รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2550
โครงการวิจัยที่ 3060-3649

การตรวจวิเคราะห์หาอะบาเม็คตินในผลมะเขือเทศและถั่วแขกโดยใช้เทคนิคโซลิดเฟสเอ็กซ์แทรคชันและลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง

Determination of Abamectin in Tomato and Snap Bean Fruits
Using Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography

หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ.ดร.นุชนาฏ จงเลขา Assoc.Prof.Dr. Nuchnart Jonglaekha

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นายนฤพล วัฒนภาพ Mr. Naruepon Wattanapap

ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนจากมูลนิธิโครงการหลวง
กันยายน 2550

มูลนิธิโครงการหลวง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ตามโครงการวิจัยที่ 3060-3649
งบประมาณปี 2550

การตรวจวิเคราะห์หาอะบาเม็คตินในผลมะเขือเทศและถั่วแขกโดยใช้เทคนิคโซลิดเฟสเอ็กซ์แทรคชันและลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง

Determination of Abamectin in Tomato and Snap Bean Fruits Using Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. รศ.ดร.นุชนาฏ จงเลขา Assoc.Prof.Dr. Nuchnart Jonglaekha

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

2. นายนฤพล วัฒนภาพ Mr. Naruepon Wattanapap

1, 2 ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

บทคัดย่อ

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้าง ในผลมะเขือเทศและถั่วแขกด้วยเครื่องโครมาโตกราฟของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์มีดังนี้คือ ใช้คอลัมน์ชนิดคาร์บอน-18 ยาว 15 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 เซนติเมตร ขนาดตัวดูดซับ 5 ไมโครเมตร ใช้ดีเทคเตอร์แบบ fluorescence ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น excitation 265 นาโนเมตร emission 470 นาโนเมตร ใช้อะซิโตรไนไตรล์และอะซิโตรไนไตรล์/น้ำด้วยการผสมแบบ isocratic ในอัตราส่วน 97 : 3 เป็นเฟสเคลื่อนที่ กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.03 – 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร คือมีค่า regression coefficient, r^2 = 0.9998 วิธีการสกัดที่เหมาะสมคือ ใช้อะซิไตรไนไตรล์ 30 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 5 กรัม และทำความสะอาดสารสกัดตัวอย่างด้วยโซลิดเฟสเอ็กซ์แทรคชัน (SPE) ชนิดคาร์บอน-18 ระดับ LOD เท่ากับ 0.003 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ระดับ LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วิธีการวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องและแม่นยำสูง โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 96.52 ผลการวิเคราะห์สารอะบาเม็คตินตกค้างในผลมะเขือเทศหลังการฉีดพ่นทันทีและ 5 – 7 วันต่อครั้ง รวม 8 ครั้ง และในถั่วแขกทุก ๆ วัน รวม 7 ครั้ง ผลปรากฏว่าในผลมะเขือเทศสารอะบาเม็คตินที่ตกค้างลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์แรก หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างช้า ๆ แต่อัตราการลดลงของอะบาเม็คตินในพืชทั้งสองต่างกันกล่าวคือ ในถั่วแขกลดลงเร็วกว่า หลังฉีดพ่นเพียง 2 วัน ปริมาณสารตกค้างลดลงต่ำกว่าค่า MRL และเมื่อผ่านไป 5 วันไม่พบสารตกค้างเลย สารตกค้างในผลมะเขือเทศต้องใช้ระยะเวลานาน 14 วัน ปริมาณสารตกค้างจึงลดลงต่ำกว่าค่า MRL และใช้ระยะนานถึง 37 วัน จึงจะสลายตัวหมด ใช้เทคนิค SPE และ HPLC ดังกล่าววิเคราะห์ผลผลิตผัก 12 ชนิด เพื่อหาอะบาเม็คตินตกค้าง ผลปรากฏว่าไม่พบสารตกค้าง 9 ชนิด พบสารตกค้างต่ำกว่า MRL 3 ชนิด

Abstracts

A test of optimum conditions for analysis of abamectin residues in tomato and snap bean fruits was carried out with the use of HPLC. It was found that the optimum conditions for the analysis are as follows: Using carbon-18 column with 15 cm length, 0.04 cm diameter, and 0.5 µm absorbent; fluorescence detector at 365 nm excitation wave length, 470 nm emission, using acetonitrile and 10% acetonitrile/water with isocratic mixing at 97:3 rate as mobile phase with flow rate at 1.5 mL/min and 20 µL inject volume. The calibration curve had straight line at 0.03 to 2.0 mg/L; regression coefficient value, $r^2 = 0.9998$. The appropriate method for extraction was the use of 30 mL of acetonitrile/5 g sample; cleaning the sample with SPE carbon-18 at LOD level of 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg of LOQ level. This method showed high accuracy and precision with 96.52% recovery. Results from the analysis of abamectin residues in tomato fruits right after spray and at 5 – 7 days intervals for 8 times showed that the residues reduced very quickly at first week then declined slowly since then. The abamectin residue reduction in both kinds of fruit was different. The residue in snap bean reduced more quickly, only 2 days after spray, the residue dropped to lower than MRL value and none was left after 5 days. The residue in tomato fruits took 14 days to reduce to the amount lower than MRL level and took 37 days for depletion of the abamectin residue. Using SPE and HPLC technique to analyse abamectin residue in 12 kinds of vegetable produces, three of which were found of abamectin at rate lower than MRL value.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	12
ผลการทดลอง	24
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	45
กิตติกรรมประกาศ	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	55
งบประมาณและการจัดการเงินงบประมาณ	63

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.	การเลือกใช้ชนิดตัวดูดซับใน SPE Cartridge	4
2.	ความแรงของตัวทำละลาย (Solvent strength)	5
3.	Within Laboratory Method validation Criteria for Analysis of Pesticide Residues	6
4.	พื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินแต่ละระดับความเข้มข้น	26
5.	ผลการสกัดและ clean up ด้วย SPE ชนิด C-18	28
6.	ผลการสกัดและ clean up ด้วย SPE ชนิด aminopropyl	29
7.	ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg	32
8.	ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.003 mg/kg	33
9.	ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg	34
10.	ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คติน ในตัวอย่างถั่วแขกเพื่อศึกษา repeatability ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg	35
11.	ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา repeatability ในตัวอย่างถั่วแขก ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg	36
12.	ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา reproducibility ในตัวอย่างถั่วแขก จำนวน 2 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg	37
13.	ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา reproducibility ในตัวอย่างถั่วแขก จำนวน 2 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg	38

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
14.	ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา accuracy ในตัวอย่างถั่วแขก จำนวน 4 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.02 mg/kg	39
15.	ปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างในถั่วแขกหลังการฉีดพ่นในอัตราแนะนำ	41
16.	ปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างในมะเขือเทศหลังการฉีดพ่นในอัตราแนะนำ	42
17.	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะบาเม็คตินตกค้างในผลผลิตจากงานคัดบรรจุเชียงใหม่	44
18.	ร้อยละการคืนกลับในการสกัดหาปริมาณอะบาเม็คตินในตัวอย่างผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ	44

โครงการหลวง

สารบัญภาพ

ภาพ | หน้า

1. โครงสร้างโมเลกุลของอะบาเม็คติน 2

2. ขั้นตอนการใช้ SPE 3

3. การเลือกใช้ SPE โดยพิจารณาจากสมบัติการละลายของสารตัวอย่าง 4

4. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1 mg/L จะไม่พบพีคของอะบาเม็คติน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm ปริมาตรการฉีด 50 μL 24

5. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 2.0 mg/L เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm ปริมาตรการฉีด 50 μL 25

6. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 10 mg/L เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm ปริมาตรการฉีด 50 μL 25

7. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด Fluorescence ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm ปริมาตรการฉีด 20 μL 27

8. Calibration curve ของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L 27

9. โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด C-18 28

10. โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด aminopropyl 29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

11. โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด Alumina-B 30

12. โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด Silica gel 30

13. โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด graphite carbon/aminopropylsiliga gel 31

14. การสลายตัวของอะบาเม็คตินในถั่วแขก ที่ฉีดพ่นในอัตราแนะนำ 41

15. การสลายตัวของอะบาเม็คตินในมะเขือเทศ ที่ฉีดพ่นในอัตราแนะนำ 42

16. เปรียบเทียบอัตราการสลายตัวของอะบาเม็คตินในถั่วแขกและมะเขือเทศ 43

17. ขั้นตอนการชั่งตัวอย่างถั่วแขกและมะเขือเทศใน centrifuge tube 56

18. ขั้นตอนการเติมอะซิโตไนไตรล์ในตัวอย่าง 56

19. ขั้นตอนการเติมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 1 กรัมลงในตัวอย่าง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด (Salting out) 57

20. ขั้นตอนการเติมสกัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Homogenizer 57

21. ขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge 58

22. การปรับปริมาตรสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 m 58

23. ขั้นตอนการ clean up สารสกัดตัวอย่างด้วย SPE โดยใช้เครื่อง manifold 59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

24. SPE Cartridge ที่ใช้ในงานวิจัย 59

25. SPE cartridge ที่ผ่านการใช้งานแล้ว 60

26. สารสกัดตัวอย่างที่ผ่านการ clean up แล้ว 60

27. การระเหยสารสกัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Nitrogen evaporator 61

28. สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการ derivatization 61

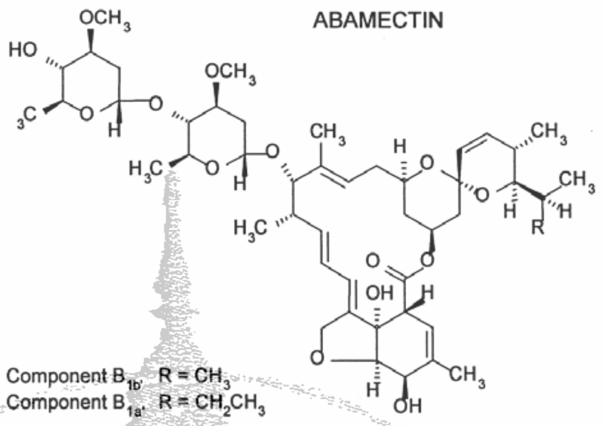
29. การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC/Fluorescence 62

โครงการหลวง

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อะบาเม็คติน (abamectin) เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดไรและแมลง เป็นสารออกฤทธิ์กำจัดแมลงแบบสัมผัสและกินตาย ออกฤทธิ์ทำลายระบบประสาท มีผลต่อเนื้อเยื่อประสาทมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนและแมลงชนิดต่าง ๆ ได้ดี ทำให้มีผู้นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งรวมถึงเกษตรกรของมูลนิธิโครงการหลวงด้วย มีความเป็นพิษ (LD_{50}) ทางปากเท่ากับ 11 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางผิวหนังเท่ากับ 330 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ในหนูทดลอง) ถึงแม้ว่า อะบาเม็คตินไม่ค่อยเป็นพิษต่อนก แต่กลับมีพิษต่อปลาและผึ้งสูง (ในปลา rainbow trout มีค่า LD_{50} เท่ากับ 3.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม สำหรับผึ้งมีค่า LD_{50} ทางการสัมผัสเท่ากับ 0.002 ไมโครกรัมกรัม/ตัวผึ้ง) (ปรีชา, 2542) อะบาเม็คตินจะสลายตัวโดยการถูกออกซิไดซ์และปฏิกิริยาการสลายตัวทางเคมีด้วยแสง ซึ่งตามปกติจะเกิดขึ้นเองในระหว่างการเพาะปลูก (Kaandorp, *et al.*, 1989) **อย่างไรก็ดีสารชนิดนี้เมื่อตกค้างในผลผลิต ชุดทดสอบ GT Pesticide Test Kit ไม่สามารถตรวจสอบได้ แม้ในปริมาณมาก เนื่องจากสารดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cholinesterase ทำให้ไม่สามารถทราบปริมาณสารที่ตกค้างในผลผลิตว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคหรือไม่** และถ้าหากสารดังกล่าวยังไม่สลายตัวและมีปริมาณสารตกค้างเกินระดับมาตรฐานที่ FAO/WHO Codex กำหนดก็จะเป็นปัญหาต่อผู้บริโภคและการส่งออก สินค้าสู่ตลาดต่างประเทศได้ ทางคณะกรรมการ Codex FAO/WHO ได้กำหนดปริมาณตกค้างสูงสุด (MRLs) ของ อะบาเม็คตินที่ยอมให้มีในผลไม้และผัก 0.01 ถึง 0.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่น (ค่า MRL ของคลอไพรีฟอสกำหนดไว้ในกะหล่ำ 0.05 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ของคาร์บาริลกำหนดไว้ที่ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการวิจัยเพื่อหาวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะบาเม็คตินในผลผลิตของโครงการหลวง อะบาเม็คตินเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ อะเวอเม็กติน (avermectin) ซึ่งมีลักษณะทางโครงสร้างเป็นวงขนาดใหญ่ (Macrocyclic) ดังภาพที่ 1 อีกทั้งยังผลิตมาจากจุลินทรีย์ในดินที่ชื่อ *Streptomyces avermitilis* อะบาเม็คตินมักจะประกอบไปด้วย avermectin B_{1a} มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมี avermectin B_{1b} น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (Pozo, 2003)



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของอะบาเม็คติน (Diserens, 1999)

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography (GC) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากเนื่องจากหากมีสิ่งสกปรกในตัวอย่างที่สามารถทำให้ Analytical column ซึ่งมีราคาแพงอุดตัน เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพการแยก (Resolution) ความไว (Sensitivity) ลดลงจนถึงคอลัมน์เสื่อมสภาพได้ และอาจเกิดพีค (peak) จากสิ่งสกปรกไปรบกวนพีคของสารที่ต้องวิเคราะห์จนไม่สามารถอ่านผลได้ สำหรับคอลัมน์ของ GC หากสกปรกหรืออุดตันอาจทำให้คืนสภาพเดิมได้ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมทำการล้างด้วยชุดล้างที่สามารถซื้อได้จากตัวแทนจำหน่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์ทั่วไป แต่สำหรับคอลัมน์ของ HPLC นั้นทำได้ยากมาก เนื่องจากจะทำให้ความดันของระบบปั๊มในเครื่องสูงเกินขีดจำกัดทำให้ระบบเครื่อง HPLC หยุดทำงาน ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดคือการป้องกันไม่ให้สิ่งสกปรกเข้าไปสะสมในคอลัมน์ โดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีขั้นตอนเหมาะสม (เพอชา, 2548)

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เทคนิคการสกัดที่ใช้กันมากที่สุดคือ Liquid-Liquid Extraction (LLE) แต่มีข้อเสียคืออาจเกิดอิมัลชัน ใช้เวลานาน ใช้เครื่องแก้วหลายชิ้นทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่าง ๆ ที่จะมารบกวนการวิเคราะห์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้มีราคาแพง และใช้ในปริมาณที่มาก ซึ่งหลังจากการใช้งานแล้วจะเป็นปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมภายหลัง ดังนั้นจึงควรลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายลง สำหรับการใช้วิธีสกัดแบบ Solid Phase Extraction (SPE) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่นำมาใช้แทนเทคนิคเดิม โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก และลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ลง วิธี SPE มีหลักการคล้ายกับ LLE ตรงที่ใช้หลักการ partition เหมือนกันแต่ต่างกันตรงที่การ partition ไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลวเหมือนกับของ LLE แต่จะเกิดระหว่างของแข็งคือ absorbent ใน SPE cartridge กับของเหลวที่เติมลงไป ข้อดีของการใช้ SPE ที่สามารถสรุปให้เห็นเด่นชัดคือ

1. ลดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ลง
2. ประหยัดเวลา
3. ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างลงคือมีการสกัด การทำให้เข้มข้นมากขึ้น และการ clean up ในขั้นตอนเดียวกัน
4. ชนิดของ SPE มีความหลากหลายสามารถเลือกใช้ให้เหมาะกับงานได้ง่าย

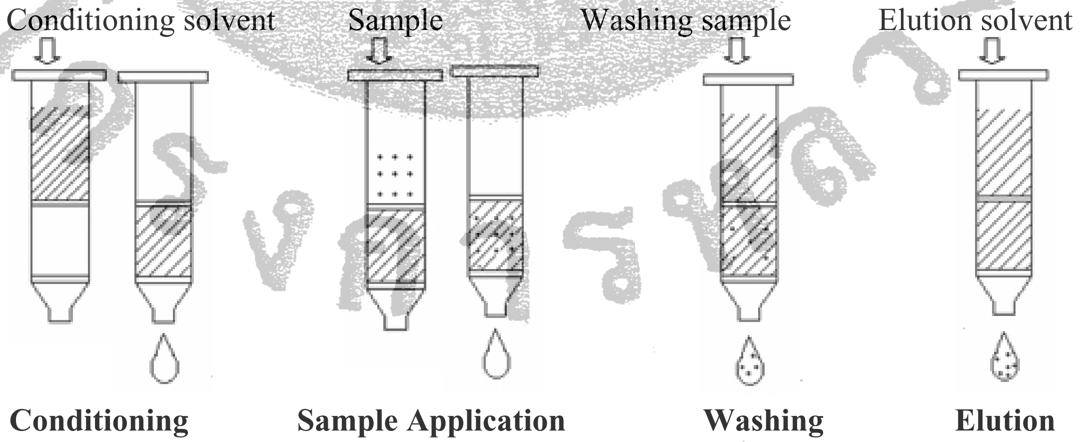
ดังนั้นจะเห็นได้ว่า SPE เป็นเทคนิคที่ช่วยลดความยุ่งยากของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และขจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ออกไป จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และยืดอายุการใช้งานคอลัมน์ วิธีการใช้ SPE มี 4 ขั้นตอน คือ

1. Conditioning เป็นการเตรียมตัวดูดซับให้พร้อมที่จะรองรับตัวอย่าง ด้วยตัวทำละลายชนิดที่เหมาะสมไม่มีขั้ว เช่น เมธานอล คลอโรฟอร์ม แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหรือบัฟเฟอร์ โดยต้องระวังไม่ให้ตัวดูดซับในคอลัมน์แห้ง

2. Sample Application หรือ Loading เป็นขั้นตอนที่ใส่ตัวอย่างลงไปในคอลัมน์เพื่อจับกับตัวดูดซับใน SPE cartridge

3. Washing เป็นการล้างเพื่อขจัดสารปนเปื้อน หรือสารที่ไม่สามารถจับกับตัวดูดซับออก

4. Elution เป็นการชะเอาสารที่สนใจออก โดยใช้สารละลายที่มีความแรงพอที่จะไปแทนที่สารที่ต้องวิเคราะห์ ซึ่งจับกับตัวดูดซับ ดังภาพที่ 2



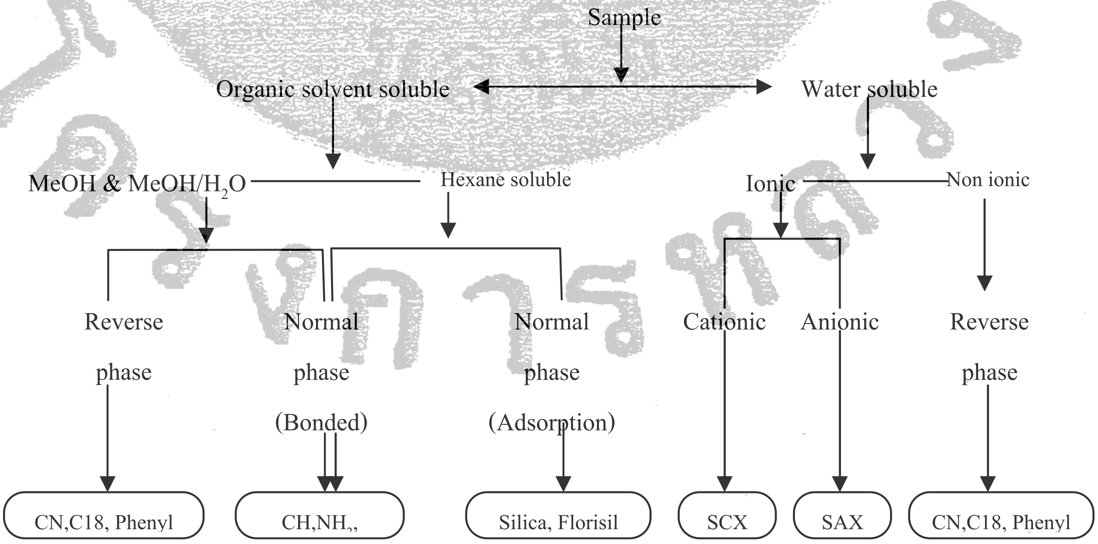
ภาพที่ 2 ขั้นตอนการใช้ SPE (Baker, 1991)

การเลือกใช้ตัวดูดซับในเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ควรเลือกตัวดูดซับที่มีสภาพขั้วให้ตรงกับสารที่ต้องการจะแยก ในการแยกสารที่สนใจหรือที่ต้องการแยกหากเป็นสารที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic) การเลือกตัวดูดซับที่เหมาะสมควรจะมีคุณสมบัติเหมือนกันคือไม่มีขั้ว เช่น คาร์บอน –18 (C18) ลักษณะของการนำมาใช้จะอยู่ในรูปของ bonded silica โดยตัวดูดซับชนิดคาร์บอน–18 นี้สามารถใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำ โดยใช้ในการแยกสารจำพวกที่ไม่มีขั้วออกจากสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย สามารถพิจารณาเลือกใช้ตัวดูดซับได้ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเลือกใช้ชนิดตัวดูดซับใน SPE Cartridge (Alltech, 2002)

รูปแบบการทำงาน (Mode)	ชนิดของตัวดูดซับ (Sorbent type)	คุณสมบัติของตัวดูดซับ	การวิเคราะห์
Reversed phase	C18, C8, C4, C2, Cyclohexyl, Phenyl	Hydrophobic bonded silica ไม่มีขั้วหรือมีขั้วปานกลาง	ใช้แยกสารไม่มีขั้วหรือสารกลุ่ม hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous solution
Normal phase	Silica, Florisil, Amino, Cyano, Diol, Alumina	Hydrophilic มีขั้ว	ใช้แยกสารที่มีขั้วออกจาก non-polar solution
Anion exchange	SAX	Anionic compound	ใช้แยกสารที่ไอออนประจุลบ
Cation exchange	SCX	Cationic compound	ใช้แยกสารที่ไอออนประจุบวก

นอกจากนี้ยังสามารถเลือกชนิดของ SPE โดยพิจารณาจากสมบัติการละลายของสารที่สนใจได้ ดังภาพที่ 3 (Alltech, 2002)



ภาพที่ 3 การเลือกใช้ SPE โดยพิจารณาจากสมบัติการละลายของสารตัวอย่าง

สิ่งที่ควรคำนึงถึงการใช้ SPE คือการเลือกใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการชะ (Elution) และอัตราการไหล (Flow rate) ซึ่งมีผลโดยตรงต่อร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของสารที่สนใจ หลักการเลือกชนิดของตัวทำละลายขึ้นกับชนิดของตัวดูดซับใน SPE cartridge โดยทั่วไปตัวดูดซับชนิดที่เป็น reverse phase จะใช้ตัวทำละลายมีขั้วน้อยไปจนถึงไม่มีขั้ว สำหรับ normal phase จะเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจนถึงมีขั้วมาก ส่วน anion exchange บัฟเฟอร์ที่แรงหรือค่า pH ต่ำ

สำหรับ cation exchange จะใช้บัฟเฟอร์ที่แรงหรือค่า pH สูง นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงความแรงของตัวทำละลาย (Solvent strength) ซึ่งตัวทำละลายที่มีความแรงมากจะสามารถชะสารที่สนใจออกมาได้มากและเร็ว แต่ก็สามารถชะเอาสารที่เป็นสารปนเปื้อนหรือ matrix ออกมาด้วย ดังนั้นจึงต้องเลือกที่ตัวทำละลายที่มีความแรงเหมาะสมกับสารที่สนใจและตัวดูดซับ คือมีความแรงพอที่จะชะสารที่สนใจออกมาแต่ไม่ทำให้สารปนเปื้อนถูกชะออกมาด้วย หลักการเลือกใช้ตัวทำละลายคือ ขั้นตอนการ washing ควรเลือกใช้ตัวทำละลายชนิด weak elution strength และขั้นตอนการ elution ควรเลือกใช้ตัวทำละลายชนิด strong elution strength ในขั้นตอนการเติมตัวอย่างหรือการ loading ตัวทำละลายที่ใช้ควรมีความแรงที่เหมาะสม ไม่ควรจะมีความแรงมากเกินไปเนื่องจากจะทำให้สารตัวอย่างถูกชะออกมาจาก SPE จนหมดแทนที่จะถูกดูดซับไว้ในคอลัมน์

ตารางที่ 2 ระดับความแรงของตัวทำละลาย (Solvent strength) ชนิดต่าง ๆ (Alltech, 2002)

Normal phase elution strength	Solvent	Reverse phase elution strength
Weak ↓	Hexane	Strong ↑
	Isooctane	
	Carbon tetrachloride	
	Chlorofrom	
	Methylene chloride	
	Tetrahydrofuran	
	Ethyl ether	
	Ethyl acetate	
	Acetone	
	Acetonitrile	
	Isopropanol	
	Methanol	
Strong	Water	Weak

อัตราการไหลของตัวทำละลายในขั้นตอนการปรับสภาพ (Conditioning) ไม่เกิน 25 mL/min ขั้นตอนการเติมตัวอย่าง (Loading) ลงใน SPE และขั้นตอนการชะ (Elute) ต้องใช้ไม่เกิน 10 mL/min เพื่อให้ได้การคืนกลับของสารที่ดี แต่ในบางครั้งสามารถยอมรับได้ที่อัตราการไหล 20 mL/min

ในปัจจุบันวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อะบาเม็คตินคือใช้เครื่อง LC-MS หรือ LC-MS-MS ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวมีราคาสูงมาก สำหรับการวิจัยครั้งนี้ทำการหาเทคนิคการวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้างในผักและผลไม้ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง โดยอะบาเม็คตินที่ตกค้างจะถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้เทคนิคการสกัดแบบวัฏภาคของแข็ง (SPE) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) ซึ่งใช้คอลัมน์แบบวัฏภาคกลับ (Revert phase) และตัวตรวจวัด (Detector) เป็น UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm หรือทำเป็นอนุพันธ์ (Derivatised) ด้วย trifluoroacetic anhydride กับ 1-methylimidazole แล้วตรวจวัดด้วย fluorescence ที่ excitation 365 nm และ emission 470 nm โดยใช้พารามิเตอร์ทางสถิติตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) ดังนี้

1. ความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Accuracy) ประเมินจากค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไปอย่างน้อย 10 ซ้ำ

$$\%Recovery = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2 / C) \times 100$$

โดย $\bar{x}_1$ = ปริมาณที่วิเคราะห์ได้

$\bar{x}_2$ = ปริมาณที่มีอยู่เดิมในตัวอย่าง

C = ปริมาณที่เติมลงในตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับจะขึ้นกับระดับความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Within Laboratory Method validation Criteria for Analysis of Pesticide Residues

Concentration	Repeatability %CV	Reproducibility %CV	Range of Mean %Recovery
≤ 1 μg/kg	35	53	50-120
> 1 μg/kg ≤ 0.01 mg/kg	30	45	60-120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	20	32	70-120
> 0.1mg/kg ≤ 1 mg/kg	15	23	70-110
> 1 mg/kg	10	16	70-110

ที่มา : GUIDELINES ON GOOD LABORATORY PRACTICE IN RESIDUE ANALYSIS., CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003. page 25.

2. ความแม่นยำของวิธีทดสอบ (Precision) ประเมินจากร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไปอย่างน้อย 10 ซ้ำ

$$\%CV = (SD / \bar{x}) \times 100$$

โดย SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยปริมาณสารตกค้างในตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับจะขึ้นกับระดับความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง โดยต้องไม่เกินค่าที่ระบุในตารางที่ 3 ซึ่งจะแบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ

2.1 ความแม่นยำจากการทำซ้ำ (Repeatability) คือคำนวณจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในชุดเดียวกัน วันเดียวกัน ผู้ปฏิบัติคนเดียวกันหรือใช้เครื่องมือวิเคราะห์เครื่องเดียวกัน

2.2 ความแม่นยำจากการทำใหม่ (Reproducibility) คือคำนวณจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต่างชุดเดียวกัน ต่างวันวิเคราะห์ ต่างผู้ปฏิบัติหรือต่างเครื่องมือวิเคราะห์

3. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงความสามารถของวิธีทดสอบในการตรวจพบสารตกค้างในตัวอย่าง โดยบอกเป็นระดับความเข้มข้น (mg/kg) ที่ต่ำสุดในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้ ประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไปในปริมาณต่ำ ๆ จำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า LOD โดยประมาณ

$$LOD_{approx} = 3 \bullet SD$$

โดย LOD_{approx} = ค่า LOD โดยประมาณ

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากนั้นทำการยืนยันค่าที่ได้โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ LOD_{approx} จากนั้นทำการทดสอบซ้ำ 10 ซ้ำ

เกณฑ์การยอมรับคือต้องมีพื้นที่ใต้พีคหรือความสูงพีคมากกว่า noise 3 เท่า

4. ปริมาณต่ำสุดที่ปริมาณได้ (Limit of quantitation, LOQ) เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงความสามารถของวิธีทดสอบในการหาปริมาณสารตกค้างในตัวอย่าง โดยบอกเป็นระดับความเข้มข้น (mg/kg) ที่ต่ำสุดในตัวอย่างที่สามารถบอกปริมาณเป็นตัวเลขได้ ประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไปในปริมาณต่ำ ๆ จำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า LOQ โดยประมาณ

$$LOQ_{approx} = 10 \bullet SD$$

โดย LOQ_{approx} = ค่า LOQ โดยประมาณ

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากนั้นทำการยืนยันค่าที่ได้โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ LOQ_{approx} จากนั้นทำการทดสอบซ้ำ 10 ซ้ำ

เกณฑ์การยอมรับคือต้องมี %recovery ผ่านเกณฑ์ตามตารางที่ 3

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาหาวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์หาอะบาเม็คตินตกค้างในผลผลิตของโครงการหลวง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

หาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะบาเม็คตินในผลมะเขือเทศและถั่วแขก เพื่อให้สามารถนำผลการทดลองมาประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์ผลผลิตชนิดอื่น ๆ ของมูลนิธิโครงการหลวง

1.4 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สกลวรรธก์และคณะ (2548) ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์อะบาเม็คตินในพืช ผักและผลไม้โดยใช้วิธี LC-MS โดยพัฒนามาจากวิธีของ K. Yoshii *et al.*, (2000) และ P. Satter ของบริษัท Syngenta Crop Production Limited ได้ค่า LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg สำหรับรายงานจากต่างประเทศงานวิจัยส่วนใหญ่มักจะเป็นการตรวจวิเคราะห์หาอะบาเม็คตินและสารกลุ่มเวอร์เมคตินในพืชผล เนื้อเยื่อสัตว์ เลือด น้ำนม ดินและน้ำ ดังนี้

Kaandorp (1989)ได้ทำการสกัดอะบาเม็คตินในตัวอย่างผลแตงกวา 100 g ด้วย ethyl acetate 200 mL ในโถปั่น ทำการกรองกากออกด้วย Buchner funnel ขจัดน้ำออกด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ระเหยสารละลายจนแห้งแล้วละลาย residue ด้วย hexane แล้วนำไป clean up ด้วย aminopripyl SPE โดยล้าง cartridge ด้วย hexane, toluene, methylene cholide อย่างละ 3mL จากนั้นชะสารอะบาเม็คตินออกมาจาก cartridge ด้วยสารละลายผสม methylene chloride/acetone (1:2) นำสารสกัดไประเหย แล้วละลายใน methanol นำตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC/DAD ที่ความยาวคลื่น 245 nm โดยใช้ acetonitrile/water (70:30) อัตราการไหล 1.5 mL/min เป็น mobile phase ผลพบว่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 86% และ %CV เท่ากับ 5%

Cobin (1989) ทำการสกัด abamectin ตกค้างในแตงกวาด้วย methanol สารละลายที่ได้นำมาล้างด้วย iso-octane และผ่านคอลัมน์ C-8 ที่ต่ออยู่กับคอลัมน์ aminopropyl แล้วทำการชะด้วย methanol นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกไป และทำให้เกิดสารอนุพันธุ์แล้วตรวจสอบด้วย HPLC โดยใช้ Flucorescence detector พบว่า Recoveries อยู่ใน

ระดับพอใช้ แต่ recoveries ของอนุพันธุ์ 8,9-Z-avermectin B_{1a} ส่วนใหญ่อยู่ที่ 70% ซึ่งต่ำกว่า recoveries ของ avermectin B_{1a} และ B_{1b}

Trainor (1991) ทำการศึกษา 8,9-Z-avermectin B_{1a} ที่เกิดการสูญหายไปกับ emulsions ในขั้นตอนการทำ solvent partition โดยพบว่าในขั้นตอนดังกล่าวต้องทำการเขย่าเบา ๆเพื่อป้องกันการเกิดชั้น emulsion ให้น้อยที่สุด

Hicks (1992) ได้ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ abamectin ในผลแอปเปิ้ลและผลแพร์ โดยขั้นตอนแรกทำการเตรียมตัวอย่างด้วย pectinase เพื่อไฮโดรไลส์เพ็คตินแล้วทำการสกัดด้วย acetonitrile/water เจือจางสารสกัดด้วยน้ำจากนั้น เติมสารละลายผ่านคอลัมน์ C-8 ทำการชะสาร abamectin ออกจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile จากนั้นเจือจางสารละลายด้วยน้ำ abamectin จะละลายอยู่ในชั้น hexane ที่ได้จากการขั้นตอน solvent partition แล้วนำส่วนของสารละลาย hexane มาทำการ clean up ด้วยคอลัมน์ aminopropyl เพื่อให้ได้สารสกัดที่พร้อมจะนำเข้าสู่ขั้นตอนการทำให้เกิดอนุพันธุ์และทำการตรวจสอบด้วย HPLC ค่า LOD สำหรับแอปเปิ้ลและลูกแพร์คือ 0.002 mg/kg ค่า recoveries ที่ดี ที่ได้จากการ spike sample ของแอปเปิ้ลและลูกแพร์ สำหรับ avermectin B_{1a} มีค่า recoveries อยู่ในช่วง 0.00197-0.079 mg/kg , avermectin B_{1b} 0.0038-0.0059 mg/kg และ 8,9-Z-avermectin B_{1a} 0.0046-0.070 mg/kg

Wehner (1992) ทำการสกัดตัวอย่างด้วย methanol แล้วเจือจางด้วยน้ำนำไปผ่านคอลัมน์ C-8 สาร abamectin จะถูกยึดไว้ในคอลัมน์ ชะสารออกจากคอลัมน์ C-8 ผ่านไปยังคอลัมน์ aminopropyl ด้วย methanol นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นทำให้เกิดอนุพันธุ์โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมระหว่าง trifluoroacetic anhydride และ 1-methylimidazole ใน acetonitrile ค่า LOD ที่ได้คือ 0.005 mg/kg

Morneweck (1992) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ abamectin ในกากแอปเปิ้ล, น้ำแอปเปิ้ล และซอสแอปเปิ้ล ทำการสกัด abamectin จากกากแอปเปิ้ลที่แห้งหรือเปียกด้วยสารละลายผสม hexane/water/acetonitrile ส่วนน้ำแอปเปิ้ลและซอสแอปเปิ้ลทำการสกัดด้วย acetonitrile/water จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ผ่านคอลัมน์ C-8 ชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile โดยที่คอลัมน์ aminopropyl จะทำการขจัดสิ่งปนเปื้อนของสารสกัดที่ได้ จากนั้นทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ abamectin ในผลแอปเปิ้ลและผลแพร์ พบว่า recoveries ของ 8,9-Z-avermectin B_{1a} ไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งค่าจะอยู่ประมาณ 70 % แต่ recoveries สำหรับ avermectin B_{1a} และ B_{1b} สูงกว่า

Kvaternick (1993) ได้ validate วิธีการวิเคราะห์ abamectin B_{1a} B_{1b} และ 8, 9-Z-avermectin ในมันฝรั่ง พบว่า recovery ที่ดีสำหรับ avermectin B_{1a} อยู่ในช่วง 0.005-

0.100 mg/kg, avermectin B_{1b} คือ 0.0049 mg/kg และ 8, 9-Z-avermectin อยู่ในช่วง 0.005-0.050 mg/kg

Cobin (1995) ศึกษาวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างผลแอปเปิ้ล โดยละลายตัวอย่างที่ได้จากการแช่แข็ง ตัวอย่างจะผ่านการบดด้วย Horbart food processor และจัดเก็บในลักษณะแช่แข็ง จากนั้นนำมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันในสารละลาย acetonitrile น้ำ และ hexane สาร abamectin จะละลายอยู่ในชั้นของ hexane นำไปผ่านคอลัมน์ aminopropyl ที่มี sodium sulphate เพื่อดูดซับน้ำ ล้างคอลัมน์ด้วย hexane, toluene และ dichloromethane ทำการชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย acetone/dichloromethane นำสารละลายที่ได้มาทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้สารอนุพันธุ์แล้วทำการตรวจสอบด้วย HPLC

Diserens (1999) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอะบาเม็คตินในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยใช้อะซิโตไนไตรล์สกัดตัวอย่างและ clean up ด้วย C-18 SPE แล้วชะ cartridge ด้วยอะซิโตไนตรล์ นำสารสกัดที่ได้ไปทำ derivatisation แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/Fluorescenc พบว่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 88-106%

Martin (2001) ได้ทำการสกัดตัวอย่างตับสัตว์ด้วยอะซิโตนและเฮกเซน นำสารสกัดที่ได้ไป clean up ด้วย alumina SPE และ C-18 SPE นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS ใช้สารละลายผสม methanol/acetonitrile/1%triethylamine ใน phosphoric acid (61:30:9) อัตราการไหล 1 mL/min เป็น mobile phase พบว่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 73-97% มีค่า %CV ต่ำกว่า 14% ค่า LOD เท่ากับ 2 ppb

Pozo (2003) ได้ทำการสกัดอะบาเม็คตินและอะซาไดแร็คตินในผลส้มด้วยอะซิโตไนไตรล์และโซเดียมอะซิเตทในโถปั่น แล้วนำสารสกัดที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-ESI-MS-MS ผลพบว่าร้อยละการคืนกลับมากกว่า 80% มีค่า %CV จากการทำ repeatability <10 และ LOD ของวิธีต่ำกว่า 0.007 mg/kg

United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science (2003) ได้จัดทำวิธีปฏิบัติงานสำหรับวิเคราะห์สาร Ivermectin, Doramectin, Moxidectin และ abamectin การสกัดใช้อะซิโตไนไตรล์ผสมกับ trimetnylamine เติมลงในตัวอย่างแล้วนำไปเขย่าด้วย Vertex จนแยกชั้น นำชั้นตัวทำละลายไประเหยจนแห้ง แล้วละลาย residue ด้วย acetonitrile ทำการเจือจางด้วยน้ำ ผ่านสารสกัดลงใน SPE ชนิด C-8 ล้าง cartridge ด้วย hexane จากนั้นต่อเข้ากับ alumina-B SPE แล้วชะ C-18 cartridge ด้วยสารละลายผสม methylene chloride/ethyl acetate (3:1) ทิ้งสารที่ชะและดึงเอา C18 cartridge ออกไป ชะ alumina cartridge ด้วย acetone 1 mL และ methanol 4 mL นำสารละลายที่ได้ไประเหยและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง

LC/APCI/MS โดย mobile phase เป็นสารละลายผสมของ acetonitrile/water/acetate buffer (70:25:5)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบวิธีการตรวจวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้างในผักและผลไม้ของโครงการหลวง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. **การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimum condition) ในการตรวจวิเคราะห์อะบาเม็คติน** โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งมีดีเทคเตอร์แบบ UV/Visible ที่ความยาวคลื่น 245 nm และเปรียบเทียบกับดีเทคเตอร์แบบ fluorescence ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm โดยใช้ mobile phase เป็น Water และ Acetonitrile เพื่อหาอัตราส่วนผสมและอัตราการไหลของ mobile phase ที่เหมาะสม

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดปริมาตร (Volumetric flask, class A) ขนาด 10 ml และ 100 ml
2. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 ไมโครลิตร และ 1 ml
3. เครื่องชั่งละเอียด (Electronic balance) ทศนิยม 5 ตำแหน่ง
4. เครื่องระเหยสารด้วยก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen Evaporator)
5. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ดีเทคเตอร์ชนิด UV/visible ยี่ห้อ DIONEX คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm รูปทรง sphere shape
6. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph ดีเทคเตอร์ชนิด Fluorescence ยี่ห้อ Waters คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm รูปทรง sphere shape ยี่ห้อ Waters
7. Solid phase extraction cartridge (SPE) 5 ชนิดคือ C-18, NH_2, Siliga gel, Alumina-B, graphitecarbon/aminopropyl ขนาดความจุตัวดูดซับ 500 mg
8. Nylon membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 µm
9. Cellulose acetate membrane filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4.7 cm ขนาดรูพรุน 0.45 µm
10. PTFE membrane filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4.7 cm ขนาดรูพรุน 0.45 µm

1.2 สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. Acetonitrile HPLC grade
2. Abamectin primary standard
3. Trifluoroacetic anhydride (TFAA)
4. 1-methylimidazole
5. สาร derivatization reagent 1 : สารละลายผสม trifluoroacetic anhydride : acetonitride อัตราส่วน 1:2 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C เตรียมใหม่ทุกวัน
6. สาร derivatization reagent 2: สารละลายผสม 1-methylimidazole อัตราส่วน 1:1 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C เตรียมใหม่ทุกวัน
7. สารละลายปรับสภาวะ (conditioning solution) สำหรับ SPE C-18 ผสม acetonitrile 30 mL กับน้ำ 70 mL เติม เขย่าให้เข้ากัน
8. วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) 100% acetonitrile เป็น mobile phase A และ10% acetonitrile ในน้ำ เป็น mobile phase B

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Preparation of standard solution)

1. สารละลายมาตรฐานสต๊อก (Stock standard) เข้มข้น 50 mg/L เตรียม โดยชั่ง Abamectin จำนวน 5.0 mg ละลายใน acetonitrile แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mLด้วย acetonitrile

2. สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นระดับกลาง (Intermediate standard) เข้มข้น 10 mg/Lเตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานสต๊อก เข้มข้น 50 mg/L ปริมาตร 2 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกวัดปริมาตรด้วย acetonitrile

3. สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นระดับต่ำ เข้มข้น 1 mg/L เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 1 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกวัดปริมาตรด้วย acetonitrile

4. สารละลายมาตรฐานระดับความเข้มข้นใช้งาน (working standard) สำหรับเตรียม calibration curve เข้มข้น 0.03, 0.05 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L ปิเปตสารละลายมาตรฐาน เข้มข้น 1 mg/L ปริมาตร 15,25, 50, 100, 250, 500, และ 1000 µL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL ไประเหยภายใต้ไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง เติม derivatisation reagent 1 ปริมาตร 300 µL เขย่าด้วย Vertex mixture เติม derivatisation reagent 2 ปริมาตร 200 µL เขย่าด้วย Vertex mixture นำไปกรองด้วย 0.45 µm Nylon membrane filter ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

5. สารละลายมาตรฐานสต๊อก ระดับกลางและระดับต่ำที่เตรียมแล้วเก็บในขวดสีชาฝาเกลียว รักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

1.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์

1.4.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Visible

นำสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินที่เตรียมได้นำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC - UV/Visible คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm ปริมาตรการฉีด (Injection volume) 50 µL โดย ใช้ mobile phase A เป็น Water และ mobile phase B เป็น Acetonitrile ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 245 nm ใช้อัตราส่วนผสมแบบ gradient ดังนี้

$$40:60 \xrightarrow{2\ \text{min}} 5:95\ (\text{hold 3 min}) \xrightarrow{2\ \text{min}} 40:60\ (\text{hold 3 min})$$

1.4.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด Fluorescence

นำสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินที่เตรียมได้นำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC – Fluorescence คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm ปริมาตรการฉีด 20 µL โดย ใช้ mobile phase เป็น 100% acetonitrile เป็น mobile phase A และ10%acetonitrile ในน้ำ เป็น mobile phase B ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm ใช้อัตราส่วนผสมแบบ isocratic

2. การหาวิธีการสกัดอะบาเม็คตินในตัวอย่างผัก/ผลไม้ที่มีการเติมอะบาเม็คตินลงไป ด้วยอะซิโตรไนไตร์ แล้วนำไป clean up ด้วย SPE ชนิด C-18, aminopropyl (NH_2), Alumina-B, Silica gel และ graphite carbon/aminopropylsiliga gel

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer)
2. กรวยแก้ว (Glass funnel)
3. ขวดปริมาตร (Volumetric flask, class A) ขนาด 10 ml และ 100 ml
4. ขวดระเหย (Evaporating flask)
5. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 ml และ 250 ml
6. ขวดรูปกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml
7. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 ไมโครลิตร และ 1 ml
8. ขวดใส่ตัวอย่าง (Sample vial) ขนาด 1.5 ml
9. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electric balance)ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
10. โถดูดความชื้น (Desiccator)
11. เครื่องบดสับอาหาร (Blender)
12. เครื่องระเหยสาร (Rotary Evaporator)
13. ตู้ดูดควัน (Hood)
14. เตาเผา (Muffle furnace)
15. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ดีเทคเตอร์ชนิด UV/visible คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 μm
16. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ดีเทคเตอร์ชนิด Fluorescence คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 μm

2.2 สารเคมีและวิธีการเตรียม

สารเคมีและวิธีการเตรียมเหมือนกับข้อ 1.2

2.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ (Analytical procedure)

2.3.1 การสกัดตัวอย่างและ Clean up ด้วย SPE ชนิด C-18

1. ชั่งตัวอย่าง 5.0 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL เติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินความเข้มข้น 1.0 mg/L ปริมาตร 0.1 mL เพื่อทำให้ตัวอย่างมีปริมาณอะบาเม็คติน 0.02 mg/kg เติม Acetonitrile 15 mL เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม เติม Na_2SO_4 2 ช้อน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ 10000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 6000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่ลงในกระบอกตวงขนาด 100 mL ทำการสกัดอีกครั้งด้วย acetonitrile 15 mL ถ่ายสารละลายส่วนใสรวมกันในกระบอกตวงปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ถึง 100 mL

2. เตรียม SPE cartridge ชนิด C-18 โดยการล้างทำความสะอาด cartridge ด้วย acetonitrile ปริมาตร 5 mL ตามด้วยสารละลายปรับสภาวะ Water : ACN (70:30) ปริมาตร 5 mL อย่าปล่อยให้ SPE แห้ง

3. ผ่านสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1 ลงใน SPE C-18 cartridge อัตราการไหล 5 mL/min ล้างกระบอกตวงด้วยสารละลายปรับสภาวะ 5 mL แล้วเทรวมลงใน SPE จากนั้นล้าง SPE ด้วยน้ำ 5 mL ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาตอนแรกนี้ออกไป ดูดอากาศผ่านจน cartridge แห้ง ปล่อยให้อากาศผ่านประมาณ 5 นาที

4. ทำการชะ abamectin ออกมาจาก SPE cartridge ด้วย acetonitrile ปริมาตร 5 mL โดยปล่อยให้สารละลายไหลเองตามธรรมชาติ เก็บสารละลายที่ได้จากการชะ (eluent) ไว้ในหลอดทดลอง ไประเหยภายใต้ไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง

5. เติม derivatisation reagent 1 ปริมาตร 300 μL เขย่าด้วย Vertex mixture เติม derivatisation reagent 2 ปริมาตร 200 μL เขย่าด้วย Vertex mixture นำไปกรองผ่าน membrane แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบวัฏภาคกลับ ชนิด C-18 ขนาดของคอลัมน์ เท่ากับ 150 x 40 มิลลิเมตร ขนาดของตัวดูดซับ (absorbent) เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้ acetonitrile/น้ำ อัตราส่วน 97:3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยกำหนดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/นาที ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

2.3.2 การสกัดตัวอย่างและ clean up ด้วย SPE ชนิด Aminopropyl (NH_2)

1. ชั่งตัวอย่าง 5.0 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL เติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินความเข้มข้น 1.0 mg/L ปริมาตร 0.1 mL เพื่อทำให้ตัวอย่างมีปริมาณอะบาเม็คติน 0.02 mg/kg เติม Acetonitrile 15 mL เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม เติม Na_2SO_4 2 ช้อน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL อันใหม่ ทำการสกัดอีกครั้งด้วย acetonitrile 15 mL ถ่ายสารละลายส่วนใสรวมกันนำไปเขย่าด้วย Vertex mixture ถ่ายสารละลายลงใน evaporating flask นำไประเหยจนแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วละลาย residue ด้วย hexane 5 mL

2. เตรียม SPE cartridge ชนิด NH_2 โดยเติม Na_2SO_4 1 ช้อนลงใน cartridge แล้วล้างทำความสะอาด cartridge ด้วย hexane ปริมาตร 3 mL จำนวน 2 ครั้ง อย่าปล่อยให้ SPE แห้ง

3. ผ่านสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1 ลงใน SPE NH_2 cartridge อัตราการไหล 5 mL/min ล้างขวดระเหยด้วย hexane 5 mL แล้วเทรวมลงใน SPE จากนั้นล้าง SPE ด้วย hexane 4 mL toluene 4 mL dichloromethane 4 mL ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาตอนแรกนี้ออกไป

4. ทำการชะ abamectin ออกมาจาก SPE cartridge ด้วย acetone/ dichloromethane 1:1 ปริมาตร 10 mL โดยปล่อยให้สารละลายไหลเองตามธรรมชาติ เก็บสารละลายที่ได้จากการชะ (eluent) ไว้ในหลอดทดลอง นำไประเหยจนแห้ง

5. เติม derivatisation reagent 1 ปริมาตร 300 µL เขย่าด้วย Vertex mixture เติม derivatisation reagent 2 ปริมาตร 200 µL เขย่าด้วย Vertex mixture นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบวัฏภาคกลับ ชนิด C-18 ขนาดของคอลัมน์ เท่ากับ 150 x 40 มิลลิเมตร ขนาดของตัวดูดซับ (absorbent) เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้ acetonitrile/ 10%acetonitrile อัตราส่วน 97:3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยกำหนดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/นาที ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

2.3.3 การสกัดตัวอย่างและ clean up ด้วย SPE ชนิด Alumina-B

1. ชั่งตัวอย่าง 5.0 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL เติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินความเข้มข้น 1.0 mg/L ปริมาตร 0.1 mL เพื่อทำให้ตัวอย่างมีปริมาณอะบาเม็คติน 0.02 mg/kg เติม Acetonitrile 15 mL เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม เติม Na_2SO_4 2 ช้อน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL อันใหม่ ทำการสกัดอีกครั้งด้วย acetonitrile 15 mL ถ่ายสารละลายส่วนใสรวมกันนำไปเขย่าด้วย Vertex mixture ถ่ายสารละลายลงใน evaporating flask นำไปประเหยจนแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วละลาย residue ด้วย iso-octane 5 mL

2. เตรียม SPE cartridge โดยเติม Na_2SO_4 1 ช้อนลงใน carthrige แล้วล้างทำความสะอาด cartridge ด้วย iso-octane ปริมาตร 3 mL จำนวน 2 ครั้ง อย่าปล่อยให้ SPE แห้ง

3. ผ่านสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1 ลงใน SPE NH_2 cartridge อัตราการไหล 5 mL/min ล้างขวดระเหยด้วย iso-octane 5 mL แล้วเทรวมลงใน SPE จากนั้นล้าง SPE ด้วย iso-octane 5 mL ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาตอนแรกนี้ออกไป

4. ทำการชะ abamectin ออกมาจาก SPE cartridge ด้วย Methanol/ethyl acetate 97:3 ปริมาตร 10 mL โดยปล่อยให้สารละลายไหลเองตามธรรมชาติ เก็บสารละลายที่ได้จากการชะ (eluent) ไว้ในหลอดทดลอง นำไปประเหยจนแห้ง

5. เติม derivatisation reagent 1 ปริมาตร 300 μL เขย่าด้วย Vertex mixture เติม derivatisation reagent 2 ปริมาตร 200 μL เขย่าด้วย Vertex mixture นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบวัฏภาคกลับ ชนิด C-18 ขนาดของคอลัมน์ เท่ากับ 150 x 40 มิลลิเมตร ขนาดของตัวดูดซับ (absorbent) เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้ acetonitrile/ 10%acetonitrile อัตราส่วน 97:3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยกำหนดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/นาที ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

2.3.3 การสกัดตัวอย่างและ clean up ด้วย SPE ชนิด Silica gel

ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.3.2 ยกเว้นเปลี่ยนชนิด SPE จาก NH_2 เป็น Silica gel

2.3.4 การสกัดตัวอย่างและ clean up ด้วย SPE ชนิด graphite carbon/aminopropylsilica gel

1. ชั่งตัวอย่าง 5.0 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL เติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินความเข้มข้น 1.0 mg/L ปริมาตร 0.1 mL เพื่อทำให้ตัวอย่างมีปริมาณอะบาเม็คติน 0.02 mg/kg เติม Acetonitrile 15 mL เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม เติม Na_2SO_4 2 ช้อน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL อันใหม่ ทำการสกัดอีกครั้งด้วย acetonitrile 15 mL ถ่ายสารละลายส่วนใสรวมกันนำไปเขย่าด้วย Vertex mixture กรองผ่าน Na_2SO_4 .anhydrous เก็บสารละลายลงใน evaporating flask นำไประเหยจนแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วละลาย residue ด้วย acetonitrile /toluene (3:1) 5 mL

2. เตรียม SPE cartridge ชนิด graphite carbon/aminopropylsilanized silica gel โดยเติม Na_2SO_4 1 ช้อนลงใน cartridge แล้วล้างทำความสะอาด cartridge ด้วย acetonitrile /toluene (3:1) ปริมาตร 3 mL จำนวน 2 ครั้ง อย่าปล่อยให้ SPE แห้ง

3. ผ่านสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1 ลงใน SPE cartridge อัตราการไหล 5 mL/min ล้างขวดระเหยด้วย acetonitrile /toluene (3:1) 2 mL เก็บสารละลายที่ได้ ไว้ในขวดระเหย

4. ทำการชะ abamectin ออกมาจาก SPE cartridge ด้วย acetonitrile/toluene (3:1) ปริมาตร 20 mL โดยปล่อยให้สารละลายไหลเองตามธรรมชาติ เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดระเหย นำไประเหยจนแห้ง

5. เติม derivatisation reagent 1 ปริมาตร 300 µL เขย่าด้วย Vertex mixture เติม derivatisation reagent 2 ปริมาตร 200 µL เขย่าด้วย Vertex mixture นำไปกรองผ่าน membrane แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบวัฏภาคกลับ ชนิด C-18 ขนาดของคอลัมน์ เท่ากับ 150 x 40 มิลลิเมตร ขนาดของตัวดูดซับ (absorbent) เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้ acetonitrile/น้ำ อัตราส่วน 97:3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยกำหนดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/นาที ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

3. หาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (Limit of quantification, LOQ)

เมื่อทราบวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมแล้ว ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำเป็นต้องทราบปริมาณของสารตกค้างที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถบอกค่าเป็นตัวเลขที่ถูกต้องแม่นยำได้ เพื่อทราบขีดจำกัดของวิธีและเครื่องมือที่ใช้

วิธีการหาค่า LOD ปฏิบัติดังนี้

1. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ที่เติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไป (Fortified sample) ปริมาณต่ำ ๆ ระดับหนึ่ง (จากการทดลองเลือกที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg) จำนวน 10 ซ้ำ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ทั้งหมด มาคำนวณหาค่า SD

2. ทำการประมาณค่า LOD_{approx} โดยคำนวณจาก $LOD_{approx} = 3SD$

3. ตรวจสอบค่า LOD ที่ประมาณได้ โดยเตรียมตัวอย่างให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ LOD_{approx} ที่ประมาณได้ แล้ววิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 10 ซ้ำ

4. สัญญาณที่วัดได้(Peak height) จากเครื่อง HPLC ต้องไม่น้อยกว่า 3 เท่าของ NOISE (Signal/noise ≥ 3)หากค่าที่ได้น้อยกว่า 3 เท่า ต้องดำเนินการซ้ำ โดยต้องเพิ่มระดับความเข้มข้นของตัวอย่างให้มากขึ้นกว่าเดิม

วิธีการหาค่า LOQ ปฏิบัติดังนี้

1. ทำการประมาณค่า LOQ_{approx} โดยคำนวณจาก $LOQ_{approx} = 10SD$

2. ตรวจสอบค่า LOD ที่ประมาณได้ โดยเตรียมตัวอย่างให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ LOD_{approx} ที่ประมาณได้ แล้ววิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 10 ซ้ำ

3. คำนวณค่า Percentage coefficient of variance (%CV) ของร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ที่ได้ เปรียบเทียบค่าที่ได้กับเกณฑ์การยอมรับในตารางที่ 3 หากค่าที่ได้สูงกว่าค่าในตารางที่ต้องดำเนินการซ้ำ โดยต้องเพิ่มปริมาณสารมาตรฐานที่เติมให้มากขึ้นกว่าเดิม

4. คำนวณ % Recovery จากค่าความเข้มข้นที่ทดสอบได้ทั้ง 10 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าที่ได้กับเกณฑ์การยอมรับตามคอลัมน์ที่ 4 (Range of Mean, %Recovery) ของตารางที่ 3 หากค่าที่ได้ไม่อยู่ในช่วงที่กำหนดไว้ต้องเพิ่มปริมาณสารมาตรฐานที่เติมให้มากขึ้นกว่าเดิม

4. หาความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของวิธีการสกัด

วิธีการหาความแม่นยำ (Precision) ปฏิบัติดังนี้

1. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ที่เติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไป (Fortified sample) ให้มีระดับความเข้มข้นระดับ LOQ และสูงกว่า LOQ อีก 1 ระดับ (ใช้ค่า MRL ในการกำหนดระดับความเข้มข้นเพื่อให้มีความเข้มข้นครอบคลุมกับเกณฑ์มาตรฐาน)

2. ทำการทดสอบ Fortified sample ที่เตรียมได้ อย่างน้อย ระดับละ 2 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ โดยแต่ละชุดต้องต่างวันทดสอบ

3. คำนวณค่า %CV ของแต่ละชุด (10 ซ้ำ) เพื่อแสดง Repeatability ของการทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับตามคอลัมน์ที่ 2 (Repeatability, %CV) ของตารางที่ 3

4. คำนวณค่า %CV ของแต่ละระดับทั้ง 2 ชุด (รวม 20 ซ้ำ) เพื่อแสดง Reproducibility ของการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับตามคอลัมน์ที่ 3 (Reproducibility, %CV) ของตารางที่ 3

วิธีการหาความถูกต้อง (Accuracy) ปฏิบัติดังนี้

1. คำนวณค่า %Recovery จากค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากการหาความแม่นยำ รวม 20 ซ้ำ

2. เปรียบเทียบค่าที่ได้กับเกณฑ์การยอมรับตามคอลัมน์ที่ 4 (Range of Mean, %Recovery) ของตารางที่ 3

5. การวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้างหลังจากการฉีดพ่นในผลมะเขือเทศและถั่วแขก

ทำการทดลองฉีดพ่นอะบาเม็คตินในมะเขือเทศและถั่วแขกแล้วเก็บตัวอย่างนำมาตรวจหาปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างตามระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาอัตราการสลายตัวของอะบาเม็คตินเบื้องต้น

วิธีปฏิบัติ

1. การฉีดพ่นสารอะบาเม็คติน 1.8% W/V (ชื่อการค้าแจคเก็ต)ตามอัตราแนะนำ คือ อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ใส่ถังสูบโยกสะพายหลังฉีดพ่นในมะเขือเทศก่อนการเก็บเกี่ยว 40 วัน และถั่วแขกก่อนการเก็บเกี่ยว 30 วัน

2. เก็บตัวอย่างผลมะเขือเทศที่เวลา 1 , 7, 12, 17, 23, 30, 37 และ 42 วัน หลังการพ่นสาร สำหรับถั่วแขกเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1 , 2, 3, 4, 5, และ 6 วัน หลังการพ่นสาร นำมาสกัดหาปริมาณอะบาเม็คติน

6. ศึกษาปริมาณอะบาเม็คตินในตัวอย่างผลผลิตของมูลนิธิโครงการหลวง

ทำการสุ่มตัวอย่างผลผลิตผักสดและผลไม้สดต่างชนิดจากงานคัดบรรจุเชียงใหม่ แล้วนำมาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะบาเม็คติน และเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไปเพื่อดูร้อยละการคืนกลับ

วิธีปฏิบัติ

1. สุ่มตัวอย่างผลผลิตผักสดและผลไม้สดต่างชนิด น้ำหนักชนิดละ 1 กิโลกรัม จากงานคัดบรรจุ
2. ทำการสกัดหาปริมาณอะบาเม็คตินในผลผลิต
3. เลือกตัวอย่างนำมาเติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินให้มีความเข้มข้น 0.02 mg/kg และทำการสกัดหาปริมาณอะบาเม็คตินเพื่อหาร้อยละการคืนกลับของการสกัด

การคำนวณ (Calculation)

การคำนวณผลในตัวอย่าง เมื่อได้ความเข้มข้นของตัวอย่างแล้วจึงคูณด้วย 0.1 ผลที่ได้มีหน่วยเป็น mg/kg

หรือคำนวณโดยใช้สูตรการคำนวณ

$$C = \frac{R_{spl} \times S \times V_f}{R_{std} \times W}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารอะบาเม็คตินตกค้างในตัวอย่าง (mg/kg)

R_{spl} = พื้นที่ใต้พีค (Peak) ของตัวอย่าง

R_{std} = พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน

S = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg/mL

V_f = ปริมาตรสุดท้าย final volume คือ 0.5 mL

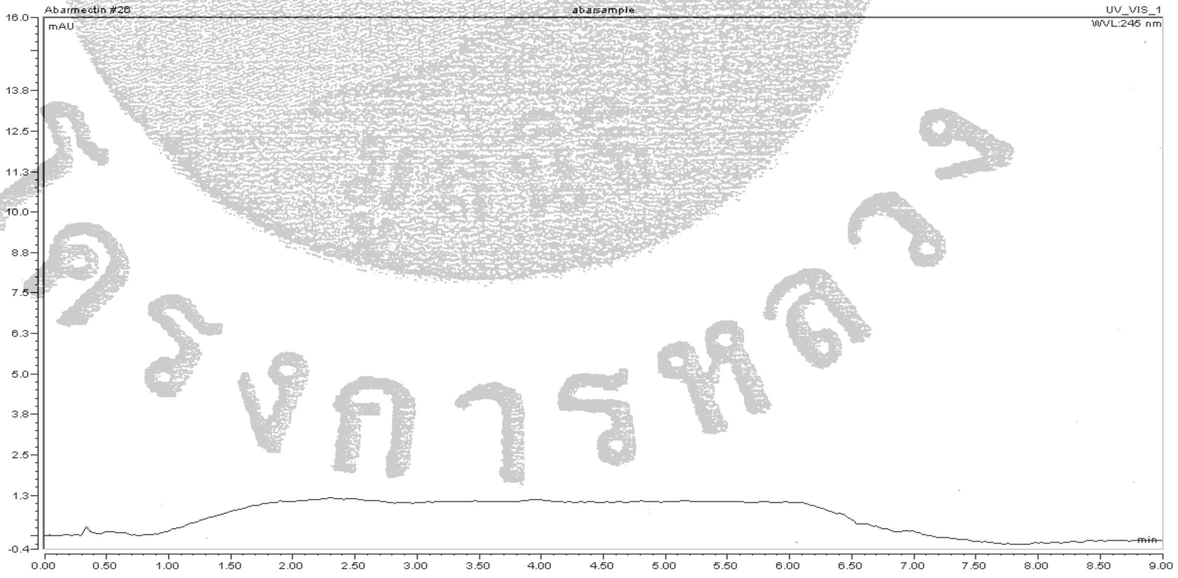
W = น้ำหนักของตัวอย่าง คือ 5 g

ผลการวิจัย

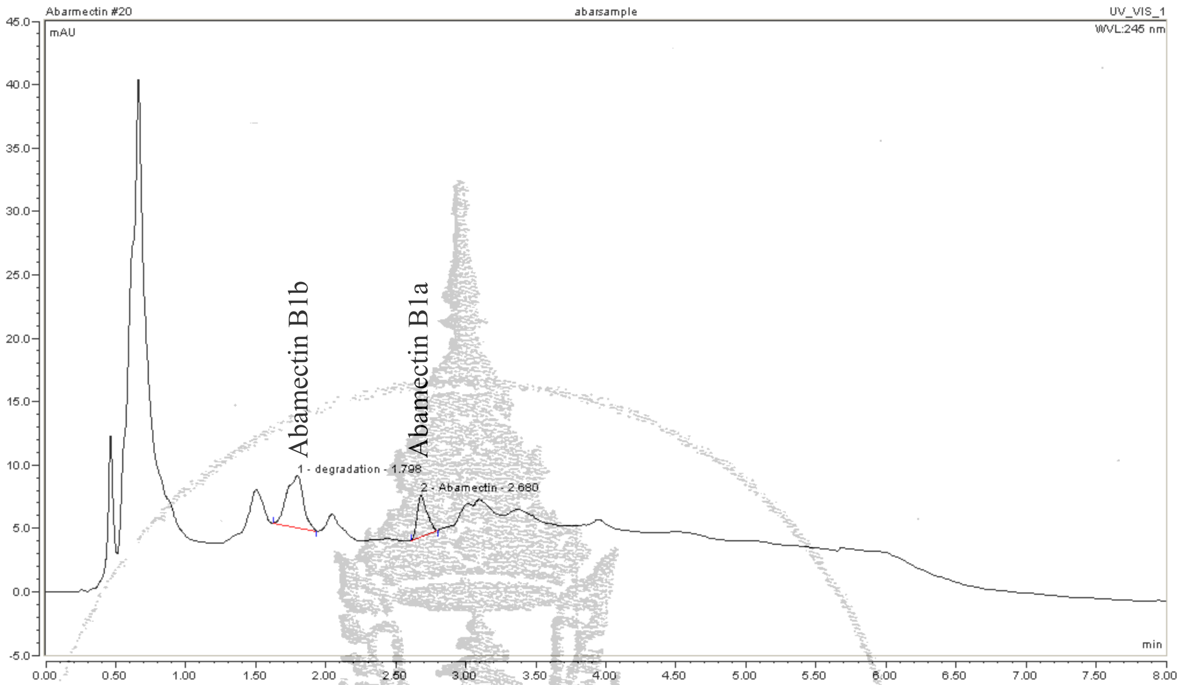
1. การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimum condition) ในการตรวจวิเคราะห์อะบาเม็คติน หลังจากเตรียมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งมีดีเทคเตอร์แบบ UV/Visible ที่ความยาวคลื่น 245 nm และเปรียบเทียบกับดีเทคเตอร์แบบ fluorescence ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm โดยใช้ mobile phase เป็น Water และ Acetonitrile เพื่อหาอัตราส่วนผสมและอัตราการไหลของ mobile phase ที่เหมาะสม ได้ผลดังต่อไปนี้

1.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Visible

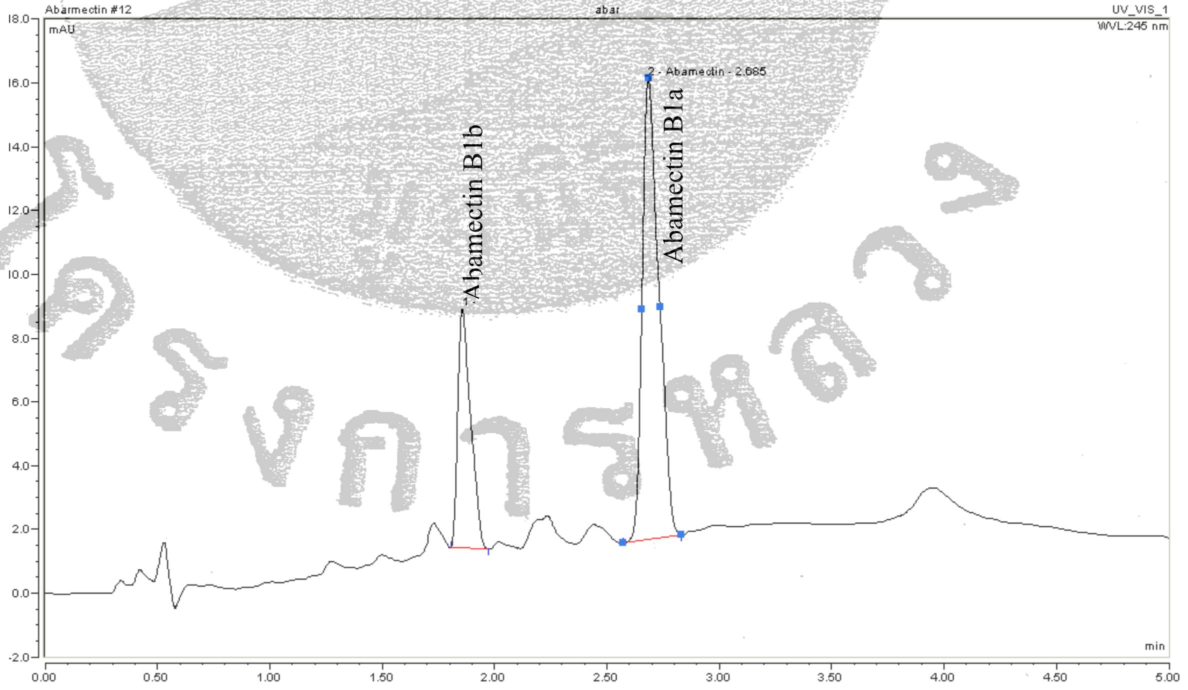
ได้ทำการวิเคราะห์หาอะบาเม็คตินที่ระดับความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L โดยทดลองฉีดสารมาตรฐานปริมาตร 50 µL พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, และ 0.5 mg/L ไม่สามารถตรวจพบพีคของอะบาเม็คติน (ภาพที่ 4) และที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 mg/L ได้พีคที่ต่ำและยากในการ Identified (ภาพที่ 5) ทำการทดลองฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/L สามารถเห็นพีคของอะบาเม็คตินชัดเจน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1 mg/Lไม่พบพีคของอะบาเม็คติน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm ปริมาตรการฉีด 50 µL



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 2.0 mg/L เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm ปริมาตรการฉีด 50 µL



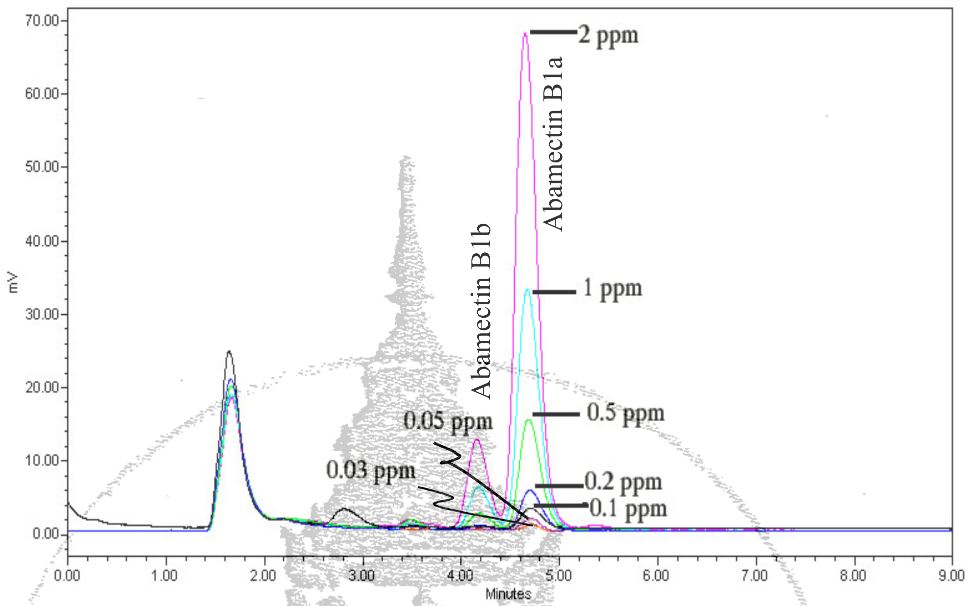
ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 10 mg/L เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ที่ความยาวคลื่น 245 nm ปริมาตรการฉีด 50 µL

1.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด Fluorescence

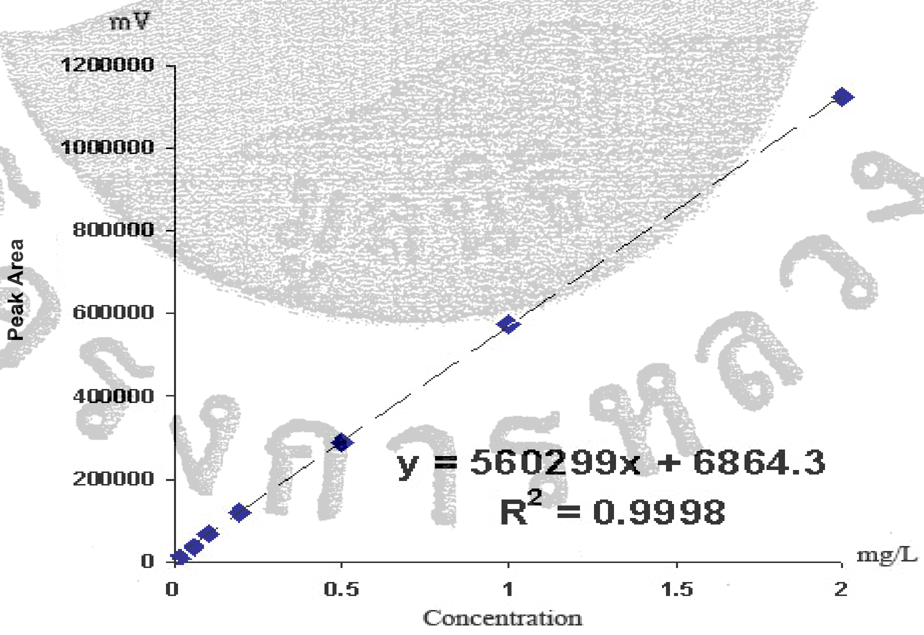
ได้ทำการวิเคราะห์หาอะบาเม็คตินที่ระดับความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L โดยสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือใช้ mobile phase เป็น acetonitrile และ 10% acetonitrile/water อัตราส่วนผสมแบบ isocratic 97:3 กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min ปริมาตรการฉีด 20 µL พบว่าได้โครมาโทแกรมที่มีพื้นที่พีคเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 4) เมื่อนำมาสร้างเป็นแผนภาพซ้อนทับ (Over lay) ได้ผลดังภาพที่ 7 และเมื่อเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นจะได้ calibration curve ที่มีความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยมีค่า regression coefficient r^2= 0.9998 (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 4 พื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินแต่ละระดับความเข้มข้น

Concentration (mg/L)	Peak area of B_{1b}	Peak area of B_{1a}	Summary Area
0.03	0	18791	18791
0.05	0	29304	29304
0.1	2742	67237	69979
0.2	17612	99516	117128
0.5	17885	269779	287664
1.0	67044	509404	576448
2.0	107440	1015254	1122694



ภาพที่ 7 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดีเทค เตอร์ชนิด Fluorescence ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm ปริมาตรการฉีด 20 µL

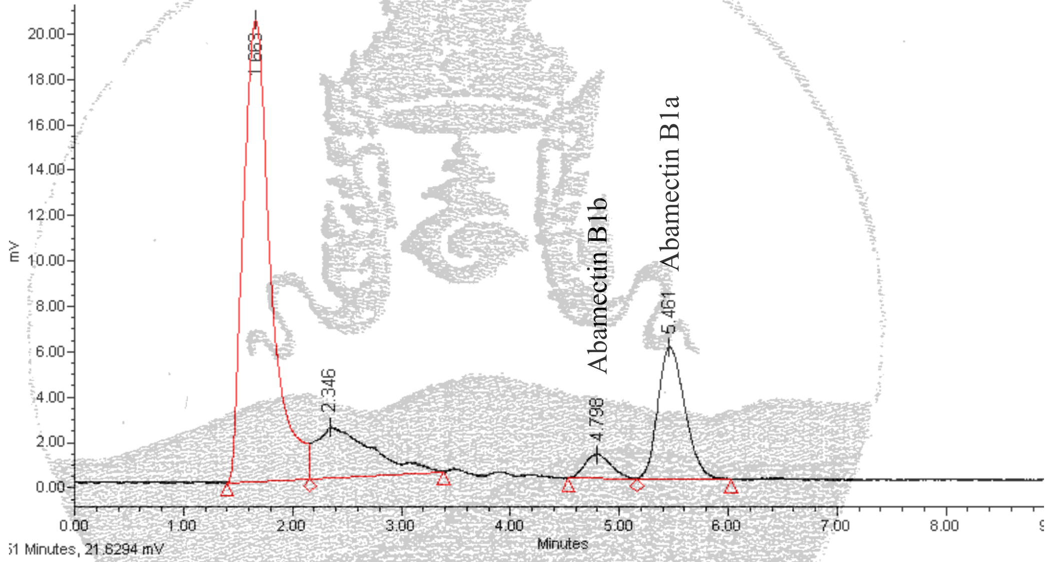


ภาพที่ 8 Calibration curve ของสารมาตรฐานอะบาเม็คตินที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg/L

2. การหาวิธีการสกัดอะบาเม็คตินในตัวอย่างผัก/ผลไม้ที่มีการเติมอะบาเม็คตินลงไป ด้วยอะซิโตไนไตรล์ แล้วนำไป clean up ด้วย SPE ชนิด C-18, aminopropyl, Alumina-B, Silica gel และ graphite carbon/aminopropylsiliga gel

2.1 การ clean up ด้วย SPE ชนิด C-18

ได้ทำการสกัดตัวอย่างที่มีการเติม (Spike) สารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไปเพื่อให้มีความเข้มข้น 0.02 mg/kg และนำมา clean up ด้วย SPE ชนิด C-18 นำมาวิเคราะห์หาปริมาณและ %recovery ของวิธีการสกัดตัวอย่าง ได้ผลดังภาพที่ 9 และตารางที่ 5



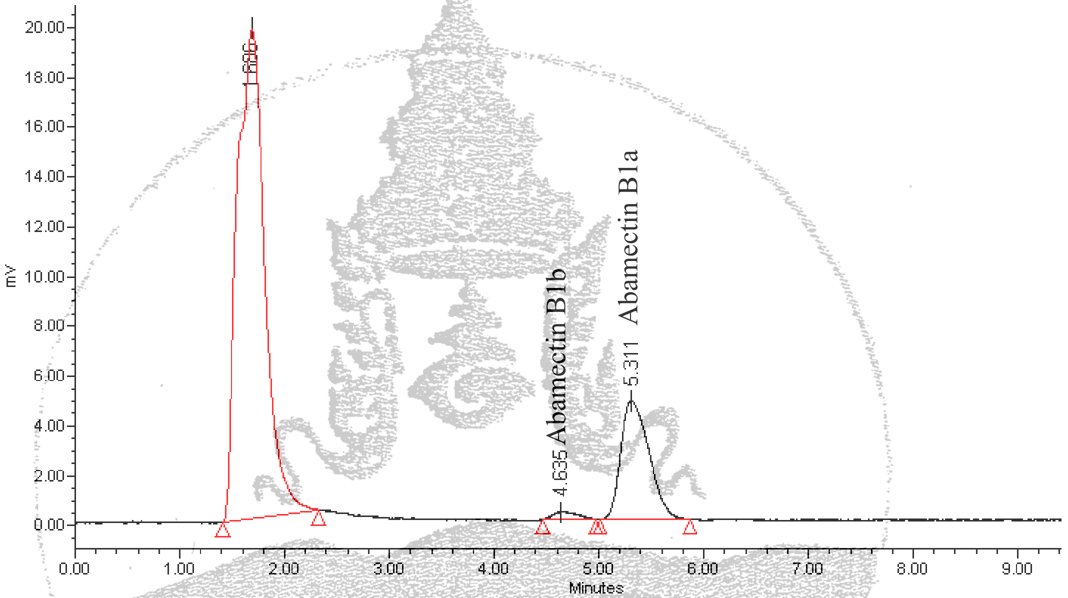
ภาพที่ 9 โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด C-18

ตารางที่ 5 ผลการสกัดและ clean up ด้วย SPE ชนิด C-18

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	150846	0.021	103.09
2	139460	0.019	94.71
3	128446	0.017	86.60
4	142887	0.019	97.23
5	114227	0.015	76.14
6	144241	0.020	98.23
7	84962	0.011	54.61
8	113420	0.015	75.55
9	102212	0.014	67.30
	Mean		85.19
	%RSD		0.19

2.2 การ clean up ด้วย SPE ชนิด aminopropyl

ได้ทำการสกัดตัวอย่างที่มีการเติม (Spike) สารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไปเพื่อให้มีความเข้มข้น 0.02 mg/kg และนำมา clean up ด้วย SPE ชนิด SPE ชนิด aminopropyl นำมาวิเคราะห์หาปริมาณและ %recovery ของวิธีการสกัดตัวอย่าง ได้ผลดังภาพที่ 10 และตารางที่ 6



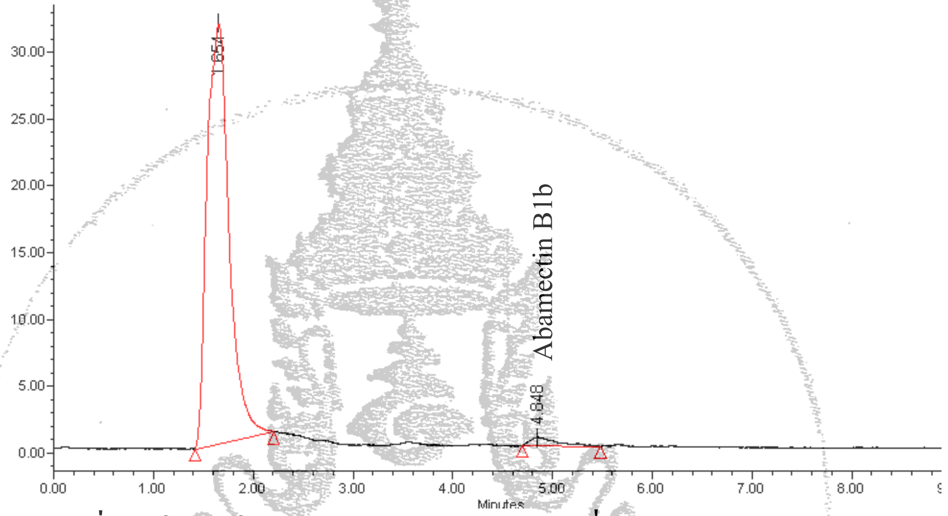
ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด aminopropyl

ตารางที่ 6 ผลการสกัดและ clean up ด้วย SPE ชนิด aminopropyl

ตัวอย่างที่	Peak area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	130367	0.176	88.02
2	121238	0.163	81.30
3	122999	0.165	82.59
4	152406	0.208	104.23
5	157485	0.216	107.97
6	136332	0.185	92.41
7	109164	0.145	72.41
8	98232	0.129	64.37
9	97579	0.128	63.89
	Mean		84.13
	%RSD		0.19

2.3 การ clean up ด้วย SPE ชนิด Alumina-B

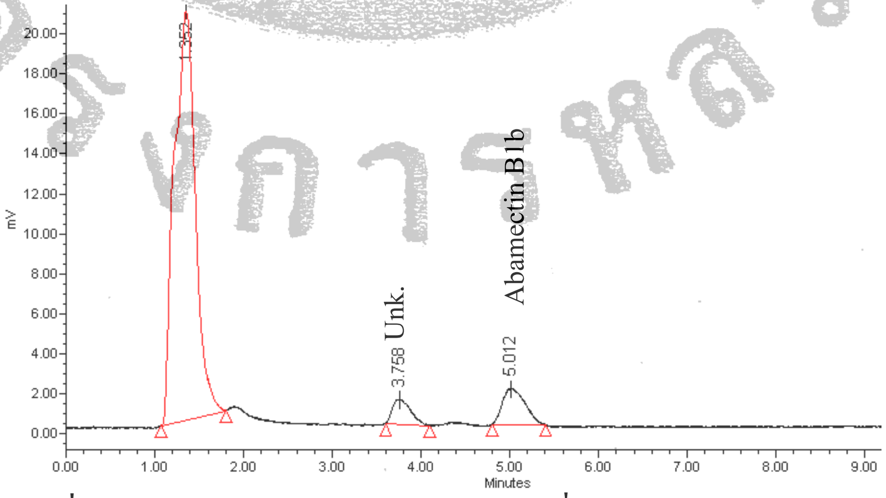
ได้ทำการสกัดตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไปเพื่อให้มีความเข้มข้น 0.02 mg/kg และนำมา clean up ด้วย SPE ชนิด Alumina-B ได้ผลดังภาพที่ 11 แต่เนื่องจากการ clean up สารสกัดตัวอย่างด้วย Alumina-B ทำให้ %recovery ของอะบาเม็คตินต่ำกว่าที่ควร (17.29%) จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ



ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด Alumina-B

2.4 การ clean up ด้วย SPE ชนิด Silica gel

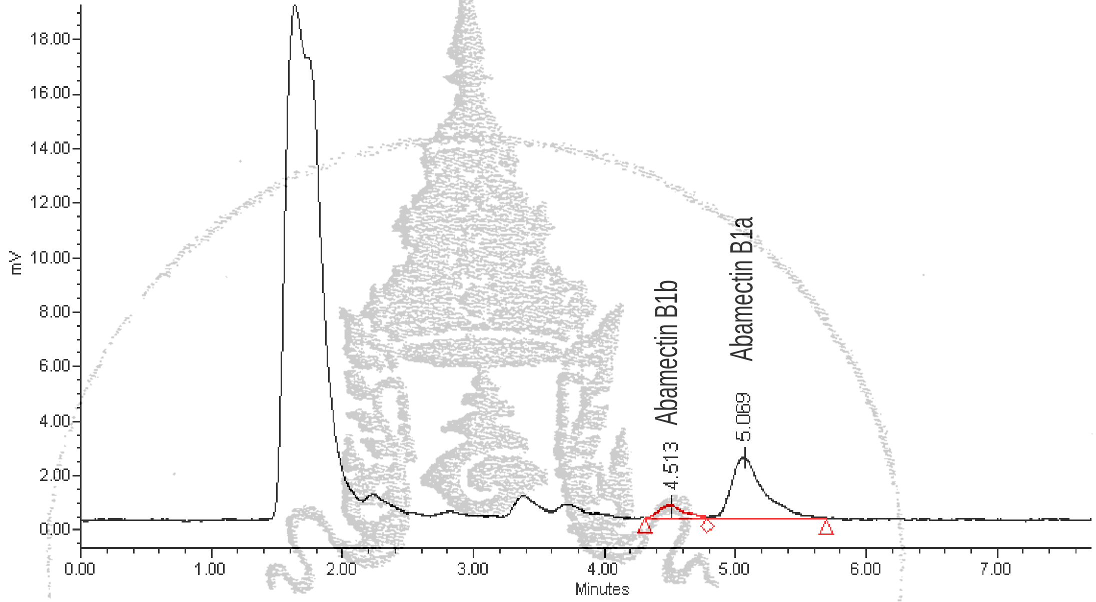
ได้ทำการสกัดตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไปเพื่อให้มีความเข้มข้น 0.02 mg/kg และนำมา clean up ด้วย SPE ชนิด Silica gel ได้ผลดังภาพที่ 12 แต่เนื่องจาก %recovery ของ อะบาเม็คตินต่ำกว่าที่ควร (17.89%) จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ



ภาพที่ 12 โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด Silica gel

2.5 การ clean up ด้วย SPE ชนิด graphite carbon/aminopropylsiliga gel

ได้ทำการสกัดตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไปเพื่อให้มีความเข้มข้น 0.01 mg/kg และนำมา clean up ด้วย SPE ชนิด Silica gel ได้ผลดังภาพที่ 13 แต่เนื่องจาก %recovery ของ อะบาเม็คตินต่ำกว่าที่ควร (57.02%) จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ



ภาพที่ 13 โครมาโทแกรมของ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg ซึ่ง clean up ด้วย SPE ชนิด graphite carbon/aminopropylsiliga gel

3. หาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (Limit of quantification, LOQ)

ได้ทำการหาค่า LOD โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไป (Fortified sample) ให้มีความเข้มข้น 0.02 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ทั้งหมด มาคำนวณหาค่า SD และหาค่า LOD_{approx} โดยเท่ากับ 3SD ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	90228	0.015	75.54
2	104530	0.018	87.50
3	96044	0.016	80.40
4	95403	0.016	79.87
5	105072	0.018	87.96
6	96433	0.016	80.73
7	99975	0.017	83.69
8	96002	0.016	80.37
9	103714	0.017	86.82
10	98564	0.017	82.51
Mean		0.0165	82.54
SD		0.008	-
%CV		4.82	-

จากตารางที่ 7 สามารถคำนวณหา LOD_{approx} ได้ดังนี้

LOD_{approx} = $3 \times 0.0008 = 0.0024$ ซึ่งประมาณเท่ากับ 0.003 mg/kg

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.003 mg/kg แล้วนำมาสกัดหาปริมาณอะบาเม็คติน จำนวน 10 ซ้ำได้ผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.003 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	19378	0.0027	89.10
2	18816	0.0026	85.48
3	18250	0.0025	81.84
4	20145	0.0028	94.04
5	18709	0.0025	84.80
6	19565	0.0027	90.31
7	20059	0.0028	93.49
8	18189	0.0024	81.45
9	20085	0.0028	93.66
10	18655	0.0025	84.45
Mean		0.0026	87.86
SD		0.0002	-
%CV		5.56	-

จากตารางที่ 8 สามารถคำนวณหา $LOQ_{opprox} = 10SD$ คำนวณได้ดังนี้

$LOQ_{opprox} = 10 \times 0.0008 = 0.008$ ซึ่งประมาณเท่ากับ 0.01 mg/kg

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 mg/kg แล้วนำมาสกัดหาปริมาณอะบาเม็คติน จำนวน 10 ซ้ำได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	53005	0.0089	88.78
2	54722	0.0092	91.65
3	71548	0.0120	119.81
4	67497	0.0113	113.03
5	71432	0.0120	119.62
6	58120	0.0097	97.34
7	71102	0.0119	119.06
8	60848	0.0102	101.90
9	60511	0.0101	101.34
10	70222	0.0118	117.59
Mean		0.011	107.01
SD		0.0012	-
%CV		11.5	-

4. หาความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของวิธีการสกัด

ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอะบาเม็คตินลงไป (Fortified sample) ให้มีระดับความเข้มข้นที่ระดับ LOQ และสูงกว่าระดับ LOQ เล็กน้อย ระดับละ 10 ซ้ำ และคำนวณค่า %CV ของแต่ละชุด เพื่อแสดง repeatability ของการวิเคราะห์ และคำนวณค่า %CV ของแต่ละระดับทั้ง 2 ชุด รวม 20 ซ้ำ เพื่อแสดง reproducibility ของการวิเคราะห์

ตารางที่ 10 ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คติน ในตัวอย่างถั่วแขกเพื่อศึกษา repeatability ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	67932	0.011	106.11
2	65882	0.010	102.25
3	65006	0.010	100.61
4	65342	0.010	101.24
5	65908	0.010	102.30
6	64949	0.010	100.50
7	64362	0.010	99.39
8	65607	0.010	101.74
9	64215	0.010	99.12
10	71242	0.011	112.34
mean		0.010	102.56
SD		-	3.96
%CV		-	3.86

โครงการหลวง

ตารางที่ 11 ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา repeatability ในตัวอย่างถั่วแขกที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	110912	0.019	93.51
2	109436	0.018	92.12
3	116684	0.020	98.95
4	103609	0.017	86.64
5	110630	0.019	93.25
6	112766	0.019	95.26
7	116783	0.020	99.04
8	104515	0.017	87.49
9	110471	0.019	93.10
10	118057	0.020	100.24
mean		0.019	93.96
SD		-	4.62
%CV		-	4.92

โครงการหลวง

ตารางที่ 12 ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา reproducibility ในตัวอย่างถั่วแขกจำนวน 2 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	67932	0.011	106.11
2	65882	0.010	102.25
3	65006	0.010	100.61
4	65342	0.010	101.24
5	65908	0.010	102.30
6	64949	0.010	100.50
7	64362	0.010	99.39
8	65607	0.010	101.74
9	64215	0.010	99.12
10	71242	0.011	112.34
11	53005	0.009	88.78
12	54722	0.009	91.65
13	71548	0.012	119.81
14	67497	0.011	113.03
15	71432	0.012	119.62
16	58120	0.010	97.34
17	71102	0.012	119.06
18	60848	0.010	101.90
19	60511	0.010	101.34
20	70222	0.012	117.59
mean		0.011	104.79
SD		-	9.11
%CV		-	8.69

โครงการหลวง

ตารางที่ 13 ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา reproducibility ในตัวอย่างถั่วแขก จำนวน 2 ชุดๆ ละ 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	110912	0.019	93.51
2	109436	0.018	92.12
3	116684	0.020	98.95
4	103609	0.017	86.64
5	110630	0.019	93.25
6	112766	0.019	95.26
7	116783	0.020	99.04
8	104515	0.017	87.49
9	110471	0.019	93.10
10	118057	0.020	100.24
11	90228	0.015	75.54
12	104530	0.018	87.50
13	96044	0.016	80.40
14	95403	0.016	79.87
15	105072	0.018	87.96
16	96433	0.016	80.73
17	99975	0.017	83.69
18	96002	0.016	80.37
19	103714	0.017	86.82
20	98564	0.017	82.51
mean		0.018	88.25
SD		-	7.21
%CV		-	8.16

ตารางที่ 14 ร้อยละการคืนกลับของอะบาเม็คตินเพื่อศึกษา accuracy ในตัวอย่างถั่วแขก จำนวน 4 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.02 mg/kg

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
1	67932	0.011	106.11
2	65882	0.010	102.25
3	65006	0.010	100.61
4	65342	0.010	101.24
5	65908	0.010	102.30
6	64949	0.010	100.50
7	64362	0.010	99.39
8	65607	0.010	101.74
9	64215	0.010	99.12
10	71242	0.011	112.34
11	53005	0.009	88.78
12	54722	0.009	91.65
13	71548	0.012	119.81
14	67497	0.011	113.03
15	71432	0.012	119.62
16	58120	0.010	97.34
17	71102	0.012	119.06
18	60848	0.010	101.90
19	60511	0.010	101.34
20	70222	0.012	117.59
21	110912	0.019	93.51
22	109436	0.018	92.12
23	116684	0.020	98.95
24	103609	0.017	86.64
25	110630	0.019	93.25

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Sample No.	Peak Area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
26	112766	0.019	95.26
27	116783	0.020	99.04
28	104515	0.017	87.49
29	110471	0.019	93.10
30	118057	0.020	100.24
31	90228	0.015	75.54
32	104530	0.018	87.50
33	96044	0.016	80.40
34	95403	0.016	79.87
35	105072	0.018	87.96
36	96433	0.016	80.73
37	99975	0.017	83.69
38	96002	0.016	80.37
39	103714	0.017	86.82
40	98564	0.017	82.51
mean		-	96.52
SD		-	11.65
%CV		-	12.08

โครงการหลวง

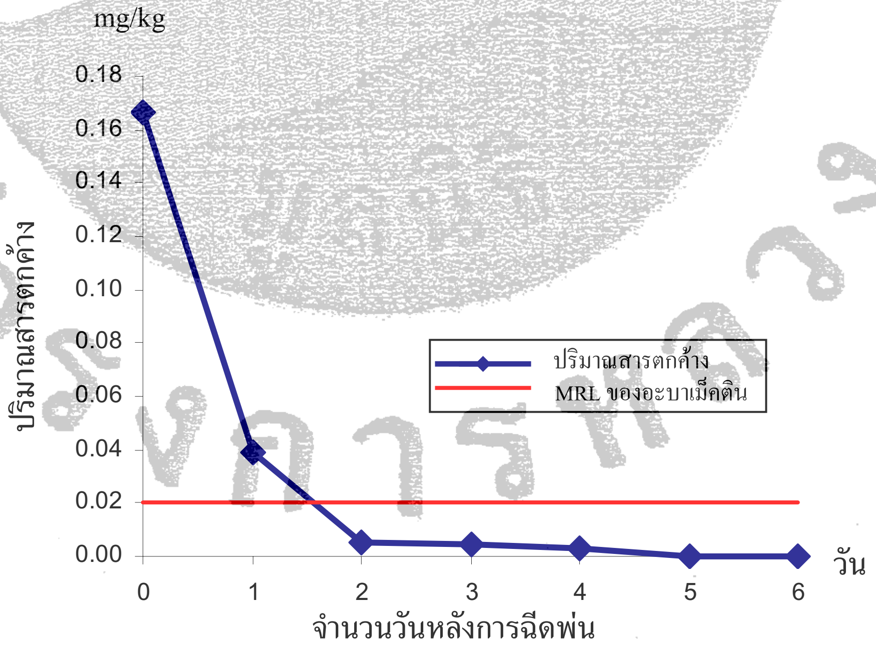
5. การวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้างหลังจากการฉีดพ่นในผลมะเขือเทศและถั่วแขก

ทำการทดลองฉีดพ่นอะบาเม็คตินในมะเขือเทศและถั่วแขกแล้วเก็บตัวอย่างนำมาตรวจหาปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างตามระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าสารอะบาเม็คตินตกค้างมีปริมาณลดลงตามจำนวนวันหลังการฉีดพ่น ดังตารางที่ 15 และ 16

ตารางที่ 15 ปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างในถั่วแขกหลังการฉีดพ่นในอัตราแนะนำ

จำนวนวันหลังการฉีดพ่น (วัน)	ปริมาณอะบาเม็คติน (mg/kg)	ปริมาณที่ลดลง (%)
0	0.17	-
1	0.039	77.06
2	0.005	97.06
3	0.005	97.65
4	0.003	98.24
5	ตรวจไม่พบ	100
6	ตรวจไม่พบ	100

ค่า MRL ของอะบาเม็คตินกำหนดไว้ที่ 0.02 mg/kg

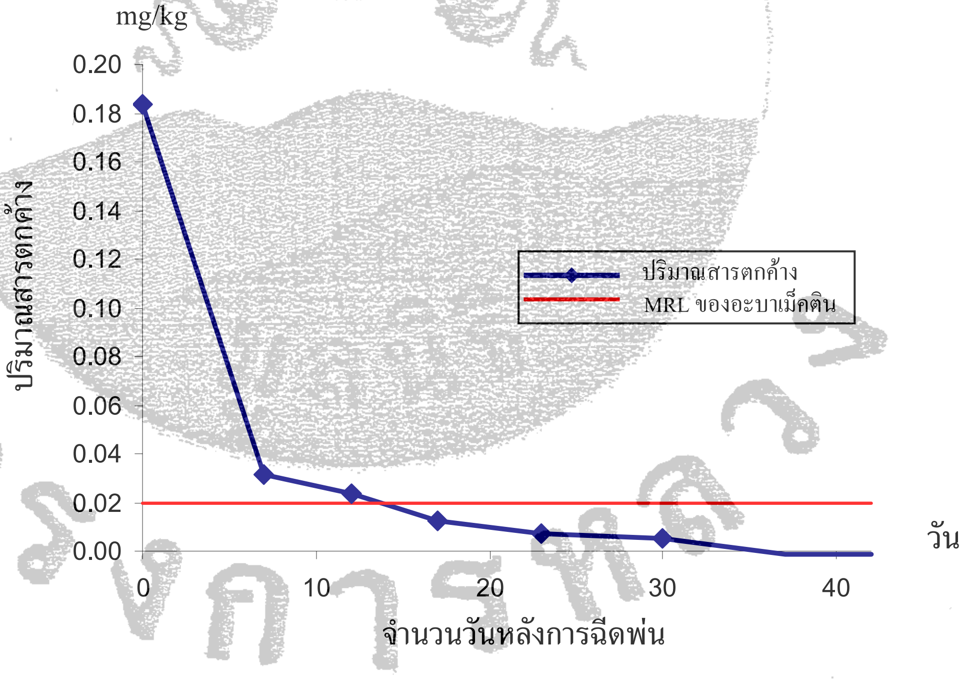


ภาพที่ 14 การสลายตัวของอะบาเม็คตินในถั่วแขก ที่ฉีดพ่นในอัตราแนะนำ

ตารางที่ 16 ปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างในผลมะเขือเทศหลังการฉีดพ่นในอัตราแนะนำ

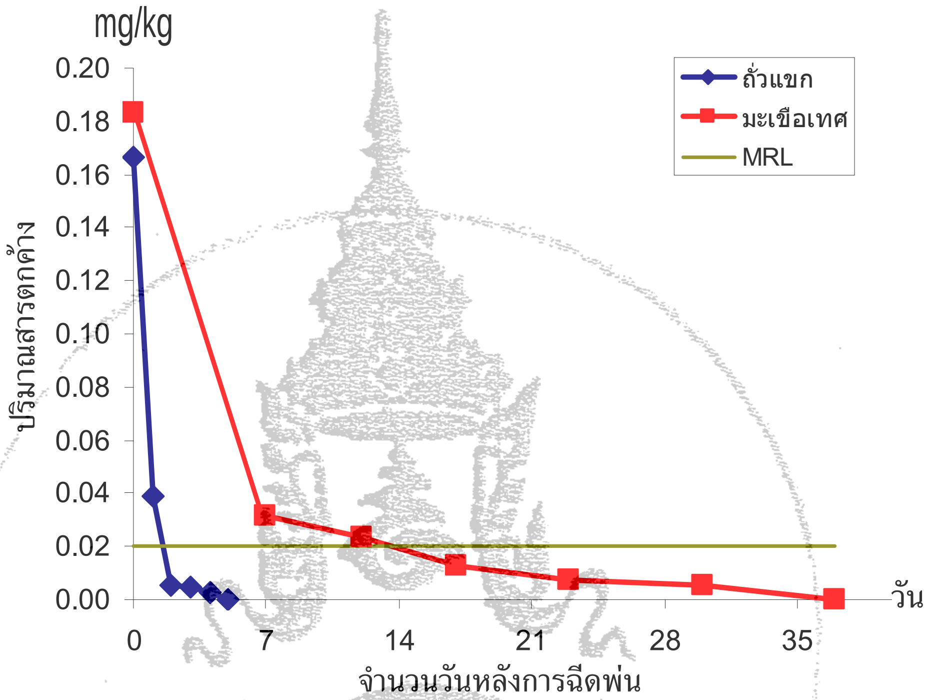
จำนวนวันหลังการฉีดพ่น (วัน)	ปริมาณอะบาเม็คติน (mg/kg)	ปริมาณที่ลดลง (%)
0	0.18	-
7	0.031	83.92
12	0.024	87.01
17	0.013	93.08
23	0.0073	96.01
30	0.0054	97.03
37	ตรวจไม่พบ	100
42	ตรวจไม่พบ	100

ค่า MRL ของอะบาเม็คตินกำหนดไว้ที่ 0.02 mg/kg



ภาพที่ 15 การสลายตัวของอะบาเม็คตินในผลมะเขือเทศ ที่ฉีดพ่นในอัตราแนะนำ

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการสลายตัวของอะบาเม็คตินในผลมะเขือเทศและถั่วแขก พบว่าในถั่วแขกจะสลายตัวได้เร็วกว่าในผลมะเขือเทศ (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 เปรียบเทียบอัตราการสลายตัวของอะบาเม็คตินในถั่วแขกและผลมะเขือเทศ

โครงการหลวง

6. การหาปริมาณอะบาเม็คตินในผลผลิตของมูลนิธิโครงการหลวง

6.1 ทำการสุ่มตัวอย่างผักและผลไม้ จำนวน 12 ตัวอย่างคือ คะน้า กะหล่ำปลีแดง มะเขือเทศ กะหล่ำปลี สตรอเบอรี่ เบบี้แครอท บร๊อคโคลี่ พริกหวานแดง เซเลอรี่ ผักกาดหางหงส์ แตงกวาญี่ปุ่น และซุกินี่ นำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะบาเม็คติน ผลปรากฏว่าตรวจไม่พบจำนวน 9 ตัวอย่าง ตรวจพบในปริมาณไม่เกินค่า MRL 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะบาเม็คตินตกค้างในผลผลิตจากงานคัดบรรจุเชียงใหม่

ลำดับที่	ผลผลิต	ผลการตรวจวิเคราะห์อะบาเม็คติน
1	คะน้า	พบ 0.01 mg/kg (MRL=0.02)
2	กะหล่ำปลีแดง	ตรวจไม่พบ
3	มะเขือเทศ	ตรวจไม่พบ
4	กะหล่ำปลี	ตรวจไม่พบ
5	สตรอเบอรี่	ตรวจไม่พบ
6	เบบี้แครอท	ตรวจไม่พบ
7	บร๊อคโคลี่	ตรวจไม่พบ
8	พริกหวานแดง	ตรวจไม่พบ
9	เซเลอรี่	ตรวจไม่พบ
10	ผักกาดหางหงษ์	ตรวจไม่พบ
11	แตงกวาญี่ปุ่น	พบ 0.01 mg/kg (MRL=0.02)
12	ซุกินี่	พบ 0.018 mg/kg (MRL=0.02)

6.2 ทำการเติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินลงในตัวอย่างต่างชนิด ให้มีระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg นำมาสกัดหาปริมาณอะบาเม็คติน เพื่อหาค่าร้อยละการคืนกลับของตัวอย่างต่างชนิด ได้ผลพบว่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80.43-107.57 (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ร้อยละการคืนกลับในการสกัดหาปริมาณอะบาเม็คตินในตัวอย่างผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่าง	Peak area	Concentration (mg/kg)	%Recovery
ถั่วแขก	68285	0.016	80.43
คะน้า	69146	0.016	81.12
ผักกาดขาวปลี	80421	0.018	90.14
องุ่น	84939	0.019	93.75
สตรอเบอรี่	101915	0.022	107.33
มะเขือเทศ	102212	0.022	107.57

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimum condition)

การวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์อะบาเม็คตินด้วยเครื่อง HPLC โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินเข้าเครื่อง HPLC คอลัมน์ชนิด C18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm มีดีเทคเตอร์แบบ UV/Visible ที่ความยาวคลื่น 245 nm และเปรียบเทียบกับดีเทคเตอร์แบบ fluorescence ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm พบว่าการวิเคราะห์อะบาเม็คตินโดยเครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์ชนิด UV/Vis ไม่เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารอะบาเม็คตินตกค้างในอาหาร เนื่องจากมีความไวต่ำ (Poor sensitivity) ไม่สามารถตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1.0 mg/L ได้โดยสามารถตรวจวัดได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.2 mg/L แต่ข้อดีของดีเทคเตอร์ชนิดนี้คือไม่จำเป็นต้องทำการ derivertisation ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังนั้นจึงวิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่า อาจจะเหมาะสมสำหรับการตรวจหาสารออกฤทธิ์ (Active ingredient) อะบาเม็คตินในรูปสูตรผสม (Formulation) ซึ่งมีความเข้มข้นสูงถึง 1.8% W/V

สำหรับการตรวจวัดอะบาเม็คตินด้วยดีเทคเตอร์ชนิด Fluorescence มีสภาพไวสูงกว่าจึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารตกค้างในอาหาร สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.03 mg/L ขึ้นไป กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.03-2.0 mg/L คือมีค่า regression coefficient, r^2= 0.9998 โดยสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือใช้คอลัมน์ชนิด C18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm รูปทรง sphere shape ใช้ mobile phase เป็น acetonitrile และ 10% acetonitrile/water อัตราส่วนผสมแบบ isocratic 97:3 กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min ปริมาตรการฉีด 20 µL

2. วิธีการสกัดอะบาเม็คตินในตัวอย่างผัก/ผลไม้

จากการวิจัยหาวิธีการสกัดและ clean up ที่เหมาะสมโดยเติมอะบาเม็คตินลงในตัวอย่างแล้วสกัด ด้วยอะซิโตรไนไตรล์ นำไป clean up ด้วย SPE ต่างกัน 5 ชนิดคือ C-18, aminopropyl, Alumina-B ,graphite carbon/aminopropylsiliga gel และ Silica gel พบว่า SPE ชนิด C-18 และ aminopropyl ให้ผลที่ดีคือค่า %recovery ของการสกัดเท่ากับ 85.19 และ 84.13 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (70-120%) และมีความแม่นยำของข้อมูลเท่ากัน คือ %RSD เท่ากับ 0.19 (ตารางที่ 5 และ 6)แต่ยังมีความแตกต่างกันคือ สารที่สกัดได้จาก SPE ชนิด C-18 จะมีสีน้ำตาลเข้มอมเขียว ซึ่งอาจเกิดจาก matrix ที่มีสี (Pigment) ในพืชหลงเหลืออยู่ในสารสกัดมากกว่าการใช้ SPE ชนิด aminopropyl ซึ่งจะได้สารละลายสีเหลืองใสและดูด้วยสายตาจะสะอาดกว่า แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าโครมาโทแกรมที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน การใช้ SPE ชนิด C-18 จะมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างน้อยกว่าและรวดเร็วกว่าการใช้ SPE ชนิด aminopropyl อย่างเห็นได้ชัดเจน และ SPE ชนิด C-18 มีราคาต่ำกว่าชนิด aminopropyl ประมาณ 1 เท่า และการใช้ SPE ในการสกัดและ clean up คาดว่าจะสามารถใช้ได้มากกว่า 1 ครั้ง ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการวิเคราะห์ แต่จำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในภายภาคหน้า สำหรับการใช้ SPE ชนิด Alumina-B, Silica gel และgraphite carbon/aminopropylsiliga gel ตามขั้นตอนการวิจัยนี้ ไม่เหมาะสำหรับการ clean up อะบาเม็คตินเนื่องจาก %recovery เท่ากับ 17.29 17.89 และ 57.02 ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ

3. หาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (Limit of quantification, LOQ)

วิธีการสกัดตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้มีปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.003 mg/kg ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธีของ Wehner (1992) ที่สกัดตัวอย่างด้วย methanol แล้วเจือจางด้วยน้ำนำไปผ่านคอลัมน์ C-8 ชะสารออกจากคอลัมน์ C-8 ผ่านไปยังคอลัมน์ aminopropyl ด้วย methanol ค่า LOD ที่ได้คือ 0.005 mg/kg แต่วิธีนี้ค่า LOD สูงกว่าวิธีของ Hicks (1992) ที่มีค่า LOD เท่ากับ 0.002 mg/kg ซึ่งเตรียมตัวอย่างด้วย pectinase เพื่อไฮโดรไลส์ Pectin ทำการสกัดด้วย acetonitrile/water เจือจางสารสกัดด้วยน้ำนำไปผ่านคอลัมน์ C-8 แล้วชะด้วย acetonitrile เจือจางด้วยน้ำแล้วสกัดด้วย hexane จึงนำมาทำการ clean up ด้วยคอลัมน์ aminopropyl สำหรับค่า MRL ของอะบาเม็คตินในอาหารประเภทผักสดผลไม้สดเท่ากับ 0.01-0.02 mg/kg ดังนั้นค่า LOD ของวิธีการวิเคราะห์ครั้งนี้เท่ากับ 0.003 mg/kg ถือว่าสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบได้

ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์นี้เท่ากับ 0.01 mg/kg ซึ่งสูงกว่าวิธีของสกลวรรธก์และคณะ (2548) ที่ได้ค่า LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี LC-MS โดยพัฒนามาจากวิธีของ K. Yoshii *et al*., (2000) และ P. Satter ของบริษัท Syngenta Crop Production Limited ซึ่งถ้าต้องการตรวจสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้สามารถทำได้โดยทำการวิจัยเพิ่มเติมในส่วนของการเพิ่มปริมาณตัวอย่างจะช่วยทำให้สามารถลดระดับค่า LOQ ให้ต่ำลงกว่าเดิมได้

4. หาความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของวิธีการสกัด

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 40 ซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.02 mg/kg เพื่อหาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) เท่ากับ 96.52 ดังตารางที่ 14 จากการหาความแม่นยำในการทำซ้ำในชุดเดียวกัน (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg มีค่า %CV เท่ากับ 3.86 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg มีค่า %CV เท่ากับ 4.92 และจากการหาความแม่นยำในการทำซ้ำต่างชุด (Reproducibility) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg มีค่า %CV เท่ากับ 8.69 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg มีค่า %CV เท่ากับ 8.61 ดังตารางที่ 10, 11, 12 และ 13 ตามลำดับ

ความถูกต้องและความแม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ 3 พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน GLP จึงถือได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

5. การวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้างหลังจากการฉีดพ่นในผลมะเขือเทศและถั่วแขก

ได้ทำการทดลองฉีดพ่นอะบาเม็คตินในมะเขือเทศและถั่วแขกแล้วเก็บตัวอย่างนำมาตรวจหาปริมาณอะบาเม็คตินที่ตกค้างตามระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาอัตราการสลายตัวของอะบาเม็คติน เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างถั่วแขกวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วันหลังการฉีดพ่นดังตารางที่ 17 พบว่าในวันแรกของการฉีดพ่น (ที่ 0 วัน) ของการฉีดพ่นพบปริมาณอะบาเม็คติน 0.17 mg/kg ซึ่ง พบสูงกว่าค่า MRL ที่ Codex กำหนดไว้ 17 เท่า แต่ภายหลังการฉีดพ่นช่วง 1-2 วัน ปริมาณสารตกค้างลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการวัดผลที่ 0 วัน พบว่าหลังการฉีดพ่นสาร 1 วันอะบาเม็คตินสลายตัวอย่างรวดเร็ว มีปริมาณสารตกค้าง 0.039 mg/kg ลดลงจากเดิม 4 เท่า (ลดลงร้อยละ 77) ในวันที่ 2 หลังการฉีดพ่นปริมาณอะบาเม็คตินลดลงร้อยละ 97 และมีปริมาณสารตกค้าง 0.005 mg/kg ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL ที่กำหนดไว้ที่ 0.02 mg/kg ปริมาณสารที่วัดได้ในวันที่ 3 ลดลงไป 34 เท่า (ลดลงร้อยละ 97) อย่างไรก็ดีในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 หลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายอัตราการสลายตัวจะลดลงอย่างช้า ๆ และเมื่อเวลา 4 วันหลังการฉีดพ่นอะบาเม็คตินยังไม่สลายตัวหมดยังคงเหลือ 0.003 mg/kg หรือ

ตกค้างอยู่ร้อยละ 2 เมื่อเทียบกับปริมาณสารตกค้างในวันแรกที่ฉีดพ่น (ภาพที่ 14) และใช้เวลา 5 วัน อะบาเม็คตินจึงจะสลายตัวหมด

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างในตัวอย่างมะเขือเทศวันที่ 0, 7, 12, 17, 23, 30, 37 และ 42 วันหลังการฉีดพ่นในอัตราแนะนำ ดังตารางที่ 18 พบว่าในวันแรกของการฉีดพ่น (ที่ 0 วัน) ของการฉีดพ่นพบปริมาณอะบาเม็คติน 0.18 mg/kg ซึ่ง พบสูงกว่าค่า MRL ที่ Codex กำหนดไว้ 18 เท่า แต่ภายหลังการฉีดพ่นช่วง 1-7 วัน ปริมาณสารตกค้างลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการวัดผลที่ 0 วัน พบว่าหลังการฉีดพ่นสาร 7 วัน มีปริมาณสารตกค้าง 0.031 mg/kg ลดลงจากเดิมประมาณ 4 เท่า (ลดลงร้อยละ 83) อย่างไรก็ดี ในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 30 หลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายอัตราการสลายตัวจะลดลงอย่างช้า ๆ และเมื่อเวลา 30 วันหลังการฉีดพ่นอะบาเม็คตินยังไม่สลายตัวหมดยังคงเหลือ 0.0054 mg/kg หรือตกค้างอยู่ร้อยละ 3 เมื่อเทียบกับปริมาณสารตกค้างในวันแรกที่ฉีดพ่น และต้องทิ้งระยะเวลา 37 วันจึงจะสลายตัวหมด จากภาพที่ 15 พบว่าภายหลังการฉีดพ่นอะบาเม็คติน 14 วัน จึงจะเหลือปริมาณสารตกค้างต่ำกว่าค่า MRL ซึ่งเกินระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ระบุไว้ในฉลากสารเคมีซึ่งระบุให้เก็บเกี่ยวภายหลังการฉีดพ่น 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการสลายตัวของอะบาเม็คตินในตัวอย่างพืช 2 ชนิด คือถั่วแขกและมะเขือเทศพบว่ามีลักษณะการสลายตัวคล้ายคลึงกันคือในระยะแรกภายหลังการฉีดพ่นจะสลายตัวอย่างรวดเร็วและจากนั้นจะค่อย ๆ สลายตัวอย่างช้า ๆ แต่ลักษณะที่แตกต่างกันคืออะบาเม็คตินที่ตกค้างในถั่วแขกจะสลายตัวจนมีปริมาณอยู่ในระดับต่ำกว่าค่า MRL เพียง 2 วัน หลังการฉีดพ่น ซึ่งสลายตัวได้รวดเร็วกว่าในมะเขือเทศซึ่งใช้เวลาถึง 14 วัน ถึง 7 เท่า อาจเป็นเพราะว่าผลของมะเขือเทศมีเปลือกบางจึงดูดซึมสารอะบาเม็คตินไว้ได้ดีกว่าถั่วแขกจึงทำให้ใช้ระยะเวลาการสลายตัวนานกว่าปกติ แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของชนิดพืชมีผลต่ออัตราการสลายตัวของอะบาเม็คติน ดังภาพที่ 16

6. การหาปริมาณอะบาเม็คตินในผลผลิตของมูลนิธิโครงการหลวง

ทำการสุ่มตัวอย่างผักและผลไม้ จำนวน 12 ตัวอย่างคือ คะน้า กะหล่ำปลีแดง มะเขือเทศ กะหล่ำปลี สตรอเบอรี่ เบบี้แครอท บร๊อคโคลี่ พริกหวานแดง เซเลอรี่ ผักกาดหางหงส์ แตงกวาญี่ปุ่น และซุกินี่ นำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะบาเม็คติน ดังตารางที่ 15 พบว่าตรวจไม่พบอะบาเม็คตินจำนวน 9 ตัวอย่าง ตรวจพบจำนวน 3 ตัวอย่างคือ คะน้า แตงกวาญี่ปุ่น และซุกินี่ ในระดับ 0.01, 0.01 และ 0.018 mg/kg ซึ่งอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าค่า MRL

จากการทดลองเติมสารละลายมาตรฐานอะบาเม็คตินลงในตัวอย่างต่างชนิด ให้มีระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg นำมาสกัดหาปริมาณอะบาเม็คติน เพื่อหาค่าร้อยละการคืนกลับของตัวอย่างต่างชนิด ได้ผลดังตารางที่ 16 พบว่า ตัวอย่าง ถั่วแขก คะน้า ผักกาดขาวปลี องุ่น สตรอเบอรี่ และมะเขือเทศ ได้ร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีการสกัดสามารถใช้ได้กับพืชผักและผลไม้ได้โดยไม่มีสิ่งรบกวนที่ทำให้ผลคลาดเคลื่อน

สรุปผลการวิจัย

1. สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์อะบาเม็คตินตกค้างในอาหารคือใช้เครื่อง HPLC ดีเทคเตอร์แบบ fluorescence ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm, emission 470 nm คอลัมน์ชนิด C-18 ความยาว 15 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.40 cm ขนาดตัวดูดซับ 5 µm รูปทรง sphere shape ใช้ mobile phase เป็น acetonitrile และ 10% acetonitrile/water อัตราส่วนผสมแบบ isocratic 97:3 กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min ปริมาตรการฉีด 20 µL

2. ขั้นตอนการ clean up สารสกัดตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใช้ SPE ชนิด C-18 ซึ่งมีข้อดีคือราคาถูกและรวดเร็วกว่าการใช้ SPE ชนิดอื่น

3. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) ของการวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้เท่ากับ 0.003 mg/kg และขีดจำกัดต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (Limit of quantification, LOQ) เท่ากับ 0.01 mg/kg

4. ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีสกัดวัดจากค่าร้อยละการคืนกลับ เท่ากับ 96.52% และความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการสกัดวัดจาก %CV โดยความแม่นยำในการทำซ้ำในชุดเดียวกัน (Repeatability) มีค่าเท่ากับ 3.86-4.92 และจากการหาความแม่นยำในการทำซ้ำต่างชุด (Reproducibility) มีค่า เท่ากับ 8.61- 8.69

5. เมื่อฉีดพ่นอะบาเม็คตินในถั่วแขกจะมีการสลายตัวได้รวดเร็ว และมีปริมาณสารตกค้างต่ำกว่าค่า MRL ในระยะ 2 วันหลังการฉีดพ่น และสลายตัวหมดที่ 5 วัน สำหรับมะเขือเทศจะมีการสลายตัวช้ากว่าโดยใช้ระยะเวลา 14 วัน จึงจะมีค่าต่ำกว่า MRL **ซึ่งเกินระยะเก็บเกี่ยวที่ฉลากระบุไว้ที่ 7 วัน** และสลายตัวหมดที่ 37 วันหลังการฉีดพ่น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและขอบคุณฝ่ายวิจัย คณะกรรมการวิจัย ที่พิจารณาอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ท้ายที่สุดขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์และหัวหน้าศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะและหัวหน้าสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ที่กรุณาอนุญาตให้ใช้สถานที่ทดลอง และอนุญาตให้เจ้าหน้าที่ของศูนย์ฯ มีส่วนช่วยในงานวิจัย

คณะวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์. 2542. สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 290 หน้า.

เพอชา เฮงตระกูล และปรีชา เถาสุวรรณ. 2548. การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction. [online]. Available http://www.sithiporn.co.th/ newweb/ newsletter/ 31-3-2005-1112256707. pdf. (20/02/50).

สกลวรรธก์ ศุภศิลป์ วนิสา มีเจริญและวินัย ปิติยนต์. 2548. การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างอาบาเม็คตินในพืชผักและผลไม้เพื่อการส่งออกโดยวิธี LC-MS. บทคัดย่อการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 17. หน้า 100-101.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2003. ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRLs). [online]. Available http://www.acfs.go.th/codex MRL, php. (09/05/50).

Alltech Associates, Inc,. 2002. Data sheet205000U. Solid-Phase Extraction Products, p.p. 1-2.

Baker. S. 1991. Solid Phase Extraction:A Viable alternative. Laboratory Equipment Digest, p.p. 1-2.

Cobin, J.A. 1989. HPLC-fluorescence Determination for Avermectin B1 and Its 8,9 Isomer in Cucumbers Method 8920. Merck & Co. Inc., USA.

Cobin, J. 1995. A Rapid HPLC Residue Method for the Quantitation of Avermectin B1 and 8,9-Z Avermectin B1 in Apples Using Fluorescence Detection. Merck Research Laboratories, USA.

Codex Alimentarius Commission. 1993. CAC/GL 40 Guidelines on Good Laboratory Practice in Analysis, p. 25.

Codex Alimentarius Commission. 2000. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Pesticide Residues, p. 151.

Diserens. H. and Henzelin. M. 1999. Determination of Abamectin Residues in Fruits and Vegetable by High-performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography A., p.p. 13-18.

McDonald D.P. 1991. Waters Sep-pak Cartridge Application Bibliography. 5th ed. Division of Millipore. Waters Co. Inc. Milford, p.p. 1-2.

Hicks, M.B. 1992. HPLC-fluorescence Determination for Avermectin B1 and Its Delta-8,9 Isomer in Pears and Apples. Method no. 8000, rev. 3. Merck & Co. Inc., USA.

Kaandorp, H.N. and Vande Schee, H.A. 1989. Report GF 8903. Journal of Chromatography.

Kvaternick, V. 1993. Determination of the Magnitude of Residues of Abamectin and Its Delta 8,9 Isomer in/on Potatoes from Abamectin 0.15 EC Applications Made With Ground Equipment. Analytical Development Corporation, USA.

Makovi. M.C, McMahon. M.B. 1999. Pesticide Analytical Manual. Volume 1 : Multiresidue Method 3 rd ed, Chapter 3 section 302. Department of health and human services, Public health service, Food and drug admininstration, p.p. 1-30.

Martin D. 2000. Determination of Avermectin and Vermectin-like Compound in Tissue Samples by High Performance Liquid Chromatography, The National Food Centre.

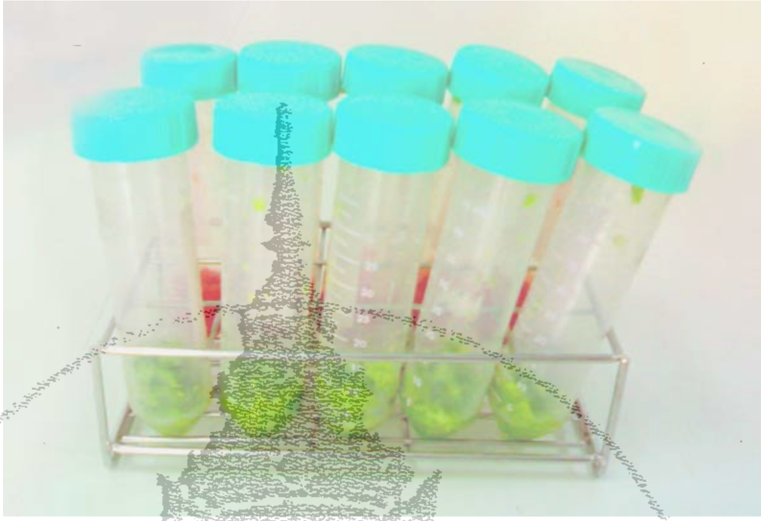
Morneweck, L.A. 1992. HPLC-fluorescence Determination of Avermectin B1 and Its Delta-8,9 Isomer in Apple Processed Fractions. Method no. 92-1. Merck & Co. Inc., USA.

Trainor, T. 1991. Validation of: High-performance liquid Chromatography Fluorescence Determination for Avermectin B1 and Its 8,9 Isomer in Cucumbers and Melons. Study HLA 6012-320. Hazelton Laboratories America, Inc. USA.

Wehner, T.A. 1992. HPLC-fluorescence Determination for Avermectin B1 and Its Delta 8,9 Isomer in Raw Whole Potatoes. Method No. 936-92-4. Merck & Co. Inc., USA.

Steinwandter H., 1985. Universal 5 min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenins Z Anal. Clumie, p.p. 752-724.

ภาคผนวก



ภาพที่ 17 ขั้นตอนการชั่งตัวอย่างถั่วแขกและมะเขือเทศใน centrifuge tube : ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 mL

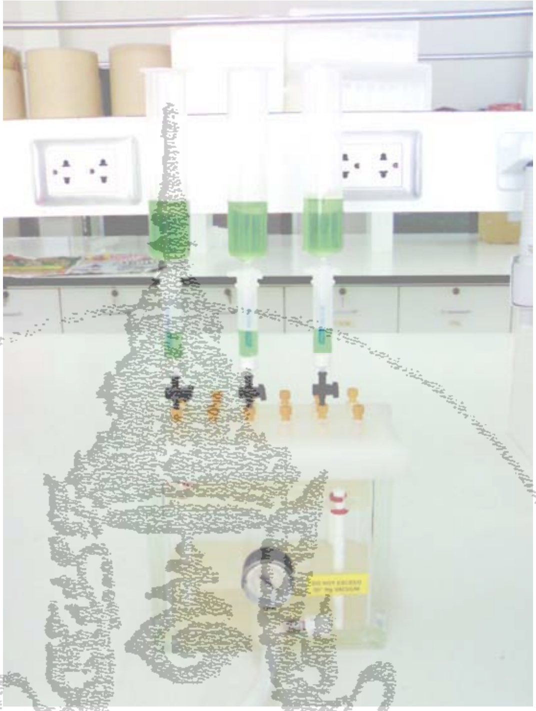
ภาพที่ 18 ขั้นตอนการเติมอะซิโตไนไตรล์ในตัวอย่าง : เติมอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 15 mL ลงในตัวอย่าง

ภาพที่ 19 การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในตัวอย่างประมาณ 1 กรัม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด (Salting out)

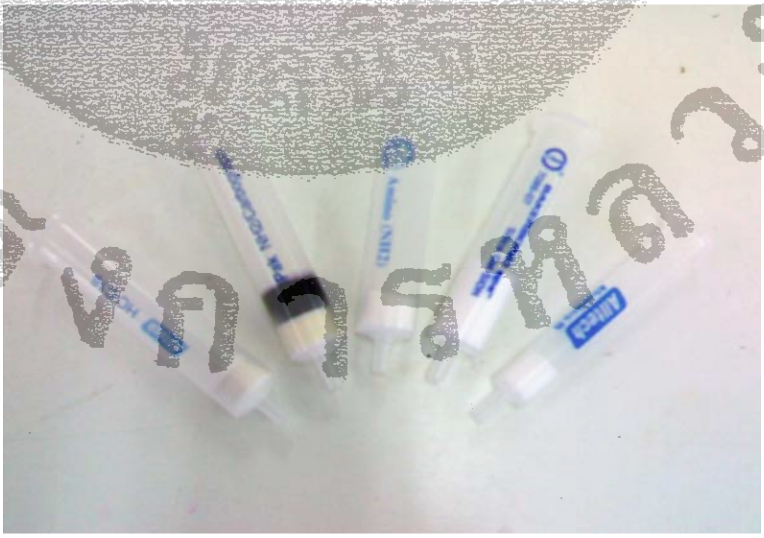
ภาพที่ 20 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Homogenizer

ภาพที่ 21 ขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge โดยตกตะกอนที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที นาน 1 นาที

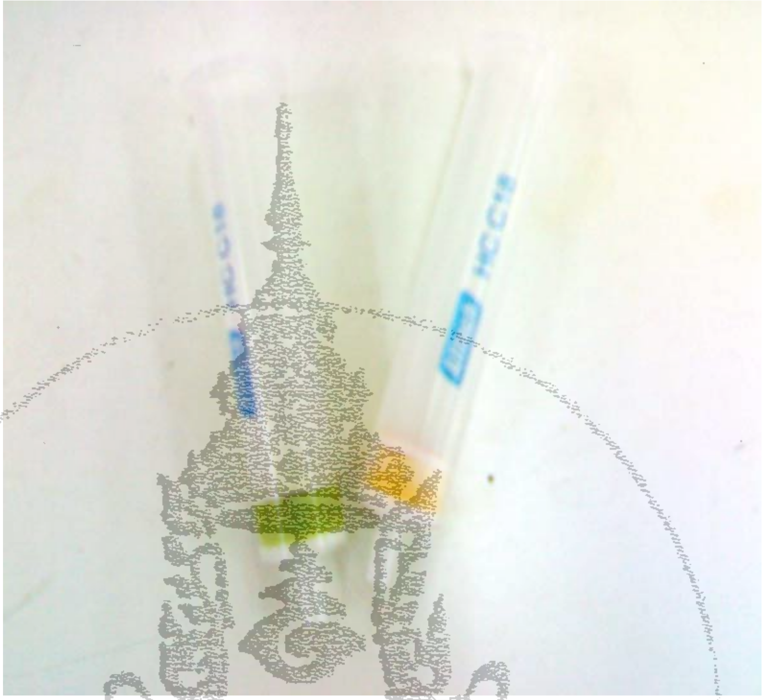
ภาพที่ 22 การปรับปริมาตรสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 mL



ภาพที่ 23 ขั้นตอนการ clean up สารสกัดตัวอย่างด้วย SPE โดยใช้เครื่อง manifold



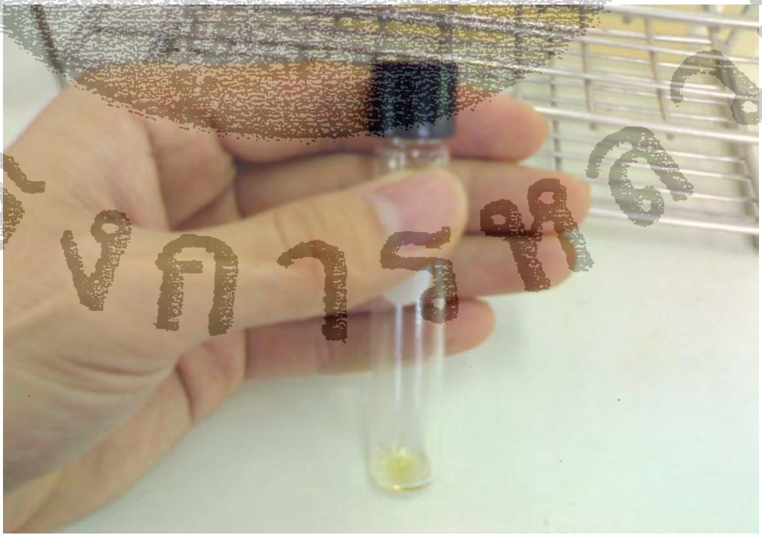
ภาพที่ 24 SPE Cartridge ที่ใช้ในงานวิจัย



ภาพที่ 25 SPE cartridge ที่ผ่านการใช้งานแล้ว

ภาพที่ 26 สารสกัดตัวอย่างที่ผ่านการ clean up แล้ว

ภาพที่ 27 การระเหยสารสกัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Nitrogen evaporator



ภาพที่ 28 สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการ derivatization : ใช้สารละลาย trifluoroacetic anhydride และ 1-methylimidazole ในการทำ derivatized จะได้สารละลายที่มีสีน้ำตาล

ภาพที่ 29 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC/Fluorescence

โครงการหลวง

งบประมาณ และการจัดการเงินงบประมาณ

งบประมาณทั้งหมด

ได้รับเงินทุนวิจัย	154,400 บาท
ค่าใช้สอย และค่าวัสดุ	153,783 บาท

งบประมาณคงเหลือ

งบประมาณคงเหลือหักจากค่าใช้จ่าย	662 บาท

โครงการหลวง