ว กรมวิทย พ 2548; 47 (1) : 26-36

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม Fungicides ในผักและผลไม้

จิตผกา สันทัดรบ และกนกพร อธิสุข

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ จากสถิติการนำเข้าสารเคมี กลุ่ม Fungicides สาร carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon มีการนำเข้ามาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรามากที่สุด การใช้สารเคมีเหล่านี้อย่างไม่ถูกวิธีหรือปริมาณมากเกินจำเป็น อาจทำให้เกิดการตกค้างของสารดังกล่าวในผลผลิตทางการเกษตรได้ เพื่อให้ได้ข้อมูลผลวิเคราะห์การตกค้างซึ่งยังไม่มีการรายงานผลการสำรวจในประเทศไทยมาก่อน จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม fungicides 4 ชนิด ที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ตรวจวัดชนิดและปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC-UV และ Fluorescence detector ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) โดยใช้มะเขือเทศเป็นตัวแทนของตัวอย่างผักและผลไม้ พบว่าสำหรับสาร carbendazim, thiabendazole และ triadimenol มีค่า Limit of Detection เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Limit of Quantitation เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Linear working range) เท่ากับ 0.10 - 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.9995, 0.9923, 0.9994 ตามลำดับ และตลอดช่วง Linear working range มีความถูกต้องแสดงด้วย % Recovery เท่ากับ 82.9 - 95.4%, 82.4 - 99.1% และ 89.9 - 95.3% ตามลำดับ และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) แสดงด้วยค่า % RSD เท่ากับ 2.4 - 7.4, 4.9 - 8.6 และ 1.9 - 10.2 ตามลำดับ จากคุณสมบัติที่ทำการทดสอบสรุปได้ว่าวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิด ส่วนสาร triadimefon การทดสอบยังไม่สามารถยอมรับได้ จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีต่อไป

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งเกษตรกรรม ผลผลิตทางการเกษตรมักถูกรบกวนจากศัตรูของพืช ซึ่งนอกจากแมลงและสัตว์รบกวนแล้วโรคพืชก็เป็นอีกปัญหาหนึ่งของเกษตรกรที่ทำความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตร โรคพืชที่พบนั้นมาจากหลายสาเหตุ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ประเทศไทย ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นมีภูมิอากาศเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและสามารถแพร่กระจายได้ดี ดังนั้น ร้อยละ 80 ของโรคพืชเกิดจากเชื้อรา เช่น โรคราแป้ง โรคแอนแทรคโนส โรคเหล่านี้ทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตทางการเกษตร สารเคมีกลุ่ม fungicides จึงได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย การออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม fungicides ต่อเชื้อรา มี 3 ลักษณะคือ การป้องกันการเกิดรา การรักษาโรคจากเชื้อรา และการกำจัดเชื้อรา ดังนั้นจึงอาจเรียกสารกลุ่มนี้รวมว่า สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา แต่โดยคำแปลของคำว่า fungicide ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน

Accepted for publication, 26 July 2004

ฉบับมกราคม 2543 แปลว่า สารฆ่าเชื้อรา ซึ่งไม่ครอบคลุมคุณสมบัติของสารกลุ่มนี้ คำแปลดังกล่าวจึงไม่เป็นที่นิยมใช้กับสารกลุ่มนี้ สารเหล่านี้มีการนำเข้าจากต่างประเทศทั้งชนิดดูดซึม (systemic) และชนิดไม่ดูดซึม (non-systemic) ถึงแม้ว่าราคาของสารชนิดดูดซึมจะมีราคาสูงกว่าชนิดไม่ดูดซึม 3 - 4 เท่า แต่สารชนิดดูดซึมก็ยังเป็นที่นิยมมากกว่าเพราะสารดังกล่าวสามารถเข้าไปในระบบของพืชและไหลเวียนในท่อน้ำ (xylem) หรือท่ออาหาร (phloem)ได้แล้วไปออกฤทธิ์ยับยั้งและทำลายเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชได้ดี[1] สารกลุ่มนี้ที่มีการนำเข้าได้แก่ carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon จากข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตราย พ.ศ. 2543 - 2545 รวบรวมโดยสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร พบว่ามีการนำเข้าสาร carbendazim มากที่สุดในกลุ่ม มีปริมาณนำเข้าเฉลี่ยถึง 900 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึงปีละ 100 ล้านบาท สารทั้ง 4 ชนิดเป็นสารชนิดดูดซึมเมื่อใช้กับพืชทำให้มีโอกาสตกค้างมากกว่าชนิดไม่ดูดซึม สาร carbendazim และ thiabendazole มีโครงสร้างเป็นพวกสาร benzimidazole ออกฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา ส่วน triadimenol และ triadimefon มีโครงสร้างเป็นพวกสาร imidazole ออกฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อรา[2]

การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม fungicides ตกค้างในผักและผลไม้ มีรายงานการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัด (extraction) โดยใช้ตัวทำละลายหลายชนิด เช่น acetone[3, 4], ethyl acetate[5] , acetone-dichloromethane-light petroleum[6] และมีการใช้ Solid Phase Extraction (SPE) ทั้งในรูปแบบของ Bond-Elut diol bonded silica[6] และ Extrelut 20[3,7] ส่วนขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ใช้ Strong Cation-Exchange (SCX) cartridge[8] ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะสำหรับวิเคราะห์สารแต่ละชนิด ถ้าต้องการสำรวจปริมาณการตกค้างสารทั้ง 4 ชนิดจะต้องใช้หลายวิธี ทำให้สิ้นเปลืองทั้งสารเคมีและเวลา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีโดยมีความมุ่งหมายต้องการวิธีวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิดได้พร้อมกันในครั้งเดียว โดยปรับปรุงวิธีการสกัดจากวิธีของ Muccio AD et al.[3] และใช้ SPE ชนิด Alumina N ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) โดยใช้มะเขือเทศเป็นตัวแทนของ matrix ผักและผลไม้ ทำการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, limit of detection, limit of quantitation, linearity and working range, accuracy และ precision

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : acetonitrile, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ 95% hexane เป็น HPLC grade; Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) เป็น AR grade. Extrelut NT20 (Merck, cat. No.1.15096), Alumina N plus (Waters, cat. No. WAT 020510)

สารมาตรฐาน : carbendazim (Riedel-de-Haen, Germany, 99.0%), thiabendazole (US Environmental Protection Agency, 98.2%), triadimenol (Riedel-de-Haen, Germany, 98.0%) และ triadimefon (US Environmental Protection Agency, 98.3%)

การเตรียมสารละลายและสารมาตรฐาน

Phosphate buffer: ชั่ง NaH_2PO_4 24.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร,

ชั่ง Na_2HPO_4 28.39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ผสมสารละลาย NaH_2PO_4 กับสารละลาย Na_2HPO_4 ในอัตราส่วน 7 : 3 เขย่าให้เข้ากัน

0.01M KH_2PO_4: ชั่ง KH_2PO_4 1.36 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

Stock standard solution: carbendazim ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน carbendazim 5.03 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร, thiabendazole ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน thiabendazole 25.45 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร, triadimefon ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน triadimefon 25.44 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร และ triadimenol ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน triadimenol 25.49 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร

Standard mixture solution ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร : ปิเปต stock standard solution ของ carbendazim, thiabendazole, triadimefon และ triadimenol ปริมาตร 2.5, 0.5, 0.5 และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ใช้เป็น working standard

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดปั่นความเร็วสูง (Ultra turrax T25), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi, Switzerland), HPLC system ประกอบด้วย Pump (Thermo Separation Products, CM4100), Vacuum Membrane Degasser, Column Oven (Waters), UV Detector (Thermo Separation Products SM3200), Fluorescence Detector (Jasco FL 3200)

ตัวอย่าง

มะเขือเทศมีฉลากระบุ "ปลอดสารเคมี" บดปั่นละเอียดประมาณ 1 กิโลกรัม

วิธีวิเคราะห์

การสกัด (Extraction)

ชั่งมะเขือเทศที่บดปั่นละเอียดแล้ว 20.0 กรัม เติม phosphate buffer : methanol (1:1) 100 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องบดปั่นความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที กรองสารสกัดส่วนใสโดยวิธี suction ใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วเติม phosphate buffer : methanol (1:1) อีก 50 มิลลิลิตร ปั่นต่ออีก 1 นาทีแล้วกรอง เก็บสารสกัดที่กรองได้มารวมกันใส่ลงใน round-bottomed flask นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้เหลือปริมาตร ประมาณ 75 มิลลิลิตร แล้วเทสารสกัดลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย phosphate buffer จนครบ แบ่งสารสกัดมา 20 มิลลิลิตร ใส่ใน Extrelut NT20 column ทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วเติม hexane : dichloromethane (1:1) 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้จากการผ่าน Extrelut NT20 column ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนเกือบแห้ง เติม ethyl acetate 5 มิลลิลิตร

การทำให้สารบริสุทธิ์ (Clean-Up)

เตรียม Sep-pak Alumina N plus โดยล้างด้วย ethyl acetate 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัดลงไป ทิ้งสารละลายส่วนที่ผ่านออกมาจาก Sep-pak Alumina N plus

จากนั้นเติม methanol 15 มิลลิลิตรเป็นตัวชะ (eluent) เก็บสารละลายส่วนที่ผ่านออกมา นำไปประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง เติม methanol 2 มิลลิลิตร กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร เก็บไว้ใน vial สำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งมี UV และ Fluorescence detector ต่อกันตามลำดับต่อไป

การตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC ใช้สภาวะดังนี้

Analytical column: Ultracarb C_8 5 ไมโครเมตร, ขนาด 150 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร Mobile phase เป็นระบบ gradient

เวลา (นาที)	0.01M KH_2PO_4 : acetonitrile
0	75:25
30	30:70
35 - 45	75:25

Flow rate: 1 มิลลิลิตรต่อนาที, Column oven: 40 องศาเซลเซียส, Injection volume: 20 ไมโครลิตร Detector: Fluorescence Ex 285 นาโนเมตร, Em 315 นาโนเมตร (ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร carbendazim และ thiabendazole) และ UV 230 นาโนเมตร (ใช้ในการคำนวณปริมาณสาร triadimenol และ triadimefon)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์(Method Validation)[9,10]

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)[10]

เตรียม standard mixture solution ความเข้มข้น 0.20 ถึง 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละตัวกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่า Correlation coefficient (r)

วิเคราะห์ Method blank และ Matrix blank

Method blank : สกัดสารเคมีที่ใช้ทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

Matrix blank: สกัดมะเขือเทศ ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา 7 ซ้ำ

ฉีด method blank และ matrix blank เข้าระบบ HPLC เพื่อดูว่ามีพีครบกวนสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)[10]

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำ ๆ ค่า LOD เท่ากับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้พีคที่มีความสูงเท่ากับ 3 เท่า signal-to-noise ratio คำนวณต่อน้ำหนักของตัวอย่าง

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)[10]

ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดที่ระดับประมาณ 3 เท่าของค่า LOD ลงในตัวอย่างมะเขือเทศวิเคราะห์ 7 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และค่า RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Working range)[10]

เติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 5, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างมะเขือเทศ 20.0 กรัม วิเคราะห์ระดับละ 1 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละตัวกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่า r

การทดสอบความแม่นและความเที่ยง (Accuracy and Precision)[10]

ทดสอบความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสาร carbendazim และ thiabendazole ที่ระดับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนสาร triadimenol และ triadimefon เติมที่ระดับ 0.1, 0.4, 0.5, 0.6 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และ RSD

การประเมินผลการทดสอบความถูกต้องวิธี

ผลการทดสอบที่ได้จะถูกประเมินดังนี้

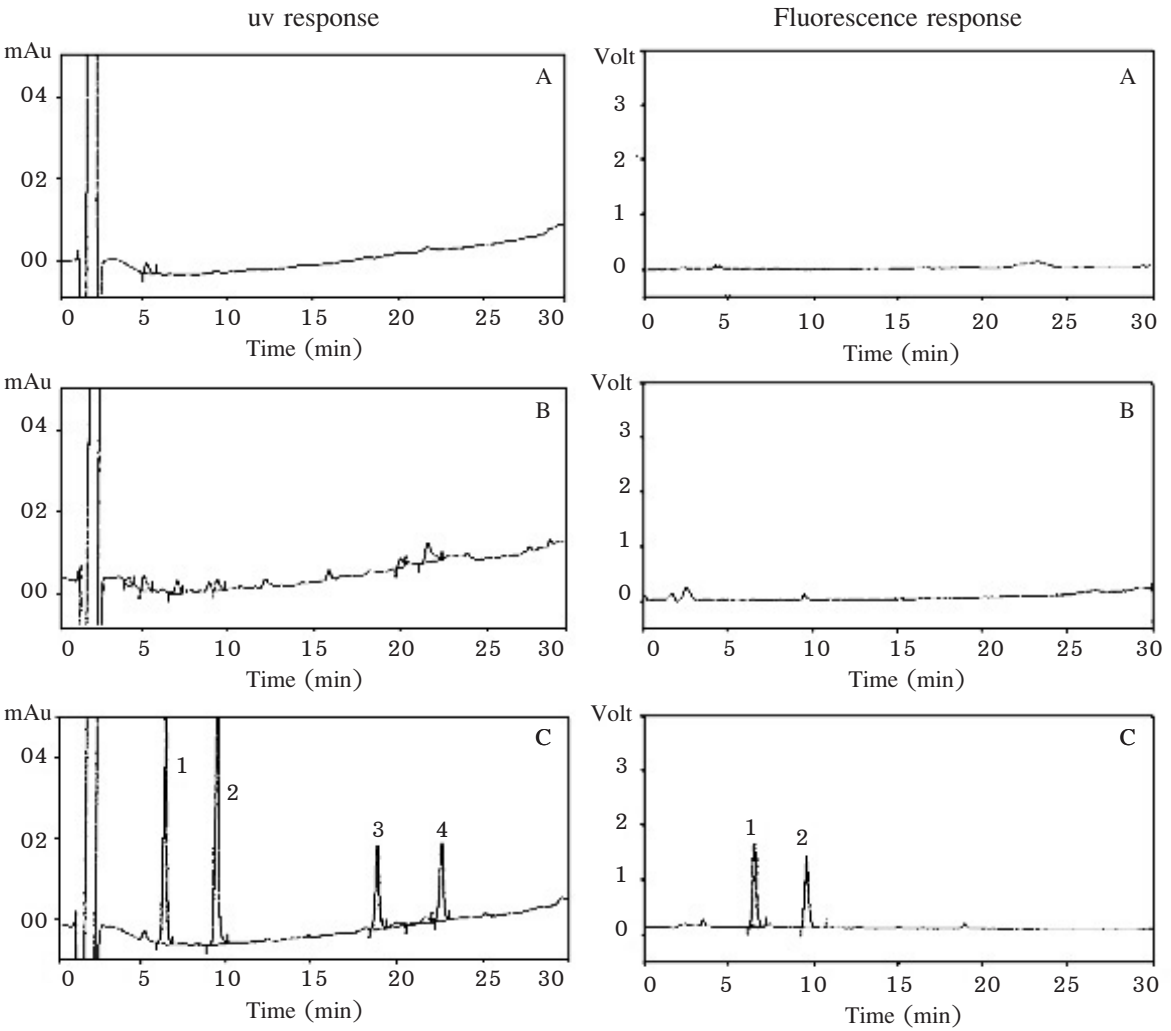
% Recovery ช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ 80 - 110

RSD เปรียบเทียบกับ Predicted RSD_r ตาม Horwitz's equation[11] ใช้ HORRAT (Horwitz ratio)[12]

$$HORRAT = \frac{\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted } RSD_R}$$

และ $RSD_r = 0.66 \times 2\,C^{(-0.1505)}$

โดย C คือ concentration ratio



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของ (A) Method blank (B) Matrix blank (C) สารมาตรฐาน Carbendazim (peak 1), Thiabendazole (peak 2), Triadimenol (peak 3) และ Triadimefon (peak 4) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ที่ AOAC กำหนด ยอมรับ < 2

ผล

จากสภาวะของเครื่องมือ HPLC ทั้ง Fluorescence และ UV detector ที่ใช้ พบว่า chromatogram ของ method blank และ matrix blank ที่ใช้มะเขือเทศเป็นตัวอย่าง ไม่มีพีครบกวน และสารมาตรฐาน carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon ทั้ง 4 สารแยกออกจากกันได้ดี เมื่อตรวจวัดด้วย UV detector ส่วน carbendazim และ thiabendazole ก็แยกได้ดีเช่นกันด้วย Fluorescence detector ดังแสดงในภาพที่ 1

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของสาร carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon โดยการฉีด standard mixture solution ความเข้มข้น 0.20, 0.60, 1.00, 1.50 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.9998, 0.9997, 0.9995 และ 0.9999 ตามลำดับ

ผลการทดสอบได้ค่า LOD เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LOQ เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยมีค่า % Recovery เฉลี่ยจากการเติมสาร carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon แล้ววิเคราะห์ 7 ซ้ำ เท่ากับ 82.9, 99.1, 89.9 และ 73.1 ตามลำดับ และได้ค่า RSD เท่ากับ 6.4, 4.9, 10.2 และ 16.0 ตามลำดับ

ในการทดสอบความตรงและช่วงการวิเคราะห์ พบว่าช่วงการวิเคราะห์ 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r ของสาร carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon เท่ากับ 0.9995, 0.9923, 0.9994 และ 0.6532 ตามลำดับ

การทดสอบความแม่นและความเที่ยง ด้วยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างมะเขือเทศ พบว่า % Recovery ของสาร carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon อยู่ในช่วง 82.9 - 95.4, 82.4 - 99.1, 89.9 - 95.3 และ 43.6 - 73.1 ตามลำดับ ส่วนค่า RSD อยู่ในช่วง 2.4 - 7.4, 4.9 - 8.6, 1.9 - 10.2 และ 10.4 - 20.3 ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า Predicted RSD_r จาก Horwitz's equation ที่ระดับ 0.1 - 1.0 มิลลิ-

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นเมื่อเติมสารมาตรฐาน 4 ชนิด ที่ระดับต่างๆ ระดับละ 7 ซ้ำ

Spiked level (mg/kg)	%Recovery (mean ± SD); n = 7			
	Carbendazim	Thiabendazole	Triadimenol	Triadimefon
0.1	82.9 ± 5.3	99.1 ± 4.9	89.9 ± 9.2	73.1 ± 11.7
0.2	85.0 ± 2.3	83.4 ± 6.3	-	-
0.3	89.0 ± 2.1	82.4 ± 4.2	-	-
0.4	-	-	93.5 ± 2.4	63.2 ± 11.5
0.5	95.4 ± 3.6	91.6 ± 6.7	92.1 ± 5.0	43.6 ± 4.5
0.6	-	-	95.3 ± 1.8	58.5 ± 11.9
1.0	85.4 ± 6.4	86.0 ± 7.4	89.9 ± 6.3	59.3 ± 9.8

หมายเหตุ - หมายถึงไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงเมื่อเติมสารมาตรฐาน 4 ชนิด ที่ระดับต่าง ๆ ระดับละ 7 ซ้ำ และค่า HORRAT

Spiked level (mg/kg)	Predicted RSD_r	RSD (HORRAT); n = 7			
		Carbendazim	Thiabendazole	Triadimenol	Triadimefon
0.1	15.0	6.4 (0.4)	4.9 (0.3)	10.2 (0.7)	16.0 (1.1)
0.2	13.4	2.7 (0.2)	7.5 (0.6)	-	-
0.3	12.6	2.4 (0.2)	5.1 (0.4)	-	-
0.4	12.1	-	-	2.5 (0.2)	18.2 (1.5)
0.5	11.7	3.8 (0.3)	7.4 (0.6)	5.4 (0.5)	10.4 (0.9)
0.6	11.4	-	-	1.9 (0.2)	20.3 (1.8)
1.0	10.6	7.4 (0.7)	8.6 (0.8)	7.0 (0.7)	16.5 (1.6)

หมายเหตุ - หมายถึงไม่มีข้อมูล

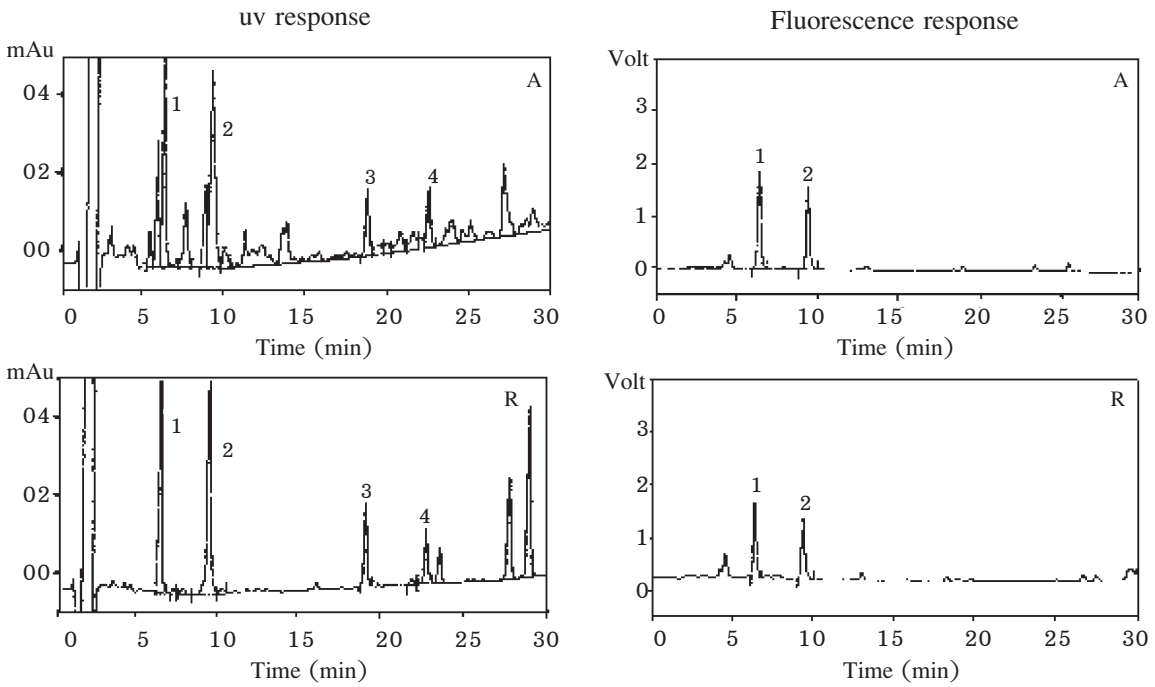
กรัมต่อกิโลกรัม ได้เท่ากับ 15.0 - 10.6% นำค่า RSD ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างมะเขือเทศที่เติมสารมาตรฐานระดับต่างๆ ระดับละ 7 ซ้ำ มาคำนวณค่า HORRAT พบว่าความแม่นยำในการวิเคราะห์สาร carbendazim, thiabendazole, triadimenol และ triadimefon มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ทั้งหมด รายละเอียดตามตารางที่ 1 และ 2

วิจารณ์

วิธีที่ได้ศึกษาและพัฒนาสามารถวิเคราะห์สารพร้อมกันหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว หรือที่เรียกว่าเป็น Multiresidue method ซึ่งเป็นหลักเกณฑ์หนึ่งที่คณะกรรมาธิการอาหารระหว่างประเทศ (Codex) กำหนดไว้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกวิธีวิเคราะห์ที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างจากเคมีกำจัดศัตรูพืช[13] ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การสกัด การทำให้บริสุทธิ์และการตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วย HPLC-UV และ Fluorescence detector ผู้วิจัยได้ทดลองวิธีการสกัด โดยปั่นตัวอย่างกับ phosphate buffer กับ methanol ระเหยลดปริมาตร โดยใช้ rotary evaporator เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ใน phosphate buffer แล้วนำมาผ่าน Extrelut NT20 cartridge ทิ้งไว้ 10 นาที จึงชะสารออกด้วย dichloromethane กับ hexane ซึ่งสะดวกและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีของ Muccio et al[3] ที่ปั่นตัวอย่างด้วย acetone แล้วนำมาผ่าน Extrelut 20 cartridge ทิ้งไว้ 10 นาที จึงเป่าไล่ acetone ด้วยก๊าซไนโตรเจนในอัตรา 2 ลิตรต่อนาที ใช้เวลานานถึง 30 นาที ซึ่งรวมเวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ไม่น้อยกว่า 40 นาที แต่วิธีที่ทดสอบใช้เวลาในขั้นตอนนี้ไม่เกิน 30 นาที ซึ่งทำให้วิเคราะห์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น และเพื่อทำให้สารสกัดสะอาดยิ่งขึ้น จึงเลือกใช้ Sep-Pak Alumina N ในขั้นตอนการ clean-up ก่อนนำไปตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยการทดสอบนี้ใช้สภาวะของ mobile phase เป็นระบบ gradient ทำให้สามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดออกจากกันได้ในการฉีดครั้งเดียว carbendazim และ thiabendazole สามารถตรวจวัดได้ทั้ง UV และ Fluorescence detector ซึ่งสามารถใช้ตรวจยืนยันการตรวจพบสารทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ด้วย ในการหาปริมาณของสาร 2 ชนิดนี้ จะคำนวณจาก Fluorescence detector เพราะพีคที่ได้ชัดเจนดีไม่มีสารรบกวน ส่วน triadimenol และ triadimefon ใช้ UV detector ในการตรวจวัดชนิดและปริมาณ

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ ซึ่งได้ทดสอบ performance parameter ที่กำหนดใน EURACHEM Guide ได้แก่ LOD, LOQ, accuracy, precision, linear & working range เพื่อแสดงว่าวิธีดังกล่าวเหมาะสมที่จะใช้กับวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ คือวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารตกค้างปริมาณน้อยได้ถูกต้องและแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ โดยวิธีที่พัฒนาได้ค่า LOD และ LOQ ต่ำกว่าค่า Maximum Residue Limits, MRL ของสารทั้ง 4 ชนิดที่ Codex กำหนดในผักและผลไม้ซึ่งกำหนดค่าแตกต่างกันเช่น กล้วย แตงกวา มะเขือเทศ สตรอเบอรี่ สับปะรด และองุ่น โดยรวมค่าที่กำหนด มีค่าตั้งแต่ 0.1 - 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม[14] ทำให้วิธีที่ศึกษาเหมาะสมที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสาร carbendazim, thiabendazole และ triadimenol ในตัวอย่างผักและผลไม้และสามารถนำข้อมูลผลการวิเคราะห์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ตามกฎหมายได้

สำหรับสาร triadimefon ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบวิธีพบว่า เมื่อเติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.1, 0.4, 0.5, 0.6 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ % Recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 43.6 - 73.1% และการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่าค่า r ที่ได้เท่ากับ 0.6532 ซึ่งทั้ง 2 parameters ต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดทั้งสิ้นถึงแม้ว่าค่าRSD จะอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ก็ตาม จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาสาเหตุ โดยตัดขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดลงในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับ 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้ววิเคราะห์ตามวิธีแต่ไม่ผ่าน Sep-pak Alumina N plus พบว่าทุกสารมีค่า % Recovery และ RSD ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่พบว่า Chromatogram



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารสกัดมะเขือเทศเมื่อเติมสารมาตรฐาน Carbendazim (1), Thiabendazole (2), Triadimenol (3) และ Triadimefon (4) ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (A) ไม่ผ่าน Sep-pak Alumina N plus (B) ผ่าน Sep-pak Alumina N plus

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงเมื่อเติมสารมาตรฐาน 4 ชนิด ที่ระดับต่าง ๆ ระดับละ 7 ซ้ำ โดยไม่ผ่าน Sep-pak Alumina N plus

Spiked level (mg/kg)	Mean% recovery (RSD); n = 7			
	Carbendazim	Thiabendazole	Triadimenol	Triadimefon
0.1	94.6 (8.1)	85.6 (8.0)	85.9 (19.8)	81.3 (15.8)
0.5	87.3 (5.8)	89.9 (5.4)	84.8 (5.7)	86.9 (9.2)
1.0	84.2 (6.6)	87.0 (6.5)	83.2 (4.3)	80.0 (4.7)

ที่ได้ เมื่อตรวจวัดด้วย UV detector มีพีครบกวนมาก ซึ่งมีผลกระทบต่อการคำนวณปริมาณและทำให้อายุการใช้งานของ HPLC column สั้นลงด้วย ดังแสดงในภาพที่ 2 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sep-pak ยังมีความจำเป็น และสำหรับการวิเคราะห์สาร triadimefon นั้น จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมยิ่งขึ้นต่อไป

สรุป

ผลจากการวิจัยนี้สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาชนิดและปริมาณของสาร carbendazim, thiabendazole และ triadimenol ตกค้างในผักและผลไม้ได้พร้อมกันในการวิเคราะห์ครั้งเดียว ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากเนื่องจากสามารถประหยัดเวลาและปริมาณสารเคมีที่ใช้ ทั้งยังสามารถตรวจวัดการตกค้างในระดับต่ำ ๆ ได้ ตามที่กฎหมายกำหนด ส่วนการหาปริมาณของสาร triadimefon ยังไม่เหมาะสม ต้องมีการพัฒนาขั้นตอนการวิเคราะห์ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น อย่างไรก็ดี วิธีดังกล่าวอาจนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ธัญญพืช เครื่องดื่มจากผักและผลไม้ เป็นต้น และยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางที่จะนำไปขยายขอบข่ายการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม fungicides ชนิดอื่นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. กรุงเทพฯ, กลุ่มหนังสือเกษตร; 2528 : 20 และ 118-9.
2. Tomlin C. editor. The pesticide manual, 10th ed. The Royal Society of Chemistry; 1995: p.149, 972, 1000-1.
3. Muccio A, Girolimetti S, Barbini DA, Pelosi P, Generali T, Vergori L, *et al.* Selective clean up applicable to aqueous acetone extracts for the determination of carbendazim and thiabendazole in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography with UV detection. J Chromatogr A 1999; 833: 61-5.
4. Tharsis N, Portillo JL, Broto-Puig F, Comellas L. Simplified reversed-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection. J Chromatogr A 1997; 78: 95-101.
5. Arenas RV, Rahman H, Johnson NA. Determination of thiabendazole residues in whole citrus fruits by liquid chromatography with fluorescence detection. J AOAC Int 1996; 79 (2): 579-82.
6. Hiemstra M, Joosten JA, Kok A. Fully automated solid-phase extraction cleanup and on-line liquid

chromatographic determination of benzimidazole fungicides in fruits and vegetables. J AOAC Int 1995; 78 (5): 1267-74.

7. Muccio A, Dommacro R, Barbini DA, Santilio A, Girolimetti S, Ausili A, *et al.* Application of solid-phase partition cartridges in the determination of fungicide residues in vegetable samples. J Chromatogr 1993; 643: 363-8.
8. Muccio A, Camoni I, Ventriglia M, Barbini DA, Mauro M, Pelosi P, *et al.* Simplified clean up for the determination of benzimidazolic fungicides by high performance liquid chromatography with UV detection. J Chromatogr A 1995; 697: 145-52.
9. EURACHEM Guide. The fitness for purpose of analytical method; A laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom, 1998. 61: 5-24.
10. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, แนวทางการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ DMSc Method Validation: General Guide: p.18-20.
11. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. J Assoc Off Anal Chem 1980; 63 (6): 1344-54.
12. Horwitz W, Britton P, Chirtel SJ. A simple method for evaluating data from an interlaboratory study. J AOAC Int 1998; 81: 1257-65.
13. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Volume 2A Part 1 Pesticide residues in food. Methods of analysis and sampling. 2nd ed., Rome, Italy: FAO; 2000: p.49-51.
14. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Pesticide Residues. Thirty-fourth session. Agenda Item 6, CX/PR 02/6, April 2000: Part 1-61, 66, 133, 172.

Method Validation for Determination of Fungicides in Vegetables and Fruits

Jitpaka Suntudrob and Kanokporn Atisook

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Carbendazim, thiabendazole, triadimefon and triadimenol are the most imported fungicides used for prevention and treatment of plant fungal disease. Malpractices in using such fungicides may cause residues in agricultural products. An analytical method for these 4 fungicides residue determination was studied and developed. The method could be performed easily by using HPLC-UV and fluorescence detector. The method was validated by using tomatoes as matrix represented for vegetables and fruits. The results showed that the limit of detection and limit of quantitation for carbendazim, thiabendazole, and triadimenol was 0.03 mg/kg and 0.10 mg/kg. The linear working range for these 3 compounds was 0.10 to 1.00 mg/kg which the correlation coefficient of carbendazim, thiabendazole, and triadimenol were 0.9995, 0.9923 and 0.9994, respectively. Accuracy of the method was shown by % recovery of spiking standards to sample matrix at different levels and precision was shown by % Relative Standard Deviation (%RSD). For carbendazim, thiabendazole, and triadimenol, % recovery were 82.9 - 95.4%, 82.4 - 99.1% and 89.9 - 95.3% and RSD were 2.4 - 7.4%, 4.9 - 8.6% and 1.9 - 10.2%, respectively. Validation studies proved that the developed method could be used for determining carbendazim, thiabendazole and triadimenol simultaneously. On the contrary, the method should be developed further for triadimefon residue analysis.

Key words : Carbendazim, Fungicides, Thiabendazole, Triadimefon, Triadimenol