

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารคลอไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาวแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค
สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Development of a Rapid Method for Chlorpyrifos Residue Determination in Yard Long Bean using Near
Infrared Spectroscopy

เอเลียห์ เลิศกุศล¹ พรธเรศ ดวงสุวรรณ¹ นิโบล โกมลสิงห์¹ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารู¹ บุศรากรณ์ มหาโยธี¹
Aleeya Lerdkuson¹, Pontalate Duangsuwan¹, Nilobon Komonsing¹, Pramote Khuwijitjaru, Busarakorn Mahayothee¹

Abstract

This research was aimed to study the feasibility of near infrared spectroscopy (NIRs) technique for determination of insecticide residue in yard long bean. A total of 112 organic yard long bean samples were prepared by homogenizing and then adding standard chlorpyrifos at the concentration range of 0.02-250 ppm. Determination of retained chlorpyrifos in samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Spectra were acquired from each sample in five different modes of preparation including, paste, acetonitrile extracted solution (2nd extracted solution), toluene extracted solution (3rd extracted solution) and dry extract system for near infrared (DESIR) for 2nd and 3rd extracted solution, in wavelength 800-2500 nm. Reflectance mode was applied to paste while transmittance mode was applied to extracted solution. In addition, transmittance mode was used for DESIR samples. It was found that calibration model built from paste's spectrum gave the best model for prediction with R² 0.8463, RMSECV 23.4 ppm, RPD 2.55 and bias 0.596 and the model from DESIR of acetonitrile extracted solution gave R² 0.8422, RMSECV 20.1 ppm, RPD 2.53. When consider R² and RPD, NIRs was able to roughly determine chlorpyrifos residue in yard long bean by measuring spectra from paste. However, it was found that the percentage error of the predicted values compared to the true values was very high especially for the samples with chlorpyrifos concentration less than 100 ppm. Therefore, more samples should be taken to build the new model.

Keywords: insecticide residue, rapid analysis, yard long bean

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรวจสอบสารคลอไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาวแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near infrared spectroscopy, NIRs) โดยศึกษาในตัวอย่างถั่วฝักยาวอินทรีย์จำนวน 112 ตัวอย่าง โดยเติมสารคลอไพริฟอสลงในตัวอย่างปั่นละเอียดให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02-250 ppm วิเคราะห์ปริมาณคลอไพริฟอสในตัวอย่างด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) โดยในแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดสเปกตรัมจากตัวอย่างที่เตรียมแตกต่างกัน 5 แบบ ได้แก่ ตัวอย่างปั่นละเอียด สารสกัดที่ได้จากการสกัดถั่วฝักยาวปั่นละเอียดด้วยอะซิโตนไตรโซล (สารสกัดขั้นที่ 2) สารสกัดที่ได้จากการสกัดถั่วฝักยาวปั่นละเอียดด้วยโทลูอีน (สารสกัดขั้นที่ 3) และการใช้เทคนิค dry extract system for near infrared (DESIR) กับสารสกัดขั้นที่ 2 และ 3 โดยวัดในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร ตัวอย่างปั่นละเอียดจะวัดในรูปแบบการสะท้อน สารสกัดวัดในรูปแบบส่องผ่านแล้วสะท้อนกลับ และ DESIR วัดในรูปแบบส่องผ่าน จากการศึกษาพบว่าการสร้างสมการจากสเปกตรัมที่วัดจากถั่วฝักยาวปั่นละเอียดให้ R² สูงที่สุดที่ 0.8463 RMSECV 23.4 ppm RPD 2.55 และค่าความเอนเอียง 0.596 และสมการที่สร้างจากสเปกตรัมของเทคนิค DESIR ของสารสกัดขั้นที่ 2 จะให้ R² 0.8422 RMSECV 20.1 ppm และ RPD 2.53 เมื่อพิจารณาจากค่า R² และ RPD ที่สูง พบว่าเทคนิค NIRs สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารคลอไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาวได้ในระดับหยาบๆ โดยวัดสเปกตรัมจากตัวอย่างปั่นละเอียด อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่าร้อยละของความผิดพลาดของค่าที่ได้จากการทำนายด้วย NIRs กับค่าจริง พบว่ามีความผิดพลาดสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการสร้างสมการ

คำสำคัญ: ยาฆ่าแมลงตกค้าง การวิเคราะห์แบบรวดเร็ว ถั่วฝักยาว

¹ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

¹Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000

คำนำ

ปัญหาหลักของการส่งออกถั่วฝักยาวคือการตกค้างของยาฆ่าแมลงเกินมาตรฐานกำหนด จากผลการสุ่มตรวจยาฆ่าแมลงตกค้างในฝักของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืชพบว่าตัวอย่างถั่วฝักยาวที่สุ่มมาทั้งหมดมีการปนเปื้อนสารพิษตกค้างยาฆ่าแมลงเกินที่กฎหมาย กำหนดร้อยละ 42.9 โดยสารคลอไพริฟอสเป็นหนึ่งในสารที่พบว่ามีสารตกค้างมากในถั่วฝักยาว (Thai-PAN, 2558) วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในถั่วฝักยาว ในปัจจุบันมีข้อกำหนดคือเป็นวิธีที่ทำลายตัวอย่าง ใช้ระยะเวลาสั้น และต้องการผู้ที่มีประสบการณ์ทำงานมาก เทคนิค NIRs จึงมีความน่าสนใจในการนำมาวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในถั่วฝักยาวเพราะเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและไม่ทำลายตัวอย่างหรือมีการเตรียมตัวอย่างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ เทคนิค NIRs ในการติดตามปริมาณคลอไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาว

อุปกรณ์และวิธีการ

1 ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ในการศึกษานี้เลือกซื้อถั่วฝักยาวอินทรีย์จากห้างสรรพสินค้าจำนวน 88 ตัวอย่าง และซื้อถั่วฝักยาวที่คาดว่ามีการตกค้างของยาฆ่าแมลงที่ตลาดปทุมมงคล จังหวัดนครปฐมจำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเลือกถั่วฝักยาวที่ไม่มีตำหนิ จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นละเอียด แล้วชั่งตัวอย่าง 15 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml จากนั้นเติมสารมาตรฐานคลอไพริฟอสลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้นคลอไพริฟอสตามที่ต้องการ (0.02-250 ppm) เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที ตัวอย่างที่ผสมกับสารมาตรฐานคลอไพริฟอสเรียบร้อยแล้ว เรียกว่า “paste” จากนั้น “paste” จะถูกนำไปสกัดโดยใช้วิธี QuEChERS ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lehotay (2007) เติมอะซิโตนไตรเอิล 15 ml เติม MgSO₄ anh. 6±0.3 g และ NaOAc 2.5±0.2 g แล้วเขย่าให้เข้ากัน 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลายเป็นเวลา 1 นาที ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ได้สารสกัดสีเขียวใสลอยอยู่ด้านบน สารสกัดนี้เรียกว่า “สารสกัดขั้นที่ 2” ดูดสารสกัดใส่มา 5 ml ใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงขนาด 15 ml เพื่อทำให้บริสุทธิ์โดยเติม MgSO₄ anh. 0.75±0.15 g, PSA 2.5±0.05 g และ GCB 0.1±0.02 g เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลายเป็นเวลา 1 นาที ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ดูดสารสกัดส่วนใสมา 3.5 ml ใส่ลงในหลอดปรับปริมาตร เติมโทลูอีนลงไป 0.5 ml จากนั้นเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยอะซิโตนไตรเอิลออก เป่าระเหยจนเหลือปริมาตรสารสกัด 0.5 ml จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 3.5 ml ด้วยโทลูอีนได้สารสกัดสุดท้าย เรียกสารสกัดส่วนนี้ว่า “สารสกัด ขั้นที่ 3” สารสกัด 1 ml จะถูกนำไปกรองผ่าน 0.45 µm ของไนลอนฟิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ค่าทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี สารสกัดทั้งสองขั้นตอนจะถูกแบ่งมาเตรียมการวัดในระบบ NIRs ด้วยเทคนิค DESIR โดยนำสารสกัด 1 ml ของในแต่ละขั้นตอนมาหยดลงบนกระดาษกรองไมโครไฟเบอร์ชนิดใยแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 37 mm แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้หมด ได้เป็น “DESIR ขั้นที่ 2” และ “DESIR ขั้นที่ 3”

2 การวัดในระบบของสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

นำตัวอย่าง “paste” “สารสกัดขั้นที่ 2” “สารสกัดขั้นที่ 3” “DESIR ขั้นที่ 2” และ “DESIR ขั้นที่ 3” มาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ FT-NIR รุ่น MPA (บริษัท Bruker Hong Kong Limited) ใช้ความยาวคลื่น 800-2500 nm วัดสเปกตรัมในระบบการวัดในรูปแบบต่างๆแสดงใน Figure 1 จากนั้นเส้นสเปกตรัมและค่าทางเคมีจะถูกนำไปสร้างสมการทำนายและทวนสอบสมการด้วย cross validation โดยใช้โปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2.139.1294

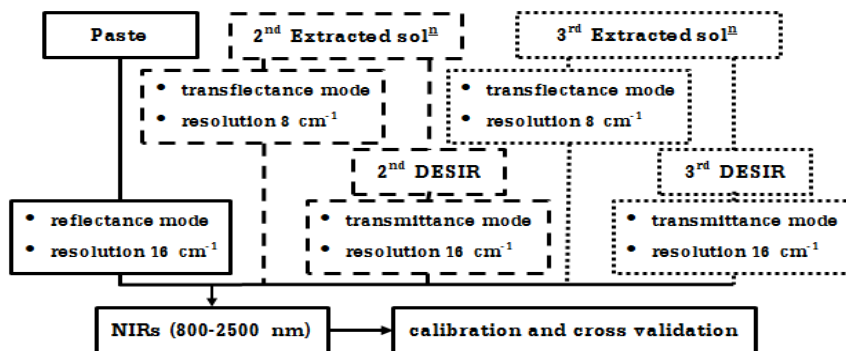


Figure 1 Flowchart of NIRs measurement.

3 ระบบการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

วัดปริมาณคลอไพริฟอสตกค้างในถั่วฝักยาวด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Shimadzu GCMS-QP2010Ultra, Ionization method: EI) ใช้คอลัมน์ Agilent DB-5ms ขนาด 0.25 mm x 30 m ปริมาตรฉีด 2 μ L ในรูปแบบฉีดเข้าทั้งหมด อุณหภูมิฉีดเข้า 250°C ระบบการตั้งค่าอุณหภูมิของตู้คอลัมน์เป็น 100°C เป็นเวลา 1.865 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 30 °C ต่อนาทีเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 175 °C จึงเพิ่มอัตราเป็น 6.5 °C ต่อนาที จนอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 210 °C แล้วคงที่ไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 20 °C ต่อนาทีจนอุณหภูมิสูงถึง 280 °C คงที่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ตั้งอุณหภูมิของแมสสเปกโตรเมตรีที่ 230 °C เวลาในการกำจัดตัวทำลาย 2.8 นาที

ผล

สเปกตรัมจากเทคนิค NIRs ของตัวอย่างถั่วฝักยาวจะแสดงดัง Figure 2 โดยภาพที่ 2A คือสเปกตรัมของ paste และ 2B คือสเปกตรัมของสารสกัดชั้นที่ 2 พบว่าเส้นสเปกตรัมของ paste มีลักษณะเป็นพีคกว้าง (broad band) และมีการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมตามแนวแกน y (baseline shift effect) จะพบพีคที่ความยาวคลื่น 1400-1500 nm ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำ ส่วนสเปกตรัมของสารสกัดชั้นที่ 2 จะไม่พบทั้งพีคที่ตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำและ baseline shift effect และจากการสร้างสมการการทำนายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่าง 5 แบบ พบว่าสมการที่ให้ค่า R² และ RPD ที่ดีที่สุดในกลุ่มทวนสอบคือสมการทำนายที่สร้างจาก paste (Table 1) สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทวนสอบของ paste แสดงใน Figure 3 จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line แต่พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่มีการกระจายออกจากเส้น target line โดยเฉพาะข้อมูลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ppm ทำให้ค่าความผิดพลาดในการทำนายสูง

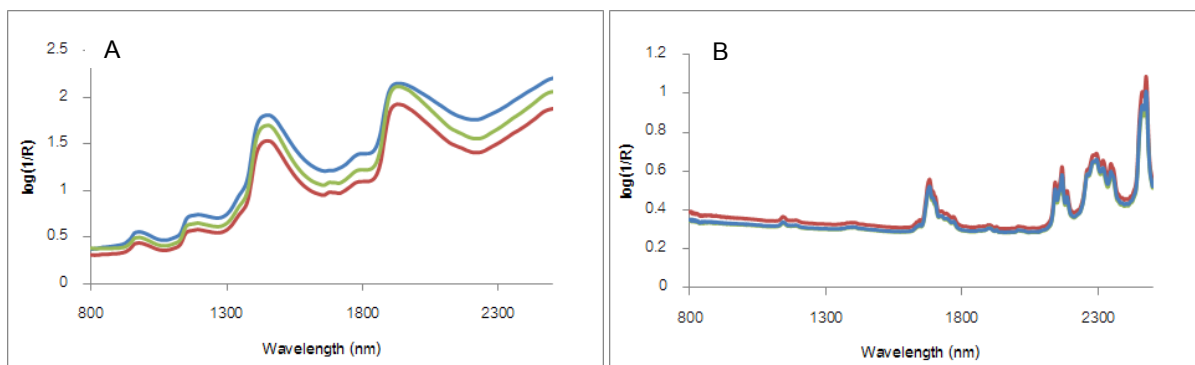


Figure 2 NIR spectra of yard long bean paste (A) and acetonitrile extracted solution (B)

Table 1 Statistic values of calibration and validation models that were built from different modes of spectral acquisition

Samples	N	Pretreatment	Calibration		Validation			Bias
			R ²	RMSEE (ppm)	R ²	RMSECV (ppm)	RPD	
paste	107	1 st derivative	0.9096	18.5	0.8463	23.4	2.55	0.596
2 nd extracted sol ^l	100	SNV	0.9445	12.8	0.7916	23.9	2.19	0.462
2 nd DESIR	102	1 st + SNV	0.8825	17.7	0.8422	20.1	2.53	0.276
3 rd extracted sol ^l	109	COE	0.8578	22.2	0.3807	44.4	1.27	-0.0757
3 rd DESIR	101	1 st + SNV	0.7950	16.5	0.6588	20.9	1.71	0.267

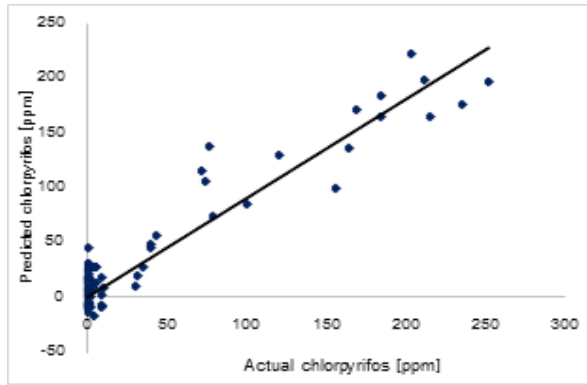


Figure 3 Scattering plot of validation model of paste

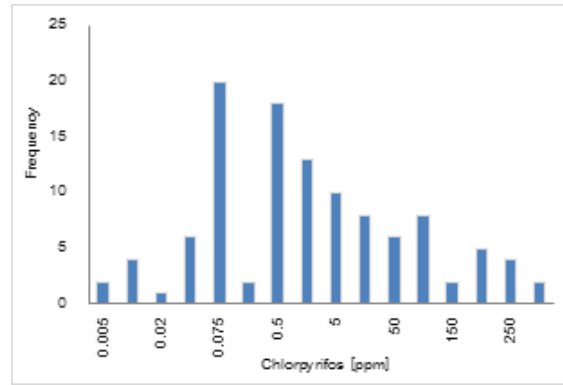


Figure 4 Histogram of chlorpyrifos concentrations that were used in this study

วิจารณ์ผล

ถึงแม้ผลทางสถิติใน Table 1 จะพบว่าการสร้างสมการทำนายจาก paste จะให้ผลที่ดี โดยจะให้ R^2 และ RPD ที่สูง อย่างไรก็ตามหากพิจารณาจากค่า RMSECV ยังพบว่ามีความสูง ซึ่งหมายถึงเทคนิคนี้ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการทำนายปริมาณคลอไพริฟอสในถั่วฝักยาวได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการบางส่วนมีความเข้มข้นต่ำมาก ซึ่งจากภาพที่ 4 แสดงถึงแผนภาพการกระจายของข้อมูลทางเคมีที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน จะพบว่ามิตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของคลอไพริฟอสที่ต่ำกว่า 100 ppm อยู่มาก ซึ่งอาจทำให้การความผิดพลาดในการใช้เทคนิค NIRs ในการทำนาย

สรุป

การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการสำหรับตรวจสอบคลอไพริฟอสในถั่วฝักยาวที่ให้ค่า R^2 และ RPD สูงที่สุดนั้นได้จากเส้นสเปกตรัมจาก paste และรองลงมาจะเป็นสมการที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมจาก DESIR ขั้นที่ 2 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความผิดพลาดของค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค NIRs กับค่าจริงที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ของตัวอย่างที่ศึกษา (%error) พบว่าสมการที่ได้ยังไม่มีความเป็นไปได้ในการทำนายคลอไพริฟอสโดยเฉพาะในช่วงที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm เนื่องจากให้ความผิดพลาดที่สูง ในขณะที่ช่วงความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ให้ค่าความผิดพลาดร้อยละ 12.6 ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการสร้างสมการ

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้: กรณีศึกษาถั่วฝักยาวและพริก” ภายใต้ชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของผลิตผลการเกษตร และผลิตภัณฑ์อาหารอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้” ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555 และ 2556 ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ขอขอบคุณ Professor Dr. Shuji Adachi และ Assist. Professor Dr. Takashi Kobayashi จาก Laboratory of Bioengineering, Division of Food Science and Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku Kyoto, Japan สำหรับการสนับสนุนด้านการใช้ GC-MS

เอกสารอ้างอิง

- เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Thai-PAN). 2558. ผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักประจำปี 2558. [ระบบออนไลน์].
 แหล่งที่มา : <http://www.thaipan.org/sites/default/files/conference2558/veg%202558%20final.pdf>. (17 พฤษภาคม 2558).
 Lehotay, S. J. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. Journal of AOAC. International 90(2): 485-520.