

Identification and quantification of herbicides atrazine and diuron in stomach contents by Thin Layer Chromatography and UV-Vis Spectrophotometry

Anusorn Yooyen* Nuttakorn Ratchabut

Abstract

Background: Atrazine (ATZ) and diuron (DIU) are used herbicides globally to control weeds and protect agricultural yields. Their extensive use has raised concerns about adverse impacts on animals and the environment. This study aimed to develop and validate Thin Layer Chromatography (TLC) and UV-Vis Spectrophotometry methods for the identification and quantification of ATZ and DIU in stomach content samples.

Method: Optimal conditions for analysis were determined and subsequently applied to validate the identification and quantification of ATZ and DIU. A modified QuEChERS technique was utilized for sample extraction from stomach contents.

Result: For the TLC method, optimal conditions were achieved using TLC silica gel 60 F₂₅₄, with chloroform : acetone (7:3) as the mobile phase, and o-TKI spray reagent to visualize gray-black or green spots depending on the concentration of the standard compounds. The R_f values for ATZ and DIU were 0.58 and 0.52, respectively. Repeatability showed a coefficient of variation (CV) of 0.0–3.8% and specificity tests showed no interference from matrix components. The limit of detection (LOD) for ATZ and DIU using TLC was 0.02 µg/g and 0.04 µg/g, respectively. For the UV-Vis Spectrophotometry method, ATZ and DIU exhibited linearity over the ranges of 0.10–4.01 µg/ml and 0.50–20.13 µg/ml with correlation coefficients (r) of 0.997 and 0.999, respectively. The LOD and limits of quantification (LOQ) for ATZ were 0.10 µg/ml and 0.50 µg/ml, respectively, while for DIU, they were 0.10 µg/ml and 0.63 µg/ml, respectively. The accuracy of the method, evaluated as percentage recovery, ranged from 71–101% for ATZ and 74–105% for DIU (standard at 70–120%). Precision, as indicated by HORRAT values, ranged from 0.82–1.12 for ATZ and 0.47–1.11 for DIU (standard at < 2).

Conclusion: The developed TLC and UV-Vis Spectrophotometry methods are accurate and precise for the identification and quantification of ATZ and DIU in stomach content samples. These methods are suitable for application in Toxicology laboratories for diagnosing and investigating the causes of animal morbidity and mortality potentially associated with herbicide poisoning.

Keywords: atrazine, diuron, stomach contents, Thin Layer Chromatography, UV-Vis Spectrophotometry

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, 50/2 Phahonyothin Road, Lat Yao, Chatuchak, Bangkok, 10900

*Corresponding Author: Tel. 0 2579 8910 anusornyoyen@yahoo.com

Received:

Revised:

Accepted:

การตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine และ diuron ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี Thin Layer Chromatography และ UV-Vis Spectrophotometry

อนุสรณ์ อยู่เย็น* ณิชกร ราชบุตร

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: atrazine (ATZ) และ diuron (DIU) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพื่อควบคุมวัชพืชและป้องกันความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร การใช้ในปริมาณสูงทำให้เกิดปัญหาส่งผลกระทบต่อสัตว์และสิ่งแวดล้อม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธี Thin Layer Chromatography และ UV-Vis Spectrophotometry สำหรับตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะ

วิธีการ: ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสม แล้วนำไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณ ATZ และ DIU โดยใช้เทคนิค QuEChERS ที่ดัดแปลงมาใช้สำหรับสกัดตัวอย่างอาหารในกระเพาะ

ผลการศึกษา: สำหรับวิธี TLC สถานะที่เหมาะสมคือใช้ TLC silica gel 60 F₂₅₄ เฟสเคลื่อนที่ chloroform : acetone (7:3) และน้ำยาพ่น o-TKI ให้ spot สีเทาดำหรือสีเขียวยื่นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยมีค่า Rf ของ ATZ และ DIU เท่ากับ 0.58 และ 0.52 ตามลำดับ ความสามารถในการทวนซ้ำมีค่า CV อยู่ในช่วง 0.0-3.8% ความจำเพาะเจาะจงพบว่าไม่มี spot จาก matrix ครอบคลุม ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) ของวิธี TLC ของ ATZ และ DIU มีค่าเท่ากับ 0.02 µg/g และ 0.04 µg/g ตามลำดับ สำหรับวิธี UV-Vis Spectrophotometry พบว่า ATZ และ DIU มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10-4.01 µg/ml และ 0.50-20.13 µg/ml โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.997 และ 0.999 ตามลำดับ ค่า LOD และค่า LOQ ของ ATZ และ DIU มีค่าเท่ากับ 0.10 µg/ml และ 0.50 µg/ml กับ 0.10 µg/ml และ 0.63 µg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่ามีค่า %Recovery ของ ATZ และ DIU อยู่ในช่วงร้อยละ 71-101 และ 74-105 เกณฑ์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 ส่วนความเที่ยงพบว่า ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.82-1.12 และ 0.47-1.11 เกณฑ์ที่ยอมรับได้น้อยกว่า 2 ตามลำดับ

สรุป: วิธี TLC และ UV-Vis Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา เพื่อการตรวจชันสูตรโรค หาสาเหตุการป่วยตายของสัตว์ที่อาจได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืชทั้งสองชนิดนี้ได้

คำสำคัญ: atrazine diuron อาหารในกระเพาะ Thin Layer Chromatography UV-Vis Spectrophotometry

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ 50/2 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ: โทร. 0 2579 8910 anusornyooyen@yahoo.com

บทนำ

Atrazine (ATZ) และ diuron (DIU) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (pesticides) ประเภทสารกำจัดวัชพืช (herbicides) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพื่อควบคุมวัชพืชและป้องกันความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรในพื้นที่เพาะปลูก ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าสารทั้งสองชนิดดังกล่าวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561-2565 ในปริมาณสูงและจัดอยู่ใน 10 ลำดับแรกตามข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตรายโดยสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (2566) ATZ หรือ 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-triazine; $C_8H_{14}ClN_5$ เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Triazines โดย ATZ ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย สับปะรด และข้าวโพด ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว หญ้าตีนกา เป็นต้น และวัชพืชใบกว้าง เช่น ผักโขม ผักโขมหิน เป็นต้น สามารถใช้งานได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก (ปัสตรา และคณะ, 2564) การใช้ในปริมาณสูงทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ถูกจัดเป็นสารมลพิษที่สำคัญ เพราะเป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disruptor) และพบว่า ATZ เป็นสาเหตุที่ทำให้ตับโต และหัวใจในสัตว์และมนุษย์เกิดความเสียหาย และในหนูเพศเมียมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการพัฒนาเป็นเนื้องอกในเต้านม (Pathak and Dikshit, 2011) ATZ เป็นพิษต่อคนและสัตว์ โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อกิน ATZ เข้าไปในปริมาณมาก จะเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง กล้ามเนื้อล้า และน้ำลายฟูมปาก โดยอาการเกิดพิษในโคจากการกินจะพบอาการทางคลินิก ได้แก่ อ่อนหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ ซิพจรและอัตราการหายใจสูงขึ้น เดินเซ ปวดบ่ง เบื่ออาหาร ข้อแข็ง กล้ามเนื้อหลังกระตุก น้ำลายไหล และตาย และพบรอยโรค ได้แก่ หลอดเลือดดำของไต ปอด ตับขยายตัว ต่อมหมวกไตขยายใหญ่ มีเลือดออกในกล้ามเนื้อลาย ต่อมไทมัส ต่อมไพรอยด์ และหัวใจ (Props *et al.*, 2021) สัตว์เคี้ยวเอื้องมีความไวต่อการเกิดพิษเฉียบพลันมากกว่าสัตว์ฟันแทะ หากโค กระบือ และแกะ ได้รับ ATZ ขนาด 250 mg/kg จำนวน 2 ครั้ง สามารถทำให้ตายได้ และมีรายงานการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการให้ทางปากในสัตว์ฟันแทะชนิดต่าง ๆ พบว่ามีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 1700-4000 mg/kg (IPCS, 1990)

DIU หรือ 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Phenylurea โดย DIU ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชในไร่อ้อย สับปะรด และมันสำปะหลัง ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา หญ้านกสีชมพู เป็นต้น และวัชพืชใบกว้าง เช่น ผักเบี้ยหิน ผักเสี้ยนผี เป็นต้น สามารถใช้งานได้ทั้งก่อนและหลังวัชพืชงอก (พงศกร และดาวจรัส, 2560) ขนาดของ DIU 50 mg/kg จำนวน 10 ครั้ง ทำให้โค กระบือ แกะ และสัตว์ปีกที่ได้รับแล้วเกิดอาการพิษ โดยสัตว์จะมีอาการเบื่ออาหาร ท้องเดิน ซึมอ่อนเพลีย ไม่มีแรง และพบรอยโรค ได้แก่ เกิดการบวมของปอด ตับ ม้าม และเยื่อหุ้มสมอง (มาลีณี, 2523) ค่า LD_{50} (oral rats) ของ DIU เท่ากับ 1017 mg/kg (NCBI, 2024) การตรวจวิเคราะห์ ATZ และ DIU สามารถตรวจได้ในตัวอย่างทั้งทางสิ่งแวดล้อม (น้ำและดิน) และในตัวอย่างชีววัตถุ (อาหารในกระเพาะ ม้าม ตับ ไต) โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (Pawar *et al.*, 2018) ซึ่งเป็นการตรวจหาเอกลักษณ์หรือเป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ใช้สำหรับการตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening test) ส่วนการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยัน (confirmation test) หรือหาปริมาณ ATZ และ DIU นั้นสามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shah *et al.*, 2011) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Props *et al.*, 2021) Liquid Chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Blanchoud *et al.*, 2020) เป็นต้น แต่วิธีหาปริมาณดังกล่าวมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ต้องอาศัยอุปกรณ์ที่มีราคาแพง การบำรุงรักษาเครื่องมือมีค่าใช้จ่ายสูง ตลอดจนผู้ตรวจวิเคราะห์ต้องมีความรู้ความชำนาญในการใช้เครื่องมือ UV-Vis Spectrophotometry เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการตรวจหาปริมาณ ATZ และ DIU ด้วยวิธีอื่น ๆ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่ตรวจพบ ATZ ในตัวอย่างที่ได้จากสัตว์ป่วยตายจากการกินสารกำจัดวัชพืชนี้เข้าไป เช่น Jowett *et al.* (1986) ตรวจพบ ATZ ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค 12300 mg/kg ตับ 75-79 mg/kg และไต 53-67 mg/kg ซึ่งจะพบว่า ATZ ตกค้างในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโคมากที่สุด นอกจากนี้ Props

et al. (2021) ตรวจพบ ATZ ในตัวอย่างอาหารใน กระเพาะโคและตับ ด้วยวิธี GC-MS แต่ไม่ได้ตรวจหา ปริมาณ เป็นต้น จะเห็นว่าเมื่อสัตว์เสียชีวิตจากการได้รับ สารพิษ มักพบสารพิษตกค้างในกระเพาะอาหาร เนื่องจาก กระเพาะอาหารเป็นที่แรกที่สารพิษเข้าสู่ร่างกายผ่าน การกินอาหารหรือดื่มน้ำ สารพิษที่ยังไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่ กระแสเลือดจะคงอยู่ในกระเพาะอาหาร ทำให้สามารถ ตรวจพบได้หลังการเสียชีวิต ดังนั้นเพื่อเป็นการเตรียมความพร้อม และเพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ในการ รองรับความต้องการการตรวจชันสูตรโรคหาสาเหตุ การป่วยตายของสัตว์ที่อาจได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืช ดังกล่าวที่มีการใช้ในปริมาณสูงแล้วตกค้างในสิ่งแวดล้อม และพืชอาหารสัตว์ หรืออาจได้รับการวางยา การศึกษา ครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้อง ของวิธี (method validation) TLC และ UV-Vis Spectrophotometry ตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณ สารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารใน กระเพาะ เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ รายงานผลวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และห้องปฏิบัติการ นำไปใช้ปฏิบัติได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยมสองตำแหน่ง (Sartorius BP 3100S, Germany) และทศนิยมสี่ตำแหน่ง (Sartorius BP 221S, Germany), Vortex mixer Genie 2 G560E (Scientific Industries, USA.), High speed refrigerated centrifuge 6500 (Kubota, Japan), Water bath W-350 (Mettler, Germany), Nitrogen evaporator XcelVap (Horizon Technology, USA.), Fume hood WZ-1500GP (WiZard, Thailand), UV cabinet MinUVIS (Desaga, Germany), TLC silica gel 60 F₂₅₄ glass plates 10x20 cm and 20x20 cm (Sigma-Aldrich, Germany), Disposable micropipettes intraMARK ขนาด 5 µL (BLAUBRAND®, Germany), TLC developing tank (Sigma-Aldrich, Germany), Supelclean™ ENVI-Carb SPE Tube (Supelco, USA.),

UV-Vis Spectrophotometer Specord 210 PLUS (Analytik Jena, Germany)

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: chloroform (ACS grade, Merck, Germany), acetone (Pesticide grade, RCI Labscan, Thailand), acetonitrile (Pesticide grade, RCI Labscan, Thailand), methanol (AR grade, RCI Labscan, Thailand), s (Ultra RESI-ANALYZED™ reagent grade, J.T. Baker, USA.), o-tolidine (Sigma-Aldrich, Germany), benzidine (Fluka AG, Switzerland), potassium iodide (Merck, Germany), primary secondary amine; PSA (Supelco, USA.), p-aminoacetophenone (TCI, Japan), และ DI water (Type II มีค่า resistivity > 18 mΩ.cm) ส่วนสารเคมี อื่น ๆ เป็นชนิด AR grade ของ Merck, Germany และ J.T. Baker, USA.

สารมาตรฐาน: Certified reference standard ATZ และ DIU เป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.37 และ 98.70, Lot number G1084826 และ G1078248 ตามลำดับ

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ เพื่อเป็น stock solution โดยชั่ง ATZ 0.0100 g ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 ml ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐาน ATZ ความเข้มข้น 993.70 µg/ml

เตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU เพื่อเป็น stock solution โดยชั่ง DIU 0.0102 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรจนครบ ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐาน DIU ความเข้มข้น 1006.74 µg/ml

วิธีเตรียมน้ำยาเคมี

1) น้ำยาพ่น (spray reagent) ชนิด o-tolidine + potassium iodide [o-TKI] เตรียมปริมาตร 500 ml

เตรียมจาก o-tolidine 0.5 g ละลายด้วย acetic acid 10 ml และ potassium iodide (KI) 2 g ละลายด้วย DI water 10 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย DI water

2) spray reagent ชนิด Vidict's reagent โดยเตรียมสารละลาย (ก) benzidine อิมิตัวใน 2% acetic acid ด้วยการปิเปต glacial acetic acid 10 ml ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml ปรับด้วย DI water จนครบปริมาตร จากนั้นตวงมา 350 ml ลงใน beaker แล้วค่อย ๆ เติม benzidine ลงไป ผสมให้เข้ากัน จนกว่า benzidine ไม่สามารถละลายต่อไปได้อีก นำไปเก็บไว้ในที่มีดค้างคืน จากนั้นเตรียมสารละลาย (ข) 1% potassium iodide โดยชั่ง KI 2 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 ml ละลายและปรับด้วย DI water จนครบปริมาตร แล้วนำ (ก) 350 ml และ (ข) 150 ml ผสมกันใน beaker ใส่ในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น (4-8 °C)

3) ก๊าซคลอรีน [$Cl_2(g)$] ชั่ง potassium permanganate ($KMnO_4$) 1 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติมกรด concentrated hydrochloric (conc. HCl) 10 ml นำไปวางใน TLC developing tank ปิดฝา tank ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ Cl_2 ที่เกิดขึ้นอิมิตัวทั่ว tank ก่อนอบ TLC plate

4) สารละลาย 1% p-aminoacetophenone (PAAP) ใน 20% HCl ชั่ง PAAP 1 g ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ละลายและปรับด้วย 20% HCl จนครบปริมาตร

5) pyridine reagent โดยปิเปต pyridine 18 ml และ DI water 12 ml ลงใน beaker ผสมให้เข้ากัน ปิเปต conc. HCl ลงไป 3 ml ผสมให้เข้ากัน การศึกษานี้ใช้อาหารในกระเพาะโคที่ตรวจด้วยวิธี TLC แล้วไม่พบ ATZ และ DIU เป็นตัวแทนอาหารในกระเพาะสัตว์ สำหรับใช้เป็น sample blank เพื่อนำมาเตรียม spiked sample โดยการ เติมสารมาตรฐาน ATZ และ DIU จาก stock standard solution ลงไปใน sample blank ให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วนำไปใช้ในขั้นตอนของการทดสอบความถูกต้องของวิธี

วิธีสกัดตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Anastassiades and Lehotay (2003) โดยชั่งตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค 5 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile 10 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที แล้วเติม Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 4 g และ Sodium chloride (NaCl) 1 g ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 15 °C นาน 5 นาที ปิเปตส่วนสีทั้งหมดลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 15 ml สกัดตัวอย่างซ้ำโดยเติม acetonitrile 5 ml ผสมด้วยเครื่อง vortex 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 15 °C นาน 5 นาที pool ส่วนสีที่ได้กับการสกัดครั้งแรก นำไประเหยด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C ให้เหลือ 1 ml แล้วปิเปตใส่ microcentrifuge tube ที่บรรจุ PSA 25 mg กับ $MgSO_4$ 150 mg ผสมด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 10 °C นาน 3 นาที ปิเปตส่วนสีทั้งหมดใส่ในหลอดแก้วกันแหลมระเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 1 ml เก็บใส่ vial นำไปตรวจหาเอกลักษณ์ของ ATZ และ DIU ด้วยวิธี TLC และหาปริมาณด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

การตรวจเอกลักษณ์ ATZ และ DIU ด้วยวิธี TLC
ดัดแปลงจากวิธีของ IAEA (2005) และ Afful *et al.* (2009)

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ทดสอบหาเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการตรวจเอกลักษณ์ ATZ และ DIU โดยใช้หลอด capillary หรือ disposable micropipette แบบมีสเกล ขนาด 5 μ L ปิเปต stock standard solution ATZ และ DIU ชนิดละ 1, 5 และ 10 μ L ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1, 5 และ 10 μ g หยดลงบน TLC plate ขนาด 10x20 cm จำนวน 2 แผ่น โดยนำแผ่นที่ 1 ไปจุ่มแช่ใน TLC developing tank ที่มี mobile phase system 1 เป็น Hexane : acetone (4:1) และนำแผ่นที่ 2 ไปจุ่มแช่ใน mobile phase system 2 เป็น chloroform : acetone

(7:3) บันทึกร่องหมึกห้องและระยะเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนบน TLC plate จากจุดที่ spot สารหรือจุดตั้งต้น (origin) ไปจนถึงจุดสิ้นสุด (solvent front) เมื่อถึง front นำแผ่น TLC ออกจาก tank วางทิ้งไว้ใน fume hood ให้ organic solvents ระเหย จากนั้นนำ TLC plates ไปวางในตู้ UV cabinet เพื่อส่องดู spot ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm สังเกตการดูดกลืนแสงและการแยกของสารมาตรฐาน แล้วทดสอบการติดสีของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU บน TLC plates ทั้ง 2 แผ่นข้างต้น โดยนำ TLC plates ไปอบก๊าซ Cl₂ นาน 1 นาที แล้วไล่ก๊าซ Cl₂ ที่เกินออก โดยใช้ blower เป่าลมร้อนสลบลมเย็น ไล่ให้ทั่วทั้งแผ่น ประมาณ 5 นาที จากนั้น 1 แผ่น พ่นทับด้วย spray reagent o-TKI และอีก 1 แผ่น พ่นทับด้วย Vidict's reagents สังเกตการติดสีของ spot ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU (Visualization of spots) จากการทำปฏิกิริยากับน้ำยาเคมีทั้งสองชนิด และหาค่า Retention Factor (Rf) จากสูตรดังนี้

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้นไปถึงจุดสิ้นสุด}}$$

ทดสอบความถูกต้องของวิธี TLC โดยทำตาม EURACHEM (2014) ดังนี้

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection: LOD) ของสารละลายมาตรฐาน โดย หยอด stock standard solution ATZ และ DIU ชนิดละ 0.5, 1, 2, 3, 4, และ 5 µL ลงบนแผ่น TLC ขนาด 20x20 cm จำนวน 2 แผ่น นำไปทดสอบตามสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้ ถ้าผลการทดสอบพบว่า spot ของสารมาตรฐานที่ระดับต่ำสุด (0.5 µL) ยังคงติดสี ให้เจือจาง stock standard solution ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU ด้วย acetone ให้มีความเข้มข้นต่ำลง นำมาทดสอบอีกครั้งตามขั้นตอน แล้วตัดสินจุดสุดท้ายที่ spot ของสารมาตรฐานติดสีด้วยสายตา กำหนดเป็นค่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ด้วยการหยดสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่ทราบค่า LOD แล้ว ลงบนแผ่น TLC ชนิดละ 3 ซ้ำ จำนวน 12 plates แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 จำนวน 6 plates ใช้ Hexane :

acetone (4:1) โดย plate 1-3 spray ด้วย Vidict's reagent และ plate 4-6 spray ด้วย o-TKI reagent ชุดที่ 2 จำนวน 6 plates ใช้ chloroform : acetone (7:3) โดย plate 7-9 spray ด้วย Vidict's reagent และ plate 10-12 spray ด้วย o-TKI จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย (\bar{x}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (Coefficient of Variation, CV) ของค่า Rf ของทั้งสองสารมาตรฐาน

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีโดยวิเคราะห์ blank (DI water), matrix blank (อาหารในกระเพาะโค 3 ตัวอย่าง), spiked matrix blank (อาหารในกระเพาะโคที่ตรวจด้วยวิธี TLC แล้วไม่พบ ATZ และ DIU นำมา spiked สารมาตรฐาน ATZ และ DIU ให้ได้ความเข้มข้น 39.75 และ 40.25 µg/g ซึ่งค่าที่เตรียมนี้มีค่าต่ำกว่า LD₅₀ และเตรียมตาม Afful *et al.*, 2007) นำไปสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อความบริสุทธิ์ปนเปื้อน (impurities) สารที่เกิดจากการสลายตัว (degradants) และ matrix ของตัวอย่างรบกวนสารที่สนใจศึกษาหรือไม่

วิเคราะห์หาค่า LOD ของวิธี โดยการเติม (spiked) 2 ml ของสารละลายมาตรฐาน ATZ 99.37 µg/ml และ DIU 100.67 µg/ml ลงใน sample blank (อาหารในกระเพาะโคที่ไม่มี ATZ และ DIU) 5 g จำนวน 10 หลอด (n=10) นำไปสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS ปริมาตรสุดท้าย จะได้ความเข้มข้นของ ATZ และ DIU ใน spiked sample แต่ละหลอดเท่ากับ 198.74 และ 201.34 µg/ml ตามลำดับ (39.75 และ 40.25 µg/g ตามลำดับ) แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ในทำนองเดียวกับการหาค่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณหาค่า LOD ของวิธี

วิธี UV-Vis Spectrophotometry

1) การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ ในอาหารในกระเพาะ ตัดแปลงจากวิธีของ Kesari and Gupta (1998)

การ Clean up สารละลายตัวอย่าง ด้วยวิธี Solid phase extraction (SPE) column ชนิด Graphitized Non-Porous Carbon ปริมาณ 500 mg ขนาด 6 ml

(Supelclean™ENVI-Carb™SPE Tube) ดังนี้ ต่อ SPE column เข้ากับชุด vacuum manifold ปรับสภาพ SPE ด้วย methanol 3 ml ตามด้วย acetone 3 ml นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากเทคนิค QuEChERS 100 µL ผสมกับ acetone 900 µL ปิเปตลงใน SPE column ปล่อยให้สารละลายหยดลงด้วยอัตราการใช้ 1 หยดต่อวินาที แล้ว elute ด้วย acetone 4 ml ลงใน centrifuge tube แก้วขนาด 15 ml ระบายแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetone 200 µL นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ATZ

วิธีวิเคราะห์ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 µL ลงใน graduated tube ขนาด 10 ml เติม pyridine reagent 0.2 ml ลงในแต่ละหลอด ปิดฝา ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 100 °C 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 2 M NaOH 1 ml และ PAAP 2 ml ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ แล้วปรับด้วย DI water จนครบปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากัน ทั้งนี้ทำ blank (DI water) ควบคู่กันไปด้วย นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) รุ่น SPECORD® 210 PLUS ที่ความยาวคลื่น 470 nm

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ทดสอบการทำปฏิกิริยาการเกิดสีของสารมาตรฐาน ATZ กับน้ำยาเคมีต่าง ๆ ในวิธีวิเคราะห์ (pyridine reagent, NaOH และ PAAP) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ ให้มีเนื้อสารอยู่ที่ 40.14 µg แล้วทำตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น ดูสีและลักษณะ spectrum ที่เกิดขึ้น และหาค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ spectrum (λ_{max})

ทดสอบความถูกต้องของวิธี UV-Vis Spectrophotometry สำหรับหาปริมาณ ATZ โดยทำตาม ดติย (2547) และทิพวรรณ (2549) ดังนี้

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range)

หาช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ATZ จาก working std. ATZ 10.04 และ 100.36 µg/ml ใน DI water ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ โดยเติมสารละลาย ATZ ลงใน graduated tube

ขนาด 10 ml จำนวน 8 หลอด ให้มีเนื้อสารอยู่ในช่วง 1-60 µg (1.00, 3.01, 5.02, 10.04, 20.07, 30.11, 40.14, และ 60.22 µg) ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น ระดับละ 1 ซ้ำ ซึ่ง final volume จะได้สารละลายมาตรฐาน ATZ ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.10-6.02 µg/ml นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน (แกน x) กับค่า absorbance (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

หาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยดูจากกราฟของ range เลือกช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงมาอย่างน้อย 6 ระดับ วิเคราะห์ตามวิธีความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานที่ตรวจพบกับค่า absorbance คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r) เกณฑ์การยอมรับ r มากกว่าหรือเท่ากับ 0.995 โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2024)

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) สกัด spiked sample (ตัวอย่างอาหารในกระเพาะที่เติมสารมาตรฐาน ATZ) ความเข้มข้น 10 mg/kg นำไปสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS จำนวน 10 ซ้ำ ผ่านการ clean up แล้วทำตามวิธีวิเคราะห์ คำนวณความเข้มข้นเฉลี่ย (\bar{x}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ spiked sample แล้วคำนวณหาค่า LOD จากสูตร $LOD = 3SD$ และหาขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (Limit of quantitation, LOQ) จากสูตร $LOQ = 10SD$ ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision) วิเคราะห์ spiked sample 3 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า % Recovery, % RSD และหาค่า HORRAT (Horwitz's ratio) จากสมการ

$$HORRAT \text{ (Horwitz's Ratio)} = \frac{\text{Experimental \%RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

ประเมินความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) โดยพิจารณาจากค่า % Recovery ให้อยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 (SANCO/12571/2013, 2014) ส่วนความเที่ยง (precision) นั้นประเมินจากค่า HORRAT โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 (Horwitz and Albert, 2006)

2) การตรวจหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด DIU ในอาหารในกระเพาะ ดัดแปลงจากวิธีของ Galera *et al.* (1995)

การ Clean up สารละลายตัวอย่าง ด้วยวิธี TLC ดังนี้ Streak สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากเทคนิค QuEChERS 100 μ L ลงบน TLC plate โดยหยดสารละลายมาตรฐาน DIU เทียบด้วย นำไปจุ่มแช่ใน TLC developing tank ที่มี mobile phase เป็น chloroform : acetone (7:3) เมื่อถึง front นำแผ่น TLC ออกจาก tank วางทิ้งไว้ใน fume hood ให้ organic solvents ระเหย จากนั้น นำ TLC plates ไปส่องภายใต้แสง UV ในที่มืด ที่ความยาวคลื่น 254 nm การดูกลิ่นแสงของแถบตัวอย่าง (band) ที่ขึ้นตรงกับ spot ของสารมาตรฐาน DIU ใช้ดินสอวงรอบแถบตัวอย่าง แล้วชุบ silica gel บริเวณที่วงไว้ให้หลุดทดสอบ เติม acetone 2 ml ผสมด้วย vortex mixer 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm ปิดเปิดส่วนใส่ไประเหยแห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วละลาย residue ด้วย acetonitrile : methanol (1:1) 1 ml

วิธีวิเคราะห์ นำสารละลายตัวอย่างจากการ clean up หรือสารละลายมาตรฐาน DIU ที่เตรียมได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) รุ่น SPECORD® 210 PLUS ที่ความยาวคลื่น 250 nm

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU ที่ความเข้มข้น 10.07 μ g/ml ใน DI water และ acetonitrile : methanol (1:1) นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-350 nm บันทึกค่า λ_{max} ของ spectrum และค่า absorbance ที่ได้จากแต่ละตัวทำละลาย

ทดสอบความถูกต้องของวิธี UV-Vis Spectrophotometry สำหรับหาปริมาณ DIU โดยทำตาม ตติย (2547) และทิพวรรณ (2549) ดังนี้

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range)

หาช่วงการวิเคราะห์ (range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน DIU จาก working std. DIU 50.34

μ g/ml ใน acetonitrile : methanol (1:1) ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0.50, 1.01, 2.01, 3.02, 4.03, 5.03, 10.07 และ 20.13 μ g/ml นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer แล้วดำเนินการทดสอบส่วนที่เหลือในทำนองเดียวกันกับการทดสอบความถูกต้องของวิธี UV-Vis Spectrophotometry สำหรับหาปริมาณ ATZ ข้างต้น โดยหาความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ LOD, LOQ, ความแม่นยำ และความเที่ยง

การนำไปประยุกต์ใช้

นำวิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้ว มาใช้ในการตรวจหาเอกลักษณ์และหาปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะโค จากตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี ในปี 2567 ที่เก็บไว้ในตู้เย็น -20°C จำนวน 10 ตัวอย่าง

ผลและวิจารณ์

วิธี TLC

ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า TLC silica gel 60 F₂₅₄ plate ที่ทดสอบกับ mobile phase system ทั้ง 2 ระบบ system 1 [Hexane : acetone (4:1)] และ system 2 [chloroform : acetone (7:3)] สามารถแยกสารมาตรฐาน ATZ และ DIU จากกันได้ โดยสังเกตจาก TLC plate ทั้ง 2 แผ่น ที่นำไปส่องดูใน UV cabinet พบว่า spot ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่ 1, 5 และ 10 μ g ดูดกลืนแสง UV 254 nm มีลักษณะเป็น spot กลมสีม่วง และอยู่ห่างกัน ซึ่งเมื่อนำไปพ่นด้วย Vidict's และ o-TKI reagent พบว่า spot ที่ 1 μ g ติดสีเขียว ที่ 5 กับ 10 μ g ติดสีเทาดำ โดยมีค่าเฉลี่ยของค่า Rf อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทดสอบของสารทั้งสองระบบตามตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาข้อมูลพบว่า chloroform : acetone (7:3) จะมีความมีขั้ว (polarity) สูงกว่า Hexane : acetone (4:1) เพราะให้ค่า Rf ของ ATZ และ DIU สูงกว่า (0.58 และ 0.52) โดยทั่วไป mobile phase ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารควรให้ค่า Rf อยู่ในช่วง 0.3-0.7 (Tommasone, 2021) ซึ่ง Hexane : acetone (4:1) จะให้ค่า Rf ของ ATZ และ DIU ต่ำกว่า

ช่วงดังกล่าว (0.27 และ 0.13) การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ IAEA (2005) ที่ใช้ TLC silica gel 60 F₂₅₄ -Ethyl acetate system และตรวจวัดด้วย o-TKI reagent มีค่า Rf ของ ATZ และ DIU เท่ากับ 0.64 และ 0.41 อยู่ในช่วง 0.3-0.7 เช่นกัน ซึ่งการที่ได้ค่า Rf ต่างกันไปขึ้นอยู่กับ ชนิดตัวทำละลายที่เลือกใช้เป็น mobile phase ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้เป็น stationary phase เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกำจัดวัชพืชชนิด atrazine (ATZ) และ diuron (DIU) ด้วยวิธี TLC

Herbicide	TLC plate 1			TLC plate 2			
	mobile phase system 1			mobile phase system 2			
	Hexane : acetone (4:1)			chloroform : acetone (7:3)			
of Rf	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ (นาที)	of Rf	อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ใช้ (นาที)	o-TKI reagent	
ATZ (1, 5, 10 µg)	0.27	25	20	0.58	25	26	spot สีเทาดำ หรือ สีเขียว
DIU (1, 5, 10 µg)	0.13			0.52			spot สีเทาดำ หรือ สีเขียว

ข of Rf มาจากผลรวมของค่า Rf ของ ATZ หรือ DIU ที่ 1, 5 และ 10 µg ทาร 3

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี TLC

เมื่อพ่น plate ด้วย Vidict's reagent พบว่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU มีค่าเท่ากับ 0.75 และ 1 µg ตามลำดับ และเมื่อพ่น plate ด้วย o-TKI reagent มีค่า LOD ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU เท่ากับ 0.25 และ 0.5 µg ตามลำดับ และทั้ง 2 spray reagents ให้ spot สีเทาอ่อนหรือสีเขียว เพราะความเข้มข้นเจือจางลง แสดงให้เห็นว่า o-TKI reagent มีความไวมากกว่า Vidict's reagent เพราะสามารถตรวจพบ ATZ และ DIU ได้ในระดับที่ต่ำกว่า

ตารางที่ 2 Rf values ของสารกำจัดวัชพืช ATZ และ DIU ด้วย TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄

Mobile phase system	Spray reagent	Herbicide ที่ระดับ LOD	Plate 1		Plate 2		Plate 3	
			Rf ^a	CV (%)	Rf ^a	CV (%)	Rf ^a	CV (%)
Hexane : acetone (4:1)	Vidict's	ATZ 0.75 µg	0.29	1.7	0.27	1.8	0.30	0.0
		DIU 1 µg	0.13	3.8	0.13	3.8	0.14	3.6
	o-TKI	Plate 4		Plate 5		Plate 6		
		ATZ 0.25 µg	0.29	1.7	0.28	3.4	0.29	0.0
		DIU 0.5 µg	0.13	0.0	0.13	0.0	0.13	0.0
		Plate 7		Plate 8		Plate 9		
chloroform : acetone (7:3)	Vidict's	ATZ 0.25 µg	0.58	0.8	0.54	0.9	0.57	0.0
		DIU 0.5 µg	0.52	0.9	0.48	0.0	0.50	0.0
	o-TKI	Plate 10		Plate 11		Plate 12		
		ATZ 0.25 µg	0.58	0.0	0.57	0.8	0.57	0.8
		DIU 0.5 µg	0.51	0.9	0.50	1.0	0.49	0.0
		Plate 13		Plate 14		Plate 15		

a) ค่าเฉลี่ยของ Rf values ที่เกิดจากการทำ 3 ซ้ำ ใน 1 plate

ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่ LOD พบว่าทุก spot ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ติดสี spray reagent ทั้งสองชนิด โดยมีค่าเฉลี่ยของค่า Rf และค่า CV ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ตามตารางที่ 2 โดยค่า CV ที่ได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.0-3.8% ซึ่งไม่เกิน 10% แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด นั่นคือวิธีที่ศึกษานี้มีความเที่ยง สอดคล้องกับ IAEA (2005) ที่ได้ค่า CV ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU ไม่เกิน 10% เช่นกัน

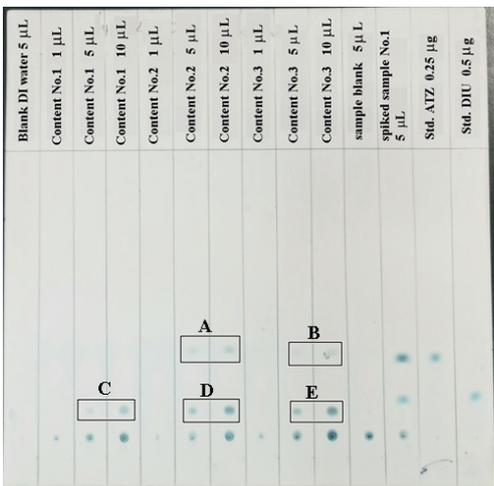
ความจำเพาะเจาะจง (specificity) เมื่อทดสอบสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด blank (DI water), matrix blank (sample blank), spiked matrix blank (spiked sample) ด้วยวิธี TLC เทียบกับสารมาตรฐาน ATZ และ DIU โดยใช้ system chloroform : acetone (7:3) และ o-TKI reagent พบว่าไม่มี spot จากสารปนเปื้อน สารที่เกิดจากการสลายตัว หรือ matrix ของตัวอย่างขึ้นบริเวณที่บริเวณ Rf เดียวกันกับ spot ของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU รวมถึงสารมาตรฐาน ATZ และ DIU ที่เติมลงไป ใน spiked matrix blank สามารถแยกออกจากกันได้ดี แสดงว่าวิธี TLC ในสภาวะดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงหรือมีความสามารถในการจำแนก ATZ และ DIU ที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่น ๆ ได้ (รูปที่ 1) ซึ่งต่างจากที่ทดสอบด้วย system Hexane : acetone (4:1) จะพบว่ามี spot จาก matrix ของตัวอย่างขึ้นใกล้เคียงหรือ overlap กับ spot ของสารมาตรฐาน ซึ่งอาจรบกวนการวิเคราะห์ (รูปที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกใช้ chloroform : acetone (7:3) ในการหาค่า LOD ของวิธี



รูปที่ 1 TLC Chromatogram แสดงความจำเพาะเจาะจงของ ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค (content No.1-3 ที่ 1, 5 และ 10 µL) ด้วย system chloroform : acetone (7:3)- o-TKI reagent โดย A และ B เป็นบริเวณที่เกิด spot ของ matrix ในตัวอย่าง



รูปที่ 3 TLC Chromatogram ของการหาค่า LOD ของวิธี ด้วยการทำ spiked sample (n=10) โดยหยดสารละลาย spiked sample No.1-10 ปริมาตร 1 µL/lane บน TLC plate เรียงตามลำดับ โดยใช้ system chloroform : acetone (7:3) และพ่นด้วย o-TKI reagent



รูปที่ 2 TLC Chromatogram จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในตัวอย่างอาหารในกระเพาะโคจำนวน 3 ตัวอย่าง (content No.1-3 ที่ 1, 5 และ 10 µL) ด้วย system Hexane : acetone (4:1) และ o-TKI reagent โดย A-E เป็นบริเวณที่เกิด spot ของ matrix ในตัวอย่าง

จากการหาค่า LOD ของวิธี หรือขีดจำกัดของการตรวจพบของ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี TLC เมื่อหยดสารละลาย spiked sample No.1-10 (n=10) ปริมาตร 1 µL/lane บน TLC plate แล้ววิเคราะห์ด้วย chloroform : acetone (7:3) – o-TKI reagent พบว่ามีค่าเฉลี่ย ATZ และ DIU เท่ากับ 0.04 µg/g ทั้งสองสารแต่ spot ของ ATZ ยังติดสีเข้มอยู่ (รูปที่ 3) จึงเจือจางสารละลาย spiked sample No.1-10 ลงอีก 5 เท่า แล้ววิเคราะห์ด้วย TLC อีกครั้ง พบ spot ของสารมาตรฐาน ATZ ติดสีเข้วยาง ๆ และมองเห็นด้วยสายตาทั้ง 10

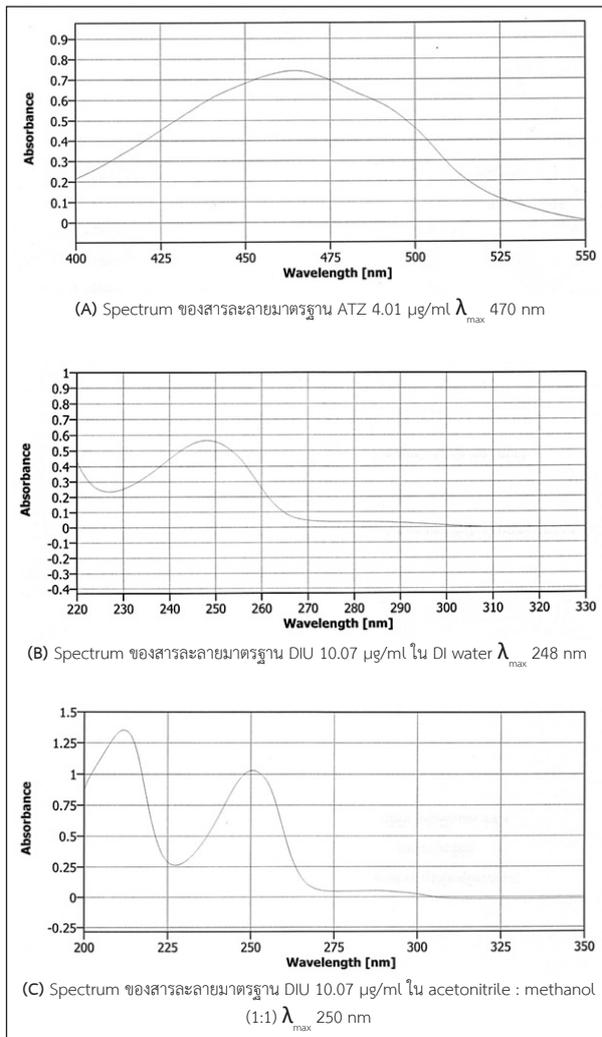
ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.02 µg/g และไม่พบ spot DIU เกิดขึ้น ดังนั้น LOD ของวิธีของการตรวจพบ ATZ และ DIU ในอาหารในกระเพาะ มีค่าเท่ากับ 0.02 µg/g และ 0.04 µg/g ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับที่พบในรายงานการศึกษาก่อนหน้าในเรื่องของค่า LOD ของ ATZ ที่สามารถตรวจพบได้ในระดับที่ต่ำกว่าหรือมีความไวมากกว่า DIU ถึงแม้จะมี matrix ของตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาของ Tiryaki and Aysal (2005) ที่พบ LOD ของ ATZ และ DIU ในตัวอย่างสารสกัดจากข้าวสาลี มีค่าเท่ากับ 1.25 µg/g และ 1.5 µg/g ตามลำดับ และการศึกษาของ Afful *et al.* (2009) ที่พบค่า LOD ของ ATZ และ DIU ในตัวอย่างดิน เท่ากับ 0.008 µg/g และ 0.159 µg/g ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองรายงานดังกล่าวศึกษาด้วยวิธี TLC และตรวจวัดด้วย o-TKI reagent ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษานี้

วิธี UV-Vis Spectrophotometry

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารมาตรฐาน ATZ และ DIU

สภาวะที่เหมาะสมของสารมาตรฐาน ATZ ที่ความเข้มข้น 4.01 µg/ml พบว่าสามารถเกิดสารละลายใสสีส้ม โดยมี spectrum, $\lambda_{max} = 470 \text{ nm}$ และ absorbance = 0.73 ตามรูปที่ 4 (A) แสดงว่า ATZ สามารถทำปฏิกิริยา

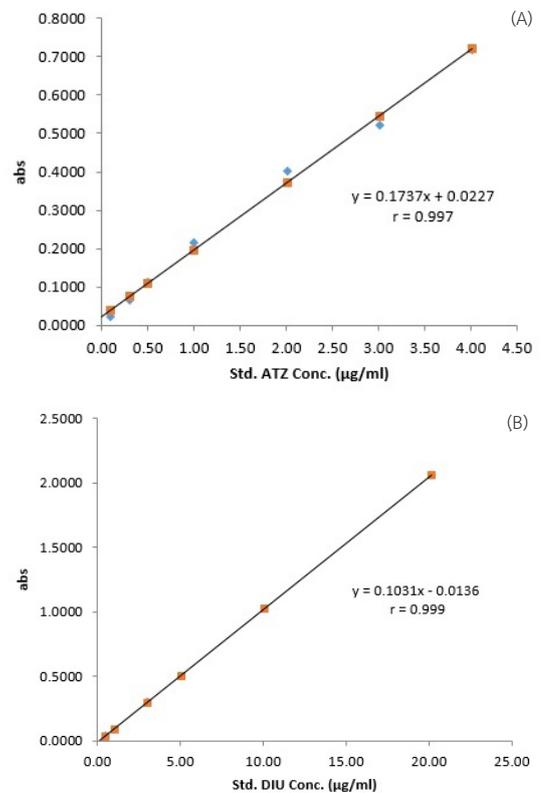
กับ PAAP ในสภาวะที่ทำการทดสอบเกิดเป็นสารประกอบ
 ที่ให้สารละลายมีสีส้ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kesari
 and Gupta (1998) แต่แตกต่างจากการศึกษาของ (Zhang
 and Pan (2011) ที่มี spectrum, $\lambda_{max} = 466 \text{ nm}$ ซึ่งมี
 ค่าต่างกันถึง 4 nm อาจเป็นเพราะในขั้นตอนของวิธี
 วิเคราะห์ของ Shang and Pan (2011) มีการเติม
 สารละลายเคมีที่แตกต่างกันอยู่หนึ่งชนิด คือ
 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTMAB) จึง
 ทำให้ค่า λ_{max} ที่ได้ shift ไปตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับ
 เตรียมสารมาตรฐานและการตรวจหาปริมาณ DIU คือ
 acetonitrile : methanol (1:1) เพราะให้ค่า absorbance
 จาก spectrum ของ DIU ที่ความเข้มข้น 10.07 $\mu\text{g/ml}$
 เท่ากับ 1.03 ซึ่งเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัว เมื่อเทียบกับค่า
 absorbance จาก spectrum ของ DIU ใน DI water ที่
 ความเข้มข้นเดียวกัน (0.57) ตามรูปที่ 4 (B-C)



รูปที่ 4 ลักษณะ Spectrum ของสารละลายมาตรฐาน ATZ และ DIU

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการ
 วิเคราะห์ (linearity and working range) พบว่า ATZ
 และ DIU มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น
 0.10–4.01 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.50–20.13 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ
 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) เท่ากับ
 0.997 และ 0.999 ตามลำดับ (รูปที่ 5) และผลการทดสอบ
 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และ
 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้
 อย่างแม่นยำ (LOQ) ช่วง %Recovery และค่าเฉลี่ย %RSD
 ของ ATZ และ DIU มีค่าดังตารางที่ 3



รูปที่ 5 แสดงกราฟของผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์
 ของสารละลายมาตรฐาน ATZ (A) และสารละลายมาตรฐาน DIU (B)

ตารางที่ 3 ค่า LOD LOQ ช่วง %Recovery และค่าเฉลี่ย %RSD ของ
 ATZ และ DIU โดยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

Herbicide	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Range of %Recovery	Mean of %RSD
ATZ	0.10	0.50	80-101	0.78
DIU	0.10	0.63	99-118	4.74

ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีการวิเคราะห์ ATZ จากตัวอย่าง spiked sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10.04, 20.07 และ 40.15 mg/kg วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำมีค่าเฉลี่ย %Recovery เท่ากับ 87.85, 88.47 และ 78.17 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 70-120 ส่วนการประเมินความเที่ยง พบว่าค่า %RSD อยู่ในช่วง 5.53-7.93 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และค่า HORRAT พบอยู่ในช่วง 0.82-1.12 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2 ดังนั้นการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีตรวจหาปริมาณ ATZ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ DIU จากตัวอย่าง spiked sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10.07, 20.13 และ 30.20 mg/kg วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำมีค่าเฉลี่ย %Recovery เท่ากับ 92.29, 77.56 และ 81.89 ตามลำดับ โดย %Recovery ของทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ช่วงร้อยละ 70-120 ส่วนการประเมินความเที่ยง พบว่าค่า %RSD อยู่ในช่วง 3.18-8.30 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และค่า HORRAT พบอยู่ในช่วง 0.47-1.11 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า 2 ดังนั้นการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีจึงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่า accuracy และ precision ของ ATZ และ DIU ใน spiked sample (n=10) 3 ระดับ ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

ครั้งที่	ระดับความเข้มข้นของ spiked sample (mg/kg)					
	ATZ			DIU		
	10.04	20.07	40.15	10.07	20.13	30.20
1	9.61	17.10	30.85	8.40	15.94	22.79
2	8.12	16.83	34.60	9.44	14.93	23.80
3	9.51	17.47	30.41	8.63	16.15	24.18
4	10.16	17.64	34.96	8.55	15.44	26.18
5	8.59	17.28	31.70	10.53	15.12	23.34
6	8.54	19.19	31.18	9.52	15.23	26.23
7	8.76	17.34	29.30	9.52	15.48	24.29
8	8.43	17.32	28.96	10.41	16.24	23.93
9	8.29	19.90	28.51	8.49	16.28	26.29
10	8.15	17.50	33.37	9.41	15.36	26.30
ช่วง %Recovery	81-101	84-99	71-87	83-105	74-81	75-87
%Recovery เฉลี่ย	87.85	88.47	78.17	92.29	77.56	81.89
SD	0.70	0.98	2.28	0.77	0.50	1.37
%RSD	7.93	5.53	7.27	8.30	3.18	5.55
HORRAT	1.06	0.82	1.12	1.11	0.47	0.88

จากการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างอาหารในกระเพาะโดยใช้เทคนิค QuEChERS ที่ดัดแปลงมาจาก Anastassiades and Lehotay (2003) ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ ATZ และ DIU ในตัวอย่างผักและผลไม้ พบว่าสามารถสกัดเอา ATZ และ DIU ออกจากอาหารในกระเพาะได้ ด้วยการนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีทั้ง TLC และ UV-Vis Spectrophotometry โดยข้อดีการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS คือ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย และใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย ต่างจากการศึกษาของ IAEA (2005), Afful *et al.* (2009), Kesari and Gupta (1998) และ Galera *et al.* (1995) ที่ใช้วิธีสกัดเป็นแบบ solid liquid extraction ซึ่งใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก และใช้เวลานาน เพื่อสกัดเอา ATZ และ DIU ออกจากตัวอย่างพืชผัก และตัวอย่างดิน อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้จากทั้งเทคนิค QuEChERS และ solid liquid extraction ก็ยังคงมี impurity อยู่ ดังนั้นจึงมีการ clean up สารสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณ ATZ หรือ DIU ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry, HPLC, GC-MS หรือวิธีอื่นๆต่อไป สำหรับการตรวจหาปริมาณ ATZ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Envi-carb SPE tube ในการ clean up สารสกัดจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะ ซึ่งเมื่อนำไปตรวจหาปริมาณ spiked sample ทั้ง 3 ระดับแล้วให้ %Recovery อยู่ในช่วง 71-101 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Trajkovska *et al.* (2001) ที่มีการใช้ Envi-carb SPE tube ในการสกัดตัวอย่างน้ำที่ spiked ATZ ความเข้มข้น 3 ระดับ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจหาปริมาณ ATZ ด้วยวิธี HPLC-DAD และ GC-FID ซึ่งก็ให้ผล %Recovery อยู่ในช่วง 94-105 และ 89-104 และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน ส่วนการตรวจหาปริมาณ DIU ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ในการ clean up สารสกัดจากตัวอย่างอาหารในกระเพาะซึ่งเมื่อนำไปตรวจหาปริมาณ spiked sample ทั้ง 3 ระดับแล้วให้ %Recovery อยู่ในช่วง 74-105 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Goswami and Jiang (2018) ที่ใช้ Strata-XL 100 µm Polymeric Reversed Phase SPE ในการสกัด

ตัวอย่างน้ำที่ spiked DIU 1 µg/ml แล้วตรวจหาปริมาณ DIU ด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ให้ค่าเฉลี่ยของ %Recovery เท่ากับ 106.3 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD LOQ %Recovery และ %RSD ของวิธีตรวจหาปริมาณ ATZ ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Martins *et al.* (2016) ที่ใช้วิธี spectrophotometric detection ในสารสกัดจากดิน มีค่า LOD เท่ากับ 0.15 µg/ml LOQ เท่ากับ 0.45 µg/ml %Recovery อยู่ในช่วง 69-102 และ ค่าสูงสุดของ %RSD เท่ากับ 17 พบว่าการศึกษานี้มีค่า LOD เท่ากับ 0.10 µg/ml และ LOQ เท่ากับ 0.50 µg/ml ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับการศึกษาดังกล่าว แต่ %Recovery และ %RSD มีค่าดีกว่าคืออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 71-101 และ 5.53-7.93

เมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOD LOQ %Recovery และ %RSD ของวิธีตรวจหาปริมาณ DIU ในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Araujo *et al.* (2023) ที่ใช้วิธี HPLC ในตัวอย่างดิน มีค่า LOD เท่ากับ 0.032 µg/ml LOQ เท่ากับ 0.107 µg/ml %Recovery อยู่ในช่วง 80-103 และ ค่าสูงสุดของ %RSD อยู่ในช่วง 6-8 พบว่าการศึกษานี้มีค่า LOD เท่ากับ 0.10 µg/ml และ LOQ เท่ากับ 0.63 µg/ml ซึ่งมีค่าสูงกว่าการศึกษาดังกล่าว อย่างไรก็ตาม %Recovery และ %RSD ของทั้งสองวิธีมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จะพบว่าวิธี HPLC มีความไวมากกว่าหรือมีความสามารถในการตรวจหาปริมาณ DIU ได้ในระดับที่ต่ำกว่าวิธี UV-Vis Spectrophotometry แต่ทั้งสองวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน

การนำไปประยุกต์ใช้

ผลจากการนำวิธี TLC (screening test) มาประยุกต์ใช้ กับตัวอย่างอาหารในกระเพาะโค จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าตรวจไม่พบสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างทั้งหมด จึงไม่ได้ตรวจหาปริมาณด้วยวิธี UV-Vis Spectrophotometry

สรุป และข้อเสนอแนะ

วิธี TLC และ UV-Vis Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจหาเอกลักษณ์และปริมาณสารกำจัดวัชพืชชนิด ATZ และ DIU ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา เพื่อการตรวจชันสูตรโรคทางสาเหตุการป่วยตายของสัตว์ที่อาจได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืชทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพและชีวิตสัตว์ให้ครอบคลุมทั้งชนิดสารพิษและชนิดตัวอย่าง เพื่อให้ทันต่อสถานการณ์ที่มีการนำเข้ามาและใช้วัตถุที่มีพิษทางการเกษตรในปริมาณสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. เสริมพันธุ์ สุนทรชาติ หัวหน้ากลุ่มพิษวิทยาและชีวเคมี ที่ให้การสนับสนุนและให้คำแนะนำ และ น.ส. อัญญณัฐ เมธรัตน์อนุกุล ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- ตติย สิริราช. 2547. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร: การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ. หน้า 1-44.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.
- ปัทสรา คุณเลิศ สิริพร เหลืองสุนกุล ประกิจ จันทร์ดี และมลิสาวะชยานนท์. 2564. “การประเมินผลกระทบสารกำจัดวัชพืชอะทราซีนตกค้างในไร่ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์.” [Online]. Available: <https://doa.go.th/research/attachment.php?aid=2990>. [2 มกราคม 2567].
- พงศกร ดันตะรวงศา และดาวจรส เกตุโรจน์. 2560. การตกค้างของสารไดยูรอนในดินที่ใช้ปลูกสับปะรด. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. ระหว่างวันที่ 31 มกราคม-3 กุมภาพันธ์ 2560. หน้า 17-24.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์เจริญสุนทวงศ์, กรุงเทพฯ. 276 หน้า.

- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2566. “สรุปข้อมูลการนำเข้า-ส่งออกวัตถุอันตรายทางการเกษตร พ.ศ.2561-2565.” [Online]. Available: https://www.doa.go.th/ard/?page_id=386. [4 กุมภาพันธ์ 2567].
- Anastassiades, M. and Lehotay, S.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86: 412-431.
- Afful, S., Akpabli, C.K., Yeboah, P.O. and Dogbe, S.A. 2009. Comparison of two detection methods in thin layer chromatographic analysis of some herbicides in a Coastal Savanna soil in Ghana. *West Afr. J. Appl. Ecol.* 12(1): 1-7. doi:10.4314/wajae.v12i1.45778
- Araujo, G.R., da Silva, L.B.X., Vaz, V., Borges, M.P.d.S., Spolidorio, E.S. and Mendes, K.F. 2023. Cucumber Bioassay and HPLC Analysis to Detect Diuron Residues in Remineralized Soils Following *Canavalia ensiformis* Cultivation as a Phytoremediator. *Horticulturae*. 9(12): 1251. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9121251>.
- Blanchoud, H., Alliot, F., Chen, N. and Valdes, D. 2020. Rapid SPE - LC MS/MS analysis for atrazine, its by-products, simazine and S metolachlor in groundwater samples. *MethodsX*. 7: 100824. doi:10.1016/j.mex.2020.100824.
- Eurachem. 2014. “The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed.” [Online]. Available: www.eurachem.org. [February 4, 2024].
- Galera, M.M., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G. and Vazquez, P.P. 1995. Spectrophotometric Method To Determine Ternary Mixtures of Atrazine, Diuron, and Chlorpyrifos in Water and Soil by a Ratio Spectrum-Zero Crossing Method. *J. Am. Oil Chem. Soc. Int.* 78(2): 423-430.
- Goswami, A. and Jiang, J. 2018. Simultaneous quantification of Gabapentin, Sulfamethoxazole, Terbutryn, Terbutylazine and Diuron by UV-Vis spectrophotometer. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 8(1): 3111-3117.
- Horwitz, W. and Albert, R. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J. AOAC Int.* 89(4): 1095-1109.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1990. Atrazine health and safety guide No. 47, WHO Geneva, Switzerland. 22 p.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 2005. Validation of thin-layer chromatographic methods for pesticide residue analysis. IAEA, Vienna, Austria. July.
- Jowett, P.L., Nicholson, S.S. and Gamble, G. A. 1986. Tissue levels of atrazine in a case of bovine poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* 28(6): 539-540.
- Kesari, R. and Gupta, V.K. 1998. A simple method for the spectrophotometric determination of atrazine using p-aminoacetophenone and its application in environmental and biological samples. *Talanta*. 47: 1085-1092.
- Martins, E.C., Melo, V.D.F. and Abate, G. 2016. Evaluation of flow injection analysis method with spectrophotometric detection for the determination of atrazine in soil extracts. *J. Environ. Sci. Health B*. 51(9): 609-615.
- Microsoft Corporation. 2024. “Excel (Microsoft 365 Subscription) [Computer Software].” [Online]. Available: [https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel#:~:text=Microsoft%20Excel%20with%20a%20Microsoft,Excel%202007%2C%20and%20Excel%202003](https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel#:~:text=Microsoft%20Excel%20with%20a%20Microsoft,Excel%202007%2C%20and%20Excel%202003.). [February 4, 2024].
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2024. “PubChem Compound Summary for CID 3120, Diuron.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diuron>. [February 4, 2024].
- Pathak, R.K. and Dikshit, A.K. 2011. Atrazine and Human Health. *Int. J. Ecosyst.* 1(1): 14-23.
- Pawar, U.D., Pawar, C.D., Kulkarni, U.K., Shinde, D.B. and Pardeshi, R.K. 2018. Use of Dragendorffs reagent for Thin Layer Chromatographic detection of triazine class herbicide atrazine. *World J. Pharm. Res.* 7(7): 1951-1955.
- Props, A. J., Richards, H. J., Hooser, S. B., Burcham, G. N. and Wilson-Frank, C. R. 2021. Atrazine intoxication in cattle, confirmed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 33(6): 1163-1167.
- Shah, J., Rasul Jan, M., Ara, B. and Shehzad, F.U. 2011. Quantification of triazine herbicides in soil by microwave-assisted extraction and high-performance liquid chromatography. *Environ. Monit. Assess.* 178(1-4): 111-119.
- SANCO/12571/2013 (19 Nov. 2013). 2014. “Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.” [Online]. Available: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcr/AqcGuidance_Sanco_pesticides.eu/library/docs/allcr/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf. [February 4, 2024].

- Trajkowska, V., Petrovska-Jovanović, S. and Cvetkovski, M. 2001. Development and optimization of a method for the determination of simazine, atrazine and propazine using solid-phase extraction and HPLC/GC. *J. Serb. Chem. Soc.* 66(3): 199–204.
- Tiryaki, O. and Aysal, P. 2005. Applicability of TLC in Multiresidue Methods for the Determination of Pesticides in Wheat Grain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 1143-1149.
- Tommasone, S. 2021. “Thin Layer Chromatography (TLC): An Overview.” [Online]. Available: [https://www.azolifesciences.com/article/Thin-Layer-Chromatography-\(TLC\)-An-Overview.aspx](https://www.azolifesciences.com/article/Thin-Layer-Chromatography-(TLC)-An-Overview.aspx). [February 4, 2024].
- Zhang, G. and Pan, J. 2011. Simultaneous spectrophotometric determination of atrazine and cyanazine by chemometric methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 78(1): 238–242.