

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

##### การเตรียมค่น้ำเพื่อใช้ในการทดสอบสารกำจัดแมลงตกค้าง

ทำการปลูกคะน้ำสายพันธุ์ *Brassica oleracea* var. *alboglabra* ลงในถุงที่บรรจุดินขุยมะพร้าวสำเร็จรูปสำหรับปลูกต้นไม้ขนาด 7x11 นิ้ว โดยไม่ใช้สารกำจัดแมลงตลอดระยะเวลาในการปลูก เมื่อต้นคะน้ำมีอายุได้ 35-40 วัน จึงเก็บไปใช้ในการทดลอง

##### การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการทดลอง

ในการทดลองได้มีการใช้สารกำจัดแมลง 2 ชนิด คือ คลอร์ไพริฟอส และมาลาไทออน โดยใช้ทั้งชนิดที่เป็นสารมาตรฐาน และสารที่ใช้ในการเกษตร

- สารกำจัดแมลงมาตรฐานเตรียมจาก stock solution คลอร์ไพริฟอสเข้มข้น 1067.7 ppm และมาลาไทออนเข้มข้น 1122.36 ppm ให้ได้สารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mg/L

- สารกำจัดแมลงที่ใช้ในการเกษตรเตรียมจากคลอร์ไพริฟอส 20% และมาลาไทออน 57% ให้ได้สารทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mg/L

- 4-(4-nitrobenzyl)pyridine (NBP) ที่ความเข้มข้น 2, 5 และ 10% ใน acetone

- tetraethylenepentamine (TEP) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ใน acetone

##### เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

เครื่อง GC รุ่น 6890N injection port ชนิด split/splitless capillary inlet สามารถใช้งานแบบ split และ splitless สามารถใช้กับ capillary column ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.1-0.53 mm ได้ โดยใช้ชุดตรวจวัดสัญญาณชนิด flame photometric detector (FPD) : สามารถวิเคราะห์สารที่มีฟอสฟอรัส (phosphorous, P) หรือ ซัลเฟอร์ (sulphur, S) เป็นองค์ประกอบ เช่น  $H_2S$ ,  $SO_2$  และสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม organophosphorous pesticides



ภาพ 3.1 Gas Chromatography 6890N

### วิธีการทดลอง

**การทดลองที่ 1 ทดสอบหาภาวะที่ดีที่สุดในการตรวจหาสารกำจัดแมลง โดยทดสอบกับสารกำจัดแมลงโดยตรง**

#### 1.1 หาความเข้มข้นของ NBP ที่ดีที่สุดในการตรวจหาสารกำจัดแมลงมาตรฐาน

นำสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสมาตรฐานเข้มข้น 0.5 mg/L ที่เตรียมไว้ใส่หลอดทดลอง 1 ml จากนั้นเติม NBP เข้มข้น 2% ลงในหลอด 0.1 ml เขย่าเล็กน้อยและนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ให้สารละลายในหลอดทดลองแห้งสนิท ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม TEP เข้มข้น 10% ลงในหลอดทดลอง 1 ml และอ่านผลการทดลองทันที โดยการสังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ซึ่งการทดลองที่เป็นผลบวกสีของสารละลายจะมีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม และการทดลองที่เป็นผลลบสารละลายจะใสไม่มีสี ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

ทำการทดลอง 1.1 ซ้ำโดยเปลี่ยนสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสมาตรฐานเข้มข้น 0.5 mg/L เป็น 1.0 และ 5.0 mg/L และมาลาโทออนมาตรฐานเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mg/L จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของ NBP จาก 2% เป็น 5 และ 10% ทดสอบกับสารกำจัดแมลงทั้ง 2 สองชนิด ให้ครบทุกความเข้มข้น เพื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์หาความแปรปรวน (analysis of variance) และ

เปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์การอ่านผลพบสารกำจัดแมลงของสาร NBP ในแต่ละความเข้มข้น ด้วยวิธี least significant difference, LSD

### 1.2 หาความเข้มข้นของ TEP ที่ดีที่สุดในการตรวจหาสารกำจัดแมลงมาตรฐาน

นำสารกำจัดแมลงมาตรฐานที่เตรียมไว้ใส่หลอดทดลอง 1 ml จากนั้นเติม NBP เข้มข้น 5% (ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1) ลงในหลอด 0.1 ml เขย่าเล็กน้อยและนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ให้สารละลายในหลอดแห้งสนิท ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม TEP เข้มข้น 5% ลงในหลอดทดลอง 1 ml และอ่านผลการทดลองทันที โดยการสังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ซึ่งการทดลองที่เป็นผลบวกสีของสารละลายจะมีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม และการทดลองที่เป็นผลลบสารละลายจะใสไม่มีสี ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

ทำการทดลอง 1.1 ซ้ำโดยเปลี่ยนสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสมาตรฐานเข้มข้น 0.5 mg/L เป็น 1.0 และ 5.0 mg/L และมาลาโทออนมาตรฐานเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mg/L จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของ TEP จาก 5% เป็น 10 และ 15% ทดสอบกับสารกำจัดแมลงทั้ง 2 สองชนิด ให้ครบทุกความเข้มข้น เพื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์การอ่านผลพบสารกำจัดแมลงของสาร TEP ในแต่ละความเข้มข้น ด้วยวิธี least significant difference, LSD

### 1.3 ทดสอบสถานะที่ได้จากการทดลอง 1.1 และ 1.2 ในการตรวจหาสารกำจัดแมลงที่ใช้ในการเกษตร

นำสารกำจัดแมลงที่ใช้ในการเกษตรที่เตรียมไว้ใส่หลอดทดลอง 1 ml จากนั้นเติม NBP เข้มข้น 5% (ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1) ลงในหลอด 0.1 ml เขย่าเล็กน้อยและนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ให้สารละลายในหลอดแห้งสนิท ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม TEP เข้มข้น 5% (ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.2) ลงในหลอดทดลอง 1 ml และอ่านผลการทดลองทันที โดยการสังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ซึ่งการทดลองที่เป็นผลบวกสีของสารละลายจะมีสีม่วงอ่อนไปจนถึงม่วงเข้ม และการทดลองที่เป็นผลลบสารละลายจะใสไม่มีสี ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

สารกำจัดแมลงที่ใช้ในการทดลองคลอร์ไพริฟอส และมาลาโทออนที่ใช้ในการเกษตรเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mg/L ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 20 ซ้ำ เพื่อเป็นการยืนยันความ

สามารถในการตรวจพบสารกำจัดแมลงของสาร NBP และ TEP และเปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์การอ่านผลพบสารกำจัดแมลงในแต่ละความเข้มข้น ด้วยวิธี least significant difference, LSD

## การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจหาสารกำจัดแมลงตกค้างในผัก โดยใช้สารกำจัดแมลงมาตรฐานในการทดสอบ

### การเตรียมตัวอย่างผัก

ใช้ผักคะน้าอายุ 35-40 วันที่ปลูกไว้ จุ่มลงในสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสและมาลาโทออนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mg/L ใช้ตัวอย่างผักคะน้าจุ่มในน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม แต่ละความเข้มข้นของสารใช้ผักคะน้า 300 g ผึ่งไว้ให้แห้งและบรรจุในถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13-15 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### วิธีการสกัดตัวอย่างผัก

การสกัดจะใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ทำการชั่งตัวอย่างผัก 10 g จากนั้นหั่นให้ละเอียด ใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml. เติม dichloromethane ปริมาณ 20 ml เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานานประมาณ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และใช้ส่วนใสในการทดสอบ

### การตรวจหาการตกค้างสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสและมาลาโทออนมาตรฐานในตัวอย่างผักคะน้า

นำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการตกค้างด้วยสาร NBP และ TEP ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 โดยนำสารสกัดที่ได้ใส่หลอดทดลอง 1 ml จากนั้นเติม NBP เข้มข้น 5% ลงในหลอด 0.1 ml เขย่าเล็กน้อยและนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ให้สารละลายในหลอดแห้งสนิท ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม TEP เข้มข้น 5% ลงในหลอดทดลอง 1 ml และอ่านผลการทดลองทันที โดยการสังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วยสายตา ซึ่งการทดลองที่เป็นผลบวกสีของสารละลายจะมีสีม่วงอ่อน ไปจนถึงม่วงเข้ม และการทดลองที่เป็นผลลบสารละลายจะใสไม่มีสี ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

จากการทดลองเบื้องต้นสีเขียวจากการสกัดตัวอย่างไม่มีผลต่อการเกิดสีม่วง และการวัดผลการทดลองจะนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์สารตกค้างมาตรฐาน โดยใช้เทคนิค GC

### วิธีการสกัดตัวอย่างผักเพื่อการวิเคราะห์สารตกค้างด้วยเทคนิค GC (Steinwandter, 1985)

- นำตัวอย่างผักค่น้ำที่ต้องการวิเคราะห์มาบดให้ละเอียด
- ตักตัวอย่างที่ได้ 25 g ใส่ลงในขวดตัวอย่าง
- นำมาปั่นกับ acetone 50 ml ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
- เติม Sodium chloride 10 g และ dichloromethane 40 ml
- นำไปปั่น แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
- เทส่วนใสใส่ลงใน flask ปิดด้วยกระดาษฟรอย
- เติม Sodium sulphate 1 ช้อนโต๊ะ ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว
- กรองผ่าน Sodium sulphate ลงใน Cylinder ให้ได้ปริมาณ 50 ml
- เทสารจาก cylinder ลงใน round bottom flask
- นำไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ความดัน 500 bar จนเกือบแห้ง
- ใช้ acetone ล้างสารใน round bottom flask ใส่ลงใน volumetric flask ให้ได้ 5 ml
- นำไปวิเคราะห์สารตกค้างด้วยเทคนิค GC

### การทดลองที่ 3 การพัฒนาชุดทดสอบสารพิษตกค้าง และทดสอบอายุการใช้งานของชุดทดสอบ

#### 3.1 ทำการพัฒนาชุดทดสอบสารพิษตกค้าง

เมื่อได้ความเข้มข้นของสาร NBP และ TEP ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 แล้วจึงนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบ โดยพัฒนาวิธีการทดสอบเป็นแบบ spot test โดยหยดตัวอย่างสารกำจัดแมลงและสารต่างๆที่ใช้ในการทดสอบลงบนกระดาษฟิคาขนาด 60 mm แทนการใช้หลอดทดลอง เพื่อสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ง่ายขึ้น โดยการลดอัตราส่วนในการใช้สารทดสอบและสารตัวอย่างจากวิธีการทดลองที่ 1 ลงซึ่งอาจจะลดได้ 20, 50, 70 และ 90% เพื่อปรับให้มีวิธีการทดสอบที่ง่ายขึ้นและต้องสามารถอ่านผลการทดลองได้อย่างชัดเจน

#### 3.2 ทดสอบหาอายุการใช้งานของชุดทดสอบ

เนื่องจากสารที่ใช้ในการทดสอบควรมีวันหมดอายุ หรือมีการเสื่อมสภาพลงดังนั้นควรมีการทดสอบอายุการใช้งาน โดยการเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เติม NBP และ TEP เข้มข้น 5% เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส และมาลา

ไทออนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5.0 mg/L โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ ทุก ๆ 7 วันจนครบ 3 เดือนหรือจนกว่าจะไม่สามารถตรวจสอบได้ (หมดประสิทธิภาพ)

**การทดลองที่ 4 การหาการสลายตัวของสารกำจัดแมลงมาตรฐานในตัวอย่างผักคะน้าหลังจากการเก็บรักษาด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น**

**การเตรียมตัวอย่างผัก**

ใช้ผักคะน้าอายุ 35-40 วันที่ปลูกไว้ จุ่มลงในสารกำจัดแมลงมาตรฐานคลอร์ไพริฟอส 2.0 mg/L (MRL: กัล้าน) และมาลาไทออน 3.0 mg/L (MRL: ผักคะน้า) แต่ละความเข้มข้นของสารใช้ผักคะน้า 1 kg โดยใช้น้ำกัล้านเป็นชุดควบคุม ผึ่งไว้ให้แห้งและบรรจุในถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13-15 °C ซึ่งวิธีการสกัด และการทดสอบทำตามผลการทดลองที่ 3

ในการทดสอบจะใช้ตัวอย่างผักที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0, 2 และ 4 วัน โดยทำการทดสอบดังนี้

ชุดการทดลอง 1 ตัวอย่างผักที่ไม่ได้ผ่านการล้าง

ชุดการทดลอง 2 ตัวอย่างผักที่ผ่านการล้าง

ชุดการทดลอง 3 น้ำล้างผักจากชุดการทดลอง 2

แต่ละชุดการทดลองจะมีความเข้มข้นสารกำจัดแมลง 3 ระดับ คือ 0 mg/L (ชุดควบคุม: น้ำกัล้าน), 2.0 mg/L (คลอร์ไพริฟอสมาตรฐาน) และ 3.0 mg/L (มาลาไทออนมาตรฐาน) จะเห็นว่าการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงค่อนข้างสูง ทั้งนี้เพื่อให้เห็นแนวโน้มการลดลงของสารกำจัดแมลงหลังจากการเก็บรักษาได้อย่างชัดเจน โดยทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 20 ซ้ำ และจะทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีการวิเคราะห์สารตกค้างมาตรฐานด้วยเทคนิค GC