่าที่กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

¹นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอนแก่น

²รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอนแก่น

*corresponding author, e-mail: kchuti@kku.ac.th

Abstract

In this study, an appropriate sample preparation and analysis method for Carbamate residue in fruits using high performance liquid chromatography with a photodiode array detector are demonstrated. The studied Carbamates include methomyl, carbofuran, carbaryl and methiocarb, while the studied fruits were grape, roseapple, jujube, cantaloupe and watermelon. The appropriate sample preparation method was extraction by mixture of solvent, dichloromethane:petroleum ether:acetone (1:1:1, v/v), evaporation under nitrogen stream, dissolved in 1 ml dichloromethane, cleaning up using aminopropyl cartridge, eluted with 1% methanol in dichloromethane, evaporation to dryness in nitrogen stream, and dissolved in 1 ml of acetonitrile:water; 20:80, v/v. The optimum condition for analysis of the target pesticides using C_{18} column HPLC/PDA was as followed; gradient elution of acetonitrile and water at a flow-rate of 0.8 ml/min. At the initial state, the ratio of acetonitrile:water was 20:80 for 30 min, the ratio was changed to 55:45 and at 35-45 min to 20:80. The range of percentage recoveries obtained from the proposed method for grape, roseapple, jujube and cantaloupe fortified with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of each pesticide were 82.00-102.00, 77.54-104.38, 92.48-104.82 and 99.60-122.75, respectively, while that of water melon (fortified with 0.02 and 0.04 $\mu\text{g/g}$) was 48.87-111.33. The limit of detection ($3 SD_b/S$) and limit of quantitation ($10 SD_b/S$) varied from 0.0046-0.0215 and 0.0150-0.0717 mgL^{-1} , respectively. Twenty six fruit samples were collected from the Train station and Barnglumpoo market, Tesco Lotus and Big-C supermarket, in maung district of Khon Kaen during February 2003 to March 2003 and analysed using the proposed method. All of the target analytes were not found in water melon, jujube and cantaloupe, while methomyl was found in 7 from 11 samples of grape (63.64%), and carbaryl in 1 from 11 samples of grape (9.09%), methomyl in 1 from 8 samples of roseapple (12.5%) The content of methomyl found was 0.0439 to 1.8109 $\mu\text{g/g}$ and carbaryl was 0.0212 to 0.0232 $\mu\text{g/g}$. The quantities of methomyl and carbaryl found did not exceeded the allowed quantities according to the standard regulation of the ministry of public health.

คำสำคัญ: สารฆ่าแมลง คาร์บาเมต HPLC/PDA

Keywords: insecticide, Carbamate, HPLC/PDA

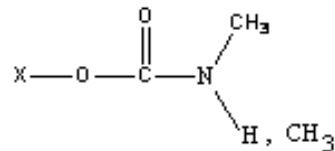
บทนำ

สารฆ่าแมลงอาจเป็นสารประกอบทางเคมีที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นหรือได้จากธรรมชาติ รวมถึงจุลินทรีย์เชื้อโรคแมลง (insect pathogen) วิธีควบคุมแมลงศัตรูพืชและสัตว์ที่นิยมแพร่หลายมากที่สุด คือการใช้สารฆ่าแมลงเคมีสังเคราะห์เนื่องจากมีข้อดีต่างๆ เช่น เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ผลรวดเร็ว เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้ง่าย สารฆ่าแมลงทุกชนิดมีอันตรายต่อมนุษย์ในระดับมากน้อยแตกต่างกัน การใช้สารฆ่าแมลงอย่างถูกต้องอาจช่วยลดปัญหาและอันตรายลงได้

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้าหาสารฆ่าแมลงชนิดใหม่ที่เป็นอันตรายน้อยมาทดแทนโดยเน้นสารฆ่าแมลงที่มีผลทางชีววิทยาเฉพาะเจาะจงต่อแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย ซึ่งได้แก่ จุลินทรีย์เชื้อโรคของแมลง สารยับยั้งการสร้างไคติน สารคล้ายฮอร์โมนและสารยับยั้งการสร้างฮอร์โมน ทำให้ไม่สามารถลอกคราบเพื่อพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ป้องกันไม่ให้แมลงทำลายต้นพืชหรือล่อแมลงมากำจัดได้ สารทำให้เป็นหมันและสารยับยั้งการกินอาหาร สารเหล่านี้มีพิษน้อยบางชนิดไม่มีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นเกษตรกรจึงมีทางเลือกมากขึ้น แต่เนื่องจากการใช้สารดังกล่าวมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ทำให้ต้องเพิ่มระยะเวลาในการให้ยาบ่อยขึ้น เกษตรกรบางกลุ่มโดยเฉพาะผู้ผลิตรายใหญ่จึงไม่ยอมรับ และยังคงใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่มีพิษสูงในการกำจัดศัตรูพืชอยู่ แม้เกษตรกรบางรายจะยอมรับและอยากใช้ แต่ในบางพื้นที่เกษตรกรไม่สามารถหาสารฆ่าแมลงเหล่านั้นจากธรรมชาติได้ จากสถิติการนำเข้าสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย พบว่ายังมีการนำเข้ามากถึงปีละเกือบสองหมื่นตัน ในบรรดาสารฆ่าแมลงที่นำเข้า สารคาร์บาเมตเป็นชนิดที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ เมทโทมิล คาร์บาริล ออกซามิล และคาร์โบฟูแรนในการกำจัดแมลงในการปลูกผลไม้พวก ฝรั่ง ชมพู่ พุทรา เงาะ สับปะรด และละมุด กำจัดหนอนใบพุทราโดยการพ่นด้วยคาร์บาริลในการปลูกองุ่นจะกำจัดไรแดงมะม่วง และเพลี้ยไฟพริกด้วยเมโทโอคาร์บ การปลูกแตงโมจะกำจัดเพลี้ยไฟ

โดยใช้คาร์โบฟูแรน ในการรองกันหลุมก่อนหยอดเมล็ด และย้ายกล้าซึ่งจะช่วยป้องกันแมลงในดินอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จากนั้นมีการใช้สารฆ่าแมลงที่มีส่วนผสมของคาร์บาริล และเมโทมิลเป็นระยะ การปลูกแคนตาลูปจะป้องกันแมลงโดยการโรยดินด้วยคาร์โบฟูแรน ตอนเริ่มปลูกและป้องกันเถาแห้งโดยฉีดพ่นด้วยคาร์บาริล ป้องกันเพลี้ยไฟโดยใช้เมโทโอคาร์บ เป็นต้น

สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต เป็นเอสเตอร์ของกรดคาร์บาเมก (carbamic acid) มีโครงสร้างโมเลกุลดังนี้



X เป็นหมู่คาร์โบไซคลิก (carbocyclic group) หรือหมู่เฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic group) หรืออนุพันธ์ของออกซิม (oxime derivative)

สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตมีทั้งหมดประมาณ 20 ชนิด เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อระบบอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ระบบประสาท กล้ามเนื้อ การหายใจ และสมอง เป็นต้น ทำให้มีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน เสมหะออกมาก กล้ามเนื้อกระตุก ม่านตาเล็ก ชัก เกร็ง และเสียชีวิตเนื่องจากกล้ามเนื้อหัวใจไม่ทำงาน (กิจชัย, 2533)

จากรายงานของกองระบาดวิทยากระทรวงสาธารณสุข พบว่าแต่ละปีมีผู้ป่วยที่ได้รับอันตรายจากการใช้สารฆ่าแมลงสูงถึงสามพันกว่าราย (กนกพร, 2544) มีผู้เสียชีวิตปีละประมาณ 20 ราย เมื่อพิจารณาถึงกลุ่มและชนิดของสารฆ่าแมลงที่เป็นสาเหตุ พบว่าเกิดจากการได้รับสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตประมาณร้อยละ 10 ดังนั้นการศึกษาปริมาณของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตที่ตกค้างในผลไม้จะทำให้ทราบข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการเลือกซื้อผลไม้โดยเฉพาะให้ผู้บริโภคที่เป็นเด็กหรือผู้ป่วยซึ่งอ่อนแอกว่าคนทั่วไป และให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนรณรงค์ และควบคุมการให้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อไป

วิธีการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตตกค้างที่ยอมรับในปัจจุบัน คือ การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตรวจวัดด้วย fluorescence detector แต่ต้องทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ที่เหมาะสมเสียก่อน หรือวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC และตรวจวัดด้วย mass spectrometer แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพงมาก ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง หน่วยงานที่ต้องเฝ้าระวังเกี่ยวกับการตกค้างของสารฆ่าแมลงโดยเฉพาะส่วนภูมิภาคไม่มีเครื่องมือดังกล่าว ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็งแล้ววิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตที่ตกค้างในผลไม้บางชนิดด้วยวิธี HPLC ที่มี photodiode array เป็น detector เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มนี้

วิธีวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (Waters 2690 separations Module Waters 996 photodiode array detector Millennium 32 Software, U.S.A.) ทาโปรแกรม gradient ของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับ column C_8 , (column sherisorb, C_8 4.6 x 250 mm Waters, Netherland) และ C_{18} (C_{18} 3.9 x 150 mm 5 mm Waters, Iceland) ในการแยกสารทั้ง 3 ชนิด ผลแสดงในตารางที่ 1, 2 และรูปที่ 1, 2

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม เมทโทมิลคาร์บาริล คาร์โบฟิวแรน และเมทไฮโอคาร์บ (ใช้ standard grade ของ Ehrenstorfer, จาก Augsburg, Germany) โดยชั่งสารมาตรฐานดังกล่าว 46.7, 7.2, 6.6 และ 4.9 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายด้วย acetonitrile แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

สร้างกราฟมาตรฐานของสารทั้ง 4 ชนิดโดยเตรียมช่วงความเข้มข้นของ เมทโทมิล 0.0752-1.2030 มิลลิกรัม/ลิตร คาร์โบฟิวแรน 0.072-1.152 มิลลิกรัม/ลิตร คาร์บาริล 0.066-1.056 มิลลิกรัม/ลิตร และเมทไฮโอคาร์บ 0.0735-1.176 มิลลิกรัม/ลิตร จากสารละลายที่เตรียมไว้ ผลแสดงในตารางที่ 3

3. ศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างผลไม้ทั้งสิ้น 4 วิธีโดยเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย (ใช้ HPLC grade ของ Merck, Germany) ที่ใช้ในการสกัดทั้งสิ้น 4 วิธี วิธีที่ 1 สกัดด้วย acetonitrile วิธีที่ 2 สกัดด้วย petroleum-ether:dichloromethane:acetone (1:1:1; v/v) วิธีที่ 3 สกัดด้วย petroleum-ether:dichloromethane (1:1; v/v) วิธีที่ 4 สกัดด้วย dichloromethane แต่ละวิธีสกัดนาน 15 นาที เมื่อวิธีสกัดที่เหมาะสมแล้วจึงศึกษาการนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ (quantitative transfer) เปรียบเทียบผลกับการใช้สารสกัดเพียงส่วนหนึ่งในการวิเคราะห์ (substoichiometry) หาค่าร้อยละการได้กลับคืน ผลแสดงในตารางที่ 4

4. ศึกษาค่าการได้กลับคืนของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตในองุ่นเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ วิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต 4 ชนิดในผลไม้ชนิดต่างๆ และเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ใช้วิธีที่นำเสนอในการวิเคราะห์หาปริมาณสารฆ่าแมลงในตัวอย่างไม่ผลไม้มาก่อน 26 ชนิด ผลแสดงในตารางที่ 5, 6 และ 7 และศึกษาความคงตัวของสารฆ่าแมลงทั้ง 4 ตัว ระหว่างการเตรียมตัวอย่างซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 วัน (เตรียมความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ) ผลแสดงในตารางที่ 8

ผลการวิจัย

1. ผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

จากการศึกษาหาค่า I_{max} (นาโนเมตร) ของสารทั้ง 4 ชนิดได้ดังนี้ เมทโทมิล (233.8) คาร์โบฟิวแรน (198.6) คาร์บาริล (220.9) เมทไฮโอคาร์บ (202.2) ในการศึกษาจึงวัดค่าการดูดกลืน ณ ความยาวคลื่นที่แสดงไว้ในวงเล็บ

1.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเมื่อวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ C_8

จากรูปที่ 1 สามารถแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ทั้ง 4 ชนิด มีค่า resolution มากกว่า 1 ใช้เวลา ประมาณ 34.35 นาที

1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC เมื่อใช้คอลัมน์ C₁₈ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC โดยฉีดสารมาตรฐานเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร เปลี่ยนแปลงสัดส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เมื่อใช้สภาวะการทดลองทั้งสิ้น 6 แบบ พบว่าแบบที่ 1 จะสามารถแยกเมทโธมิล และเมทไฮโอคาร์บได้ดี แต่มีพีคสารเมทริกซ์ในตัวอย่างซ้อนทับกับพีคคาร์โบไพวเรน และคาร์บาริล ซึ่งมีค่า resolution น้อยกว่า 0.8 และมี baseline สูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 27.99 นาที แบบที่ 2 สามารถแยกเมทโธมิล และคาร์บาริลได้ดี มี resolution มากกว่า 1 แต่คาร์โบไพวเรนและเมทไฮโอคาร์บจะซ้อนทับกันกับสารเมทริกซ์ มี resolution ต่ำกว่า 0.8 แต่ใช้เวลา 26.60 นาที แบบที่ 3 สามารถแยกสารคาร์บาเมตได้ทั้ง 3 ชนิด คือ เมทโธมิล คาร์บาริล และเมทไฮโอคาร์บได้ resolution มากกว่า 1 แต่คาร์โบไพวเรนมีพีคซ้อนทับกับเมทริกซ์มีค่า resolution ประมาณ 1 ใช้เวลา 23.40 นาที แบบที่ 4 พบว่า สามารถแยกสารคาร์บาเมตได้ทั้ง 4 ชนิดได้ resolution มากกว่า 1 และไม่มี การซ้อนทับกันกับสารเมทริกซ์ในตัวอย่างทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ดี แม้จะใช้เวลานานกว่า คือ 26.75 นาที เมื่อใช้สภาวะการทดลองแบบที่ 5 พบว่า สามารถแยกสารคาร์บาเมตได้ทั้ง 4 ชนิด resolution มากกว่า 1 แบบที่ 6 สามารถแยกคาร์บาริล คาร์โบไพวเรน และเมทไฮโอคาร์บ ได้ resolution มากกว่า 1 เมทโธมิล มีการซ้อนทับกับเมทริกซ์มีค่า resolution ประมาณ 0.8 และมี base line สูง จึงใช้สภาวะแบบที่ 4 เนื่องจากสามารถแยกสารคาร์บาเมตได้ทั้ง 4 ชนิดใช้เวลาวิเคราะห์ไม่นานเกินไป และ base line ต่ำ เนื่องจากมีพื้นที่จำกัดจะนำเสนอเฉพาะโปรแกรม gradient ของเฟสเคลื่อนที่แบบที่ 4 เท่านั้น

2. ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน

จากการศึกษาพบว่ากราฟมาตรฐานของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตจะให้ค่า correlation coefficient อยู่ระหว่าง 0.9999-1.0000 และจากสมการความสัมพันธ์ของเส้นตรงสามารถนำมาใช้ในการคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยคำนวณจาก 3 เท่า

และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณแบลนด์ทาร์ด้วยความชันของกราฟมาตรฐานตามลำดับ พบว่ามีค่า LOD และ LOQ ของสารฆ่าแมลงทั้ง 4 ชนิด อยู่ระหว่าง 0.0041-0.0119 และ 0.0137-0.0398 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลแสดงในตารางที่ 3

3. ผลการศึกษาวิธีสกัดตัวอย่างที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาพบว่า วิธีที่ 1 จะมีสารเมทริกซ์รบกวนการวิเคราะห์เพราะมีพีคเกิดซ้อนทับกับตำแหน่งของเมทโธมิลและไม่พบพีคของสารฆ่าแมลงอีก 3 ชนิด เมื่อใช้วิธีที่ 2 จะสามารถสกัดสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตได้ทั้ง 4 ชนิด วิธีที่ 3 สามารถสกัดสารกลุ่มคาร์บาเมตได้ทั้ง 4 ชนิด แต่สัญญาณที่ได้ต่ำกว่าการสกัดโดยใช้วิธีที่ 2 ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างผลไม้จึงเลือกใช้วิธีที่ 2 ซึ่งมี dichloromethane:petroleum ether:acetone (1:1:1; v/v) เป็นตัวทำละลาย สกัดเป็นเวลา 15 นาที การเปรียบเทียบจะเห็นชัดเจนขึ้นเมื่อดูจากค่าร้อยละการได้กลับคืนของสารฆ่าแมลงแต่ละตัวที่แสดงในตารางที่ 5

4. ผลการศึกษาการนำสารสกัดทั้งหมดมาวิเคราะห์ (quantitative transfer)

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารฆ่าแมลงทั้ง 4 ชนิดจากการเตรียมตัวอย่างแบบนำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์ทั้งหมดมีค่าระหว่าง 58.5 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการเตรียมตัวอย่างแบบแบ่งสารละลายที่ได้จากการสกัดมาเพียงบางส่วน ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกการเตรียมตัวอย่างแบบแบ่งสารละลายจากการสกัดมาวิเคราะห์บางส่วน (substoichiometry) โดยดูดสารละลายจากการสกัดมาวิเคราะห์ เพียง 10 มิลลิลิตร จากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั้งหมด 30 มิลลิลิตร

5. ผลการทดลองหาค่าร้อยละการได้กลับคืนและผลการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงในผลไม้ชนิดต่าง ๆ

5.1 ผลการทดลองหาค่าร้อยละการได้กลับคืน ผลการศึกษาการกลับคืนมาของสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตในองุ่นเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ตามวิธีที่ 2 ถึง 4 แสดงในตารางที่ 5 จากการศึกษา ร้อยละการได้กลับคืนของวิธีเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ 2

ถึงวิธีที่ 4 พบว่าเมื่อสกัดตามวิธีที่ 2 จะได้อ้อยละการได้กลับคืนมีค่าสูงกว่า คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 82.00-102.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีที่ 3 (55.00-72.50 เปอร์เซ็นต์) และวิธีที่ 4 (45.00-74.5 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีที่ 2 ในการเตรียมตัวอย่างผลไม้

5.2 ผลการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงในผลไม้ชนิดต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตในตัวอย่างผลไม้จำนวน 26 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6) พบว่า ตรวจพบเมโทรมิล 8 ตัวอย่าง คาร์บาริล 1 ตัวอย่าง ที่เหลืออีก 17 ตัวอย่างตรวจไม่พบสารทั้ง 4 ชนิด จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของตัวอย่างผลไม้พบว่า ร้อยละการได้กลับคืนของเมโทรมิล คาร์โบฟูวแรน คาร์บาริล และเมโทไธโอคาร์บ มีค่าอยู่ระหว่าง 99.6-111.33, 85.06-122.75, 74.38-113.42 และ 48.87-100.02 ตามลำดับ ผลแสดงในตารางที่ 7

จากตารางที่ 7 จะได้ว่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของการวิเคราะห์เมโทรมิลอยู่ในช่วง 99.60-111.33 ของคาร์โบฟูวแรน 85.06-122.75 ของคาร์บาริล 74.54-113.42 และของเมโทไธโอคาร์บ 48.87-100.02

6. ผลการศึกษาความคงตัวของสารฆ่าแมลงเป้าหมายระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารฆ่าแมลงมาตรฐานแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ผลแสดงในตารางที่ 8

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าในช่วงระยะเวลาการเตรียมตัวอย่างจะมีการสลายตัวของสารฆ่าแมลงเป้าหมายทั้ง 4 ชนิดประมาณ 6.80 ถึง 8.87 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ควรเลือกวิธีที่ใช้เวลาน้อยที่สุดเพื่อลดข้อผิดพลาดของผลการวิเคราะห์จากสาเหตุดังกล่าว

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

วิธีเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม คือ สกัดด้วยสารละลายผสม dichloromethane:petroleum ether:acetone

(1:1:1; v/v) โดยใช้ผลไม้บดละเอียด 10 กรัม เติมน้ำเกลือ NaCl 5 กรัม สกัดด้วยสารละลาย dichloromethane:petroleum ether:acetone (1:1:1; v/v) 30 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วย shaker 15 นาที ดูดน้ำด้วย Na_2SO_4 ปิเปตสารสกัดมา 10 มิลลิลิตร ระเหยแห้งในบรรยากาศไนโตรเจน ละลายด้วยไดคลอโรมีเทนแล้วกำจัดสารรบกวนด้วย aminopropyl cartridge (Ripley, 2000) ขนาด 300 มิลลิกรัม สะดด้วย 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งอีกครั้งแล้วละลายด้วยสารละลายผสม acetonitrile น้ำ (20:80; v/v) จำนวน 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/PDA โดยใช้ระบบ gradient ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (acetonitrile และน้ำ) 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่สภาวะเริ่มต้น สัดส่วนของ acetonitrile:น้ำ (v/v) คือ 20:80 ที่ 30 นาที เปลี่ยนสัดส่วนเป็น 55:45 ที่ 35-45 นาที เปลี่ยนสัดส่วนเป็น 20:80 ได้นำวิธีดังกล่าวไปวิเคราะห์ตัวอย่างผลไม้ 26 ตัวอย่าง ได้ผลดังนี้ ตรวจพบเมโทรมิลในองุ่น 7 ตัวอย่าง จาก 11 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 63.64 และพบคาร์บาริลในองุ่น 1 ตัวอย่าง จาก 11 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 12.5 ตรวจพบเมโทรมิล ในชมพู 1 ตัวอย่าง จาก 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.5 ส่วนในแคนตาลูป แตงโม และพุทรา ตรวจไม่พบสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตดังกล่าว ปริมาณเมโทรมิล และคาร์บาริลที่ตรวจพบอยู่ในช่วงไม่เกินค่าที่กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตที่ตรวจพบในผลไม้ดังกล่าวกับรายงานที่ผ่านมามีแนวโน้มลดลง

เนื่องจากสารกลุ่มนี้สลายตัวได้ง่าย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอากาศค่อนข้างร้อน และกระบวนการเตรียมตัวอย่างต้องใช้เวลานานประมาณ 2 วัน จึงได้ทดลองนำสารละลายมาตรฐานประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของทั้ง 4 ชนิด ใส่ในขวดปิดสนิททิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน พบว่าปริมาณเมโทรมิล คาร์บาริลคาร์โบฟูวแรน และเมโทไธโอคาร์บ ลดลงร้อยละ 6.8, 6.88, 8.08 และ 8.87 ตามลำดับ ดังนั้น การเตรียมตัวอย่างที่ใช้เวลาน้อยที่สุด จะให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องขึ้นด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดขอนแก่นที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข. 2544. การประเมินการได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากอาหารของคนไทย. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 43(1): 10-18.

กิจชัย ศิริรัตน์. 2533. ความรู้เกี่ยวกับสิ่งเป็นพิษตอนที่ 4. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กองมาตรฐานสิ่งแวดล้อม กระทรวงสาธารณสุข.

Ripley, B.D., Lisremore, L.I., Lerishman, P.D., Denomme, M.A., Ritter, L. 2000. Pesticide Residues on Fruit and Vegetables from Ontario, Canada, 1991-1995. *Journal of AOAC International* 83(1): 196-203.

ตารางที่ 1 แสดง โปรแกรม gradient ของ เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ C_8

Time	flow (ml/min)	water (%)	acetonitrile (%)
Initial	1	86.5	13.5
40	1	41	59
45	1	41	59
50	1	86.5	13.5
55	1	86.5	13.5

ตารางที่ 2 แสดงโปรแกรม gradient ของเฟสเคลื่อนที่แบบที่ 4

Time	flow (ml/min)	water (%)	acetonitrile (%)
Initial	0.8	80	20
30	0.8	55	45
35	0.8	80	20
45	0.8	80	20

ตารางที่ 3 แสดงสมการความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ I_{max} ค่า correlation coefficient ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่เครื่องสามารถวัดได้ (LOD) (3SD_b/S) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถวัดได้อย่างถูกต้อง (LOQ) (10 SD_b/S) ของเมโทมิล คาร์โบฟูแรน คาร์บาริล และเมโทโอคาร์บ

ชนิดของสาร	สมการความสัมพันธ์	R ²	LOD (ไมโครกรัม/ /มิลลิลิตร)	LOQ (ไมโครกรัม/ /มิลลิลิตร)
เมโทมิล	y = 83608x-309.46	1.0000	0.0042	0.0147
คาร์โบฟูแรน	y = 324835x-4351.5	1.0000	0.0041	0.0137
คาร์บาริล	y = 662461x-7169.7	0.9999	0.0119	0.0398
เมโทโอคาร์บ	y = 316027x-3900.2	1.0000	0.0085	0.0282

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 2 โดยการนำสารละลายสกัดมาวิเคราะห์ทั้งหมด

ชนิดของสาร	% Recovery
เมโทมิล	60.0 ± 3.0
คาร์โบฟูแรน	58.5 ± 3.5
คาร์บาริล	58.5 ± 3.5
เมโทโอคาร์บ	58.5 ± 3.5

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละการได้กลับคืนของการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตในอุ้งน เมื่อสกัดด้วยวิธีที่ 2, 3 และ 4

ชนิดของสาร	% Recovery		
	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3	วิธีที่ 4
เมโทมิล	102.0 ± 10	72.5 ± 7.5	74.5 ± 2.5
คาร์โบฟูแรน	92.5 ± 3.5	65.5 ± 6.5	55.5 ± 4.5
คาร์บาริล	95.5 ± 8.5	67.0 ± 2.0	60.0 ± 6.0
เมโทโอคาร์บ	82.0 ± 5.0	55.0 ± 5.0	45.0 ± 6.0

n = 3 วิธีที่ 2 สกัดด้วย petroleum-ether:dichloromethane:acetone (1:1:1; v/v) วิธีที่ 3 สกัดด้วย petroleum-ether:dichloromethane (1:1; v/v) วิธีที่ 4 สกัดด้วย dichloromethane

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตในตัวอย่างผลไม้ 26 ตัวอย่าง (แสดงเฉพาะ 9 ตัวอย่างที่ตรวจพบ และยืนยันด้วยการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ C₈)

ผลไม้	ปริมาณที่ตรวจพบ (ไมโครกรัม/กรัม)			
	เมทโธมิล	คาร์โบฟีแรน	คาร์บาริล	เมทไฮโอคาร์บ
1. องุ่นยอด (1)	0.3294 ± 0.000	ND	ND	ND
2. องุ่นม่วง (1)	ND	ND	0.0212 ± 0.0019	ND
3. องุ่นเขียว (1)	1.8100 ± 0.058	ND	ND	ND
4. องุ่นเขียว (4)	0.458 ± 0.043	ND	ND	ND
5. องุ่นเขียว (5)	0.361 ± 0.025	ND	ND	ND
6. องุ่นม่วง (2)	0.1101 ± 0.000	ND	ND	ND
7. องุ่นเขียวไม่มีเม็ด (2)	0.0618 ± 0.009	ND	ND	ND
8. องุ่นเขียวไม่มีเม็ด (3)	0.0439 ± 0.003	ND	ND	ND
9. ชมพู่ทูลเกล้า (3)	0.1034 ± 0.000	ND	ND	ND

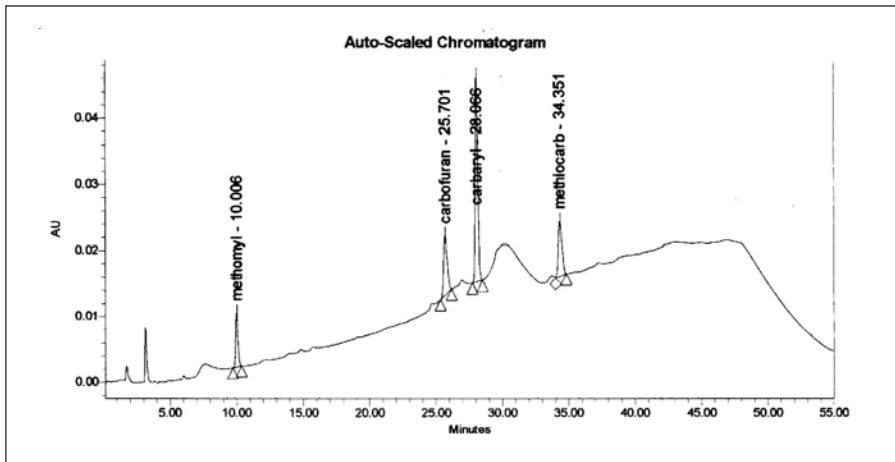
หมายเหตุ: (1) จากอำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี (2) จากห้างสรรพสินค้าโลตัส (3) จากห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี (4) จากจังหวัดพิษณุโลก (5) จากจังหวัดเลย (6) จากจังหวัดสกลนคร (7) จากอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น, n = 2, ND = Not Detected

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของการวิเคราะห์สารฆ่าแมลงทั้ง 4 ชนิดในตัวอย่างผลไม้โดยวิธีที่นำเสนอ

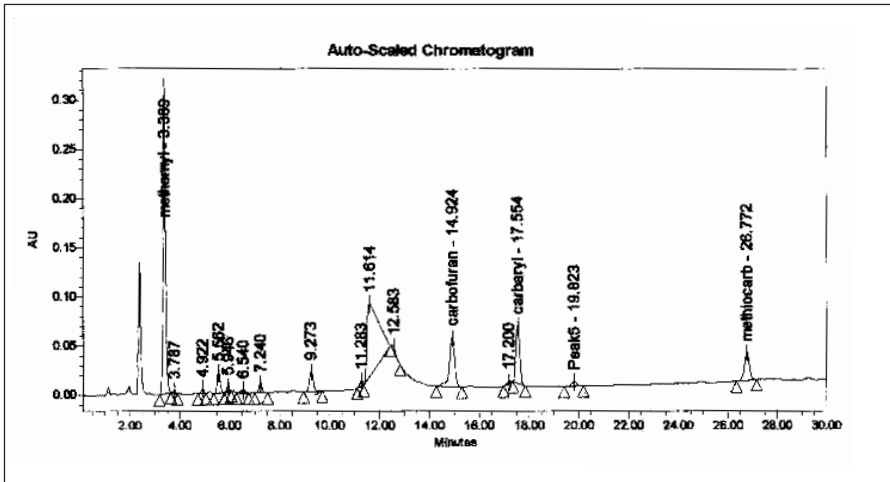
ชนิดของสาร (ความเข้มข้น ที่เติม)	% Recovery				
	องุ่น (0.1 ไมโครกรัม/ กรัม)	ชมพู่ (0.1 ไมโครกรัม/ กรัม)	พุทรา (0.1 ไมโครกรัม/ กรัม)	แคนตาลูป (0.1 ไมโครกรัม/ กรัม)	แตงโม (0.02- 0.04 ไมโครกรัม/ กรัม)
เมทโธมิล	102.00	104.38	104.82	99.60	111.33
คาร์โบฟีแรน	92.50	85.06	104.77	122.75	100.92
คาร์บาริล	95.50	74.54	83.02	113.42	91.33
เมทไฮโอคาร์บ	82.00	87.54	92.48	100.02	48.87

ตารางที่ 8 แสดงร้อยละการสลายตัวของสารฆ่าแมลงทั้ง 4 ชนิดในช่วงเวลาการเตรียมตัวอย่าง

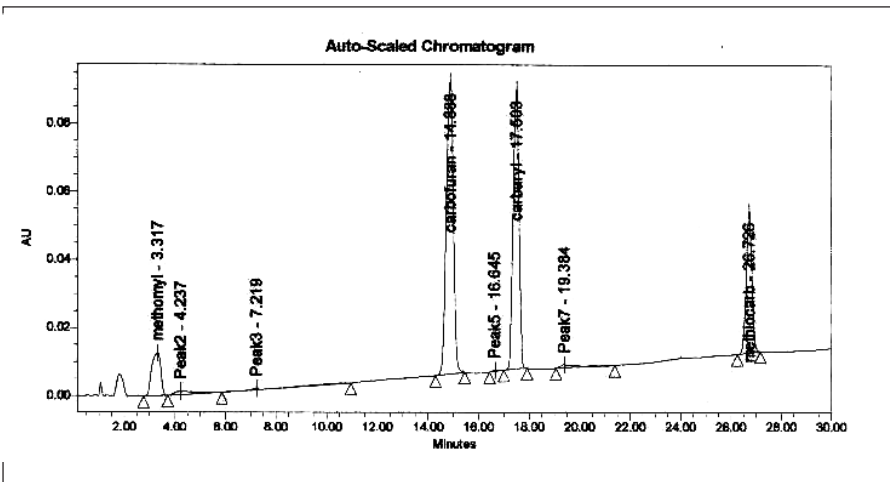
ชนิดของสาร	ค่าความเข้มข้นเริ่มต้น (ไมโครกรัม)	ค่าที่วัดได้ (ไมโครกรัม)	ปริมาณที่สลายตัว (ไมโครกรัม)
เมทโธมิล	0.9925	0.9250	0.0675 (6.80%)
คาร์โบฟิวแรน	0.9504	0.8850	0.0654 (6.88%)
คาร์บาริล	0.8712	0.8010	0.0702 (8.06%)
เมทไธโอคาร์บ	0.9702	0.8841	0.0861 (8.87%)



รูปที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสมโดยใช้คอลัมน์ C₈



(1)



(2)

รูปที่ 2 โครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลองสภาวะแบบที่ 4 (1) โครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐานเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร (2) แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลายตัวอย่างอ่อนที่เติมสารมาตรฐานเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/ลิตร