

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่าง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในตลาดสด 3 แห่ง และห้างสรรพสินค้า 2 แห่งในพื้นที่อำเภอเมือง และอำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม รวมจำนวน 5 แห่ง โดยแบ่งเป็นการสุ่มตัวอย่างผักสดที่มีความนิยมในการบริโภค 8 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี ผักคะน้า ผักกาดขาว ใบโหระพามะเขือเทศ พริกสด แตงกวา และถั่วฝักยาว ชนิดละ 3 ตัวอย่างรวมเป็น 120 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างผลไม้สด 4 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ แตงโม ส้ม ฝรั่ง และแอปเปิ้ล รวมเป็น 60 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างผักแปรรูปอีก 2 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง คือพริกแห้ง และหอมแดง รวมเป็น 30 ตัวอย่าง

3.1.2 สารเคมี และอุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องแก้วที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิดเออาร์เกรดยกเว้นสารละลายมาตรฐาน ที่เป็นชนิด HPLC เกรด ประกอบด้วย สารละลายเฮกเซน (hexane) สารละลายอะซิโตน (acetone) สารละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) โซเดียม คลอไรด์ (Sodium Chloride) สารละลายเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) สารโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ กรดฟอร์มิก (formic acid) สารละลายเมทานอล (methanol) สารอะซิโตนไนไตรต์ (acetonitrile) ชุดทดสอบยาฆ่าแมลง-สารพิษตกค้าง (Pesticide Test Kit, GT)

สารละลายมาตรฐานของ สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช (ชนิด HPLC grade)

ประกอบด้วย

- ออกซามิล (Oxamyl)
- เมโทมิล (Methomyl)
- อัลดิคาป (Aldicarb)
- คาร์โบฟูแรน (Carbofuran)
- คาร์บาริล (Carbaryl)
- ไอโซโปรคาร์ป (Isoprocarb)
- เฟโนบูคาร์ป (Fenobucarb)

- เมธิโอคาร์ป (Methiocarb)
- อะดิคาร์ป ซัลฟอกไซด์ (Adicarb Sulfoxide)
- อะดิคาร์ป ซัลโฟน (Adicarb Sulfone)
- คาร์โบฟูแรน (Carbofuran-3-OH)
- ไบเฟนทริน (Bifenthrin)
- เพอร์มีทริน (Permethrin)
- ไซฮาโลทริน (Cyhalothrin)
- เดลตามิทริน (Deltamethrin)
- ไซเพอร์มีทริน (Cypermethrin)
- เฟนวาเลอเอท (Fenvalerate) และ
- ไซฟลูทริน (Cyfluthrin)

3.1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Stock solution) แต่ละชนิดความเข้มข้น 250-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมในอะซีโตน โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4°C สำหรับ Working standard solution เตรียมโดยปิเปต stock solution 1 mL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยอะซีโตน และเตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการ โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และ GC-ECD นำตัวอย่างผักและผลไม้แต่ละชนิดมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลงด้วยมีด ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer ก่อนทำการสกัดตามวิธีต่อไปนี้

3.2.1 ขั้นตอนการสกัดสารกลุ่ม Carbamate

ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.05 กรัม แล้วเติม acetone 50 mL dichloromethane 40 mL และ sodium chloride ประมาณ 10 กรัม แล้วสกัดตัวอย่างโดยใช้ homogenizer ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้สกัดสารละลายใส่ รินสารละลายส่วนใส่ ลงในขวดเตรียมตัวอย่าง ที่เติม sodium sulfate ไร่ประมาณ 15 กรัม ปิดฝาขวดตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที โดยเขย่าแบบแกว่งเบาๆ เป็นครั้งคราว กรองสารละลายผ่าน sodium sulfate

ประมาณ 20 กรัม โดยใช้ cylinder ขนาด 50 mL หรือ 100 mL รองรับ ให้ได้ปริมาตร 50 mL เทสารละลายที่ได้ลงใน round bottom flask ขนาด 100 mL แล้วนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ตั้งอุณหภูมิของ water bath ไว้ไม่เกิน 42 °C จนเกือบแห้ง จากนั้นดูดส่วนที่ระเหยจนเกือบแห้งลงใน Volumetric flask ขนาด 5 mL ก่อน จากนั้นละลาย residues โดยใช้ dropper อันใหม่ดูด ethyl acetate ครั้งละน้อยๆ ใส่ลงใน round bottom flask แล้วใช้ dropper อันแรกฉีดล้างด้านข้างของ round bottom flask ด้านใน จนสะอาด จากนั้นถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน Volumetric flask ขนาด 5 mL เดิม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 5 mL ด้วย ethyl acetate (ปิดฝา Volumetric flask) นำไป mix ให้เข้ากัน แบ่งสารละลายมา 2 mL นำไปเป่าแห้งด้วย N-evaporator จนแห้ง แล้วเติมสารละลาย 0.01% Formic acid in 1% Methanol in Dichloromethane 3 mL แล้วนำไป mix ให้เข้ากัน จากนั้นนำไป Clean up

ขั้นตอนการ Clean up ตัวอย่างด้วย SPE-NH₂

1. Pre - wash SPE-NH₂ ด้วย Dichloromethane 5 mL ปล่อยสารละลายทิ้ง
2. เติม 0.01 % Formic acid in 1% Methanol : Dichloromethane 5 mL ปล่อยสารละลายทิ้ง
3. ดูดสารละลายจากตอนแรก ใส่ลงใน SPE-NH₂ เก็บสารละลายใส่ลงใน Tube ขนาด 50 mL
4. เติม 0.01 % Formic acid in 1% Methanol : Dichloromethane 4 mL ใส่ลงใน Tube แล้วนำไป mix จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน SPE - NH₂
5. ดำเนินการซ้ำตามข้อ 4 อีก 1 ครั้ง และเติม Dichloromethane 4 mL อีกครั้ง แล้วเก็บสารละลายได้ทั้งหมด นำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วย evaporator จนแห้ง แล้วเติมสารละลาย 0.01% Formic acid in Methanol : DI (1:1) 2 mL จากนั้นนำไป Sonicate 1 นาที แล้วถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน vial ขนาด 2 mL แล้วนำไปทดสอบด้วย เครื่อง HPLC ต่อไป

3.2.2 ขั้นตอนการสกัดสารกลุ่ม Organochlorine และ Pyrethroid

ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.05 กรัม ลงในขวดเตรียมตัวอย่างขนาด 250 mL เติม acetone 50 mL dichloromethane 40 mL และ sodium chloride ประมาณ 10 กรัม แล้วสกัดตัวอย่างโดยใช้ homogenizer ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายใส รินสารละลายส่วนใสใส่ ลงในขวดเตรียมตัวอย่างขนาด 250 mL ที่เติม sodium sulfatc ไว้

ประมาณ 15 กรัม ปิดฝาขวดตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที โดยเขย่าแบบแกว่งเบาๆ เป็นครั้งคราว จากนั้นกรองสารละลายผ่าน sodium sulfate ประมาณ 20 กรัม ซึ่งบรรจุอยู่ในกรวยแก้วที่มีสำลีสกรองกันอยู่ โดยใช้ cylinder ขนาด 50 mL หรือ 100 mL รองรับ ให้ได้ปริมาตร 50 mL เติสารละลายที่ได้ลงใน round bottom flask ขนาด 100 mL แล้ว rinse cylinder ด้วย acetone ประมาณ 10 mL แล้วเทรวมลงใน round bottom flask ขนาด 100 mL ใบเดิม นำสารที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ตั้งอุณหภูมิของ water bath ไว้ไม่เกิน 42 °C จนเกือบแห้ง แล้วดูส่วนที่ระเหยจนเกือบแห้งลงใน Volumetric flask ขนาด 5 ml ก่อน จากนั้นละลาย residues โดยใช้ dropper อันใหม่ดูด ethyl acetate ครั้งละน้อยๆ ใส่ลงใน round bottom flask แล้วใช้ dropper อันแรกฉีดล้างด้านข้างของ round bottom flask ด้านใน จนสะอาด จากนั้นถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน Volumetric flask ขนาด 5 mL เดิม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 5 mL ด้วย ethyl acetate (ปิดฝา Volumetric flask) นำไป mix ให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งสารละลายมา 2 mL นำไปเป่าแห้งด้วย evaporator จนแห้ง แล้วเติมสารละลาย Hexane : Dichloromethane (4:1) 8 mL แล้วนำไป mix ให้เข้ากัน จากนั้นนำไป Clean up

ขั้นตอนการ Clean up ตัวอย่างด้วย SPE- Silica

1. Pre - wash SPE-Silica ด้วย Hexane 5 mL ปล่ยสารละลายทิ้ง
2. ดูดสารละลายจากข้อ 9 ใส่ลงใน SPE- Silica เก็บสารละลายใส่ลงใน Round Bottom flask ขนาด 50 ML
3. เติม Hexane : Dichloromethane (1:1) 5 mL ใส่ลงใน Tube แล้วนำไป mix จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน SPE -Silica แล้วเก็บสารละลายทั้งหมด นำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วย Rotary evaporator จนแห้ง แล้วเติม Hexane 1 mL ถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน vial ขนาด 2 mL แล้วนำไปทดสอบด้วย เครื่อง GC -ECD

3.3 เครื่องมือวิเคราะห์

3.3.1 เครื่องมือวิเคราะห์ Carbamate

สภาวะเครื่อง LC-MS

Column: Reverse phase C18

Flow rate: 0.23 mL/minute

Injection volume: 5 μL

Column temperature: 40 °C

Mobile phase: A = 0.01 % Formic acid in water,

B = 0.01 % Formic acid in methanol

Run time: 20 min

Post time: 5 min

Ms condition

Ionization mode : APS-ES (Atomospheric Pressure Ionization-
Electrospray)

Polarity : Positive

Spray Chamber

Drying gas temperature : 315 °C

Drying gas : 12.5 L/min

Capillary voltage : 4000V

Mass Analyzer

Sim Parameters : Signal 1 (Target Ion for Quantitative Analysis)

3.3.2 เครื่องมือวิเคราะห์ Organochlorine และ Pyrethroid

เครื่อง Gas Chromatograph ชนิด ECD Detector

Column: HP - 5 ยี่ห้อ Agilent 0.32 mm x 250 μm x 30 m

Carrier gas: Helium ชนิด High purity (HP) Flow rate 1.4 mL/min

Carrier gas mode: (constant pressure)

Make- up gas: Nitrogen ชนิด High purity (HP) Flow rate 60 mL/min

Injection mode: Splitless

Injection temperature: 210 °C

Purge flow : 60 mL/min Purge time : 0.75 min

Detector type: electron capture Detector (ECD)

Detector temperature: 300 °C

Injection Volume: 2 μ L

Oven temperature: Initial column temperature: 85 $^{\circ}$ C

Rate at 15 $^{\circ}$ C / min to 230 $^{\circ}$ C hold for 1 min

Rate at 5 $^{\circ}$ C / min to 250 $^{\circ}$ C hold for 30 min

3.3.3 การคำนวณหาปริมาณ

ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบคำนวณผลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ (ภาคผนวก ข)

เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

Y คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน

a คือ ความชัน

b คือ จุดตัดแกน

3.4 การตรวจสอบด้วยวิธีการอย่างง่าย

ตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในผัก ผลไม้สด และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากผักและผลไม้ ด้วยชุดทดสอบยาฆ่าแมลง-สารพิษตกค้าง GT (Pesticide Test Kit) โดยสามารถตรวจสอบยาฆ่าแมลงในกลุ่มสารประกอบฟอสเฟต คาร์บาเมต และสารพิษอื่นๆ ที่เป็นกลุ่มคลอรีน มีค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.05 mg/kg สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์อย่างง่ายและกึ่งรวดเร็วนี้ ใช้หลักการตรวจหาสารพิษด้วยวิธี Acetyl cholinesterase Inhibition Technique โดยทฤษฎีที่ว่าสารพิษในกลุ่มสารประกอบฟอสเฟต และ/หรือคาร์บาเมตมีคุณสมบัติเด่นในด้านการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในร่างกายได้ เมื่อร่างกายได้รับสารพิษในกลุ่มเหล่านี้ จะทำให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงนำหลักการนี้มาใช้เป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อคัดกรองสารพิษใน 2 กลุ่มสารนี้ที่มีการใช้มาก แต่จากการประเมินวิธีการตรวจสอบพบว่า วิธีนี้ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (specificity) กับเฉพาะสารใน 2 กลุ่มนี้เท่านั้น ยังสามารถเกิดผลในทางบวกกับสารพิษอื่น เช่น ความเป็นพิษในตัวของพืชสมุนไพรบางชนิด ได้แก่ เมล็ดแก๊สแดงของผลมะระขี้นก หรือสารพิษที่เกิดจากการย่อยสลายโดยวิธีการทางธรรมชาติ (Bio degradation products) หรือเกิดความเป็นพิษจากการเสริมฤทธิ์ของสารพิษปริมาณต่ำกับเนื้อเยื่อของพืช ทำให้เกิดผลดีต่อการคุ้มครองผู้บริโภคที่สามารถตรวจเพื่อคัดกรองสารพิษอื่นได้อีกด้วย ดังนั้นวิธีการนี้จึงมีความแตกต่างจากวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่ตรวจเป็นชนิดสาร การประเมินว่าปลอดภัยหรือไม่ปลอดภัยจะดูจากการเปรียบเทียบค่ากำหนดของชนิดสารเคมีกับชนิด

อาหาร ซึ่งหากมีการตกค้างของสารพิษมากชนิดในตัวอย่างเดียว แต่ปริมาณการตกค้างไม่เกินค่ากำหนดในทุกชนิดสารเคมี ให้ถือว่าปลอดภัย มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- (1). ตัวอย่างผัก-ผลไม้สด/หั่นละเอียด 5 กรัม
- (2). เติมน้ำยา Solvent-1 จำนวน 5 ซีซี
- (3). เขย่าประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 – 15 นาที
- (4). ดูดน้ำยาสกัดตัวอย่าง จากขั้นตอนที่ 3 ลงในหลอดแก้ว จำนวน 1 ซีซี / 4 ส่วน
- (5). เติมน้ำยา Solvent-2 จำนวน 1 ซีซี/ 4 ส่วน ลงไปในหลอดแก้วเดียวกัน
- (6). จะพบว่าน้ำยาแยกเป็น 2 ชั้น จากนั้นนำไประเหยในน้ำยา Solvent-1 ที่อยู่ชั้นล่างหมดไป โดยน้ำยาที่เหลือจากขั้นตอนการระเหย จะใช้เป็น “Sample extract” ที่ใช้ในการตรวจต่อไป

ขั้นตอนการตรวจสอบ : ขั้นตอนนี้จะต้องทำในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 32-36 °c

	หลอดตัดสี	หลอดควบคุม	หลอดตัวอย่าง
	Solvent-2	Solvent-2	Sample extract
	1 ส่วน	1 ส่วน	1 ส่วน
GT-1	2 ส่วน	2 ส่วน	2 ส่วน วางไว้ 5 – 10 นาที
GT-2 + GT-2.1	1.5 ส่วน	1 ส่วน	1 ส่วน วางไว้ 8/30/60 นาที (หรือตามเวลาที่ระบุไว้บนฉลาก)
GT-3 + GT-3.1	4 ส่วน	4 ส่วน	4 ส่วน เขย่า
GT-4	2 ส่วน	2 ส่วน	2 ส่วน เขย่า
GT-5	2 ส่วน	2 ส่วน	2 ส่วน

หมายเหตุ : 1 ส่วน = 0.25 ซีซี, 1.5 ส่วน = 0.375 ซีซี

ขั้นตอนการอ่านผล

ความเข้มข้นของสีในหลอดทดลอง

หลอดตัวอย่าง ≤ หลอดควบคุม

หลอดควบคุม < หลอดตัวอย่าง < หลอดตัดสี

หลอดตัวอย่าง ≥ หลอดตัดสี

ผลการตรวจสอบ



ตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง

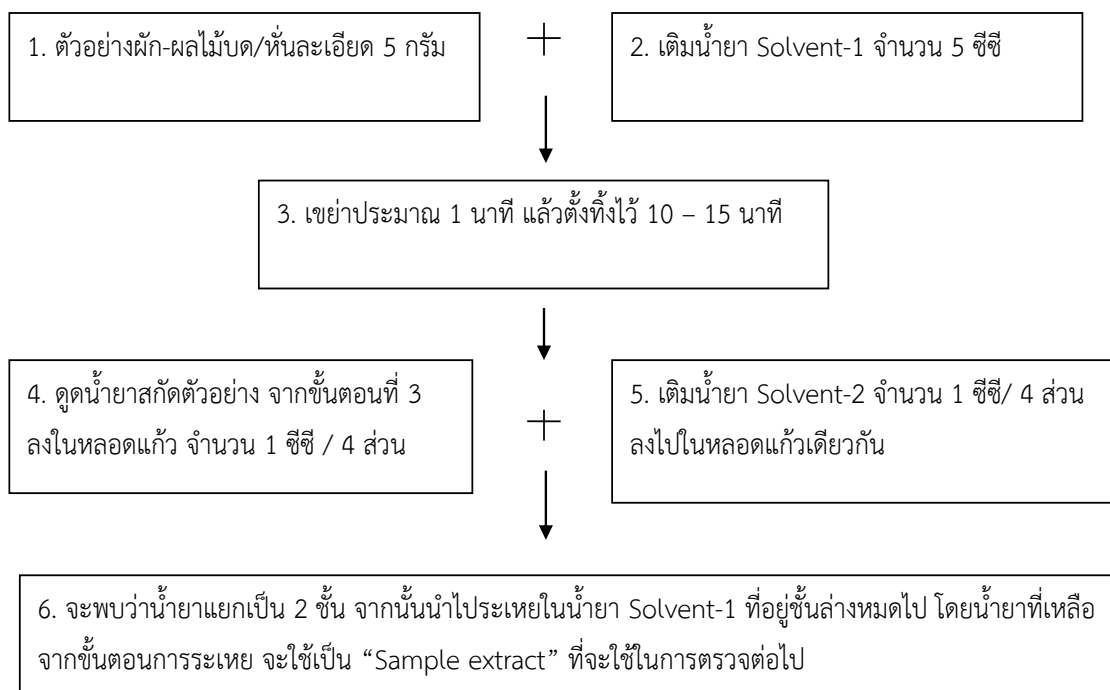


พบสารพิษตกค้างในระดับปลอดภัย



พบสารพิษตกค้างในระดับไม่ปลอดภัย

ขั้นตอนการสกัดสารพิษ



ขั้นตอนการตรวจสอบ : ขั้นตอนนี้จะต้องทำในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 32-36 °c

	หลอดตัดสิน	หลอดควบคุม	หลอดตัวอย่าง
	Solvent-2	Solvent-2	Sample extract
	1 ส่วน	1 ส่วน	1 ส่วน
GT-1	2 ส่วน	2 ส่วน	2 ส่วน วางไว้ 5 – 10 นาที่
GT-2 + GT-2.1	1.5 ส่วน	1 ส่วน	1 ส่วน วางไว้ 8/30/60 นาที่ (หรือตามเวลาที่ระบุไว้บนฉลาก)
GT-3 + GT-3.1	4 ส่วน	4 ส่วน	4 ส่วน เขย่า
GT-4	2 ส่วน	2 ส่วน	2 ส่วน เขย่า
GT-5	2 ส่วน	2 ส่วน	2 ส่วน

หมายเหตุ : 1 ส่วน = 0.25 ซีซี, 1.5 ส่วน = 0.375 ซีซี

การอ่านผล

รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบยาฆ่าแมลง-สารพิษตกค้าง GT