

แบบรายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย การศึกษาความรุนแรงของผลกระทบและการเฝ้าระวังสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีพิษร้ายแรงหรือมีความคงทนในสภาพแวดล้อม
3. ชื่อการทดลอง : ศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่ว
Determination of pesticide residue in Yard –Long Bean , Garden Bean and Green Pea.
4. หัวหน้าการทดลอง นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 หัวหน้าโครงการ นางสาววิภา ตังนิพนธ์ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 ผู้ร่วมงาน นางสาวจินตนา ภู่มงกุฏชัย สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่วในช่วง กุมภาพันธ์-มิถุนายน 2555 จาก ภาคต่างๆ ดังนี้ ภาคเหนือ 51 ตัวอย่าง ภาคกลาง 46 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 27 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก 34 ตัวอย่าง และ ภาคใต้ 33 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 191 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถั่วลิ้นเตาหวาน 59 ตัวอย่าง ถั่วลิ้นเตา 44 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 71 ตัวอย่าง และ ถั่วแขก 17 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 131 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม organophosphate 40 ชนิด carbamate 14 ชนิด pyrethroid 7 ชนิด endosulfan และสารชนิดอื่นๆ 70 ชนิด ด้วยเครื่อง GC, HPLC, GC/MS และ LC/MS/MS พบสารพิษตกค้าง 165 ตัวอย่าง (86 % ของตัวอย่างทั้งหมด) พบสาร 54 ชนิด ปริมาณ <math><0.01-1.64\text{ mg/kg}</math> ปริมาณเฉลี่ย 0.05 mg/kg พบตัวอย่างเกินค่า EU MRL(ใช้ค่า uncertainty 50 % ของปริมาณสารพิษตกค้างที่พบ) (SANCO/12495/2011) 130 ตัวอย่างคิดเป็น 68 % ของตัวอย่างทั้งหมด และ เกินค่า Japan MRL(ใช้ค่า uncertainty 30 % ของปริมาณสารพิษตกค้างที่พบ) 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 21 % ของตัวอย่างของตัวอย่างทั้งหมด ชนิดของสารที่พบมาก ได้แก่ carbendazim, acetamiprid, pyrimethanil, tebuconazole, difenoconazole, triadimenol , flusilazole, omethoate, procymidoneและ methomyl สารตกค้างที่พบเกินค่า EU MRL 23 ชนิด เช่น acetamiprid, carbendazim, methomyl, omethoate และ flusilazole เป็นต้น สารตกค้างที่พบเกินค่า Japan MRL 12 ชนิด เช่น

fipronil, myclobutanil, chlorpyrifos และ cypermethrin เป็นต้น การพบสารพิษตกค้างแบ่งตามชนิดของ ตัวอย่างมีดังนี้ ถั่วฝักยาว พบสารพิษตกค้าง 39 ชนิด คิดเป็น 73 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01-1.63 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.09 mg/kg ชนิดของสารที่พบมาก ได้แก่ carbendazim, methomyl, chlorpyrifos, carbofuran และ cypermethrin พบตัวอย่างที่มีสารตกค้างเกินค่า EU MRL 19 ชนิด 33 ตัวอย่าง (46 %) เช่น methomyl, chlorpyrifos, carbendazim, และ carbofuran พบตัวอย่างที่มีสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 11 ชนิด 20 ตัวอย่าง (28 %) เช่น cypermethrin, chlorpyrifos และ triadiminol ถั่วลิ้นเต่า พบสารพิษตกค้าง 38 ชนิด คิดเป็น 100 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 0.57 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.03 mg/kg ชนิดของสารที่พบมาก ได้แก่ acetamiprid, carbendazim, pyrimethanil, difenoconazole, tebuconazole, procymidone, flusilazole และ omethoate พบสารตกค้างเกินค่า EU MRL 15 ชนิด 41 ตัวอย่าง (93 %) เช่น acetamiprid, carbendazim, dimethoate, flusilazole, methomyl และ omethoate พบสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 3 ชนิด 11 ตัวอย่าง (25 %) เช่น fipronil, methamidophos และ lambda-cyhalothrin ถั่วลิ้นเต่าหวาน พบสารพิษตกค้าง 37 ชนิด คิดเป็น 100 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 1.64 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.04 mg/kg สารที่พบมาก ได้แก่ carbendazim, acetamiprid, pyrimethanil, tebuconazole flusilazole, propiconazole และ triadimenol พบสารตกค้างเกินค่า EU MRL 19 ชนิด 53 ตัวอย่าง (90 %) เช่น acetamiprid, carbendazim, omethoate, flusilazole และ myclobutanil พบสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 6 ชนิด 9 ตัวอย่าง (15 %) เช่น fipronil และ propiconazole ถั่วแขก พบสารพิษตกค้าง 9 ชนิด คิดเป็น 59 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 0.59 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.06 mg/kg พบสารตกค้างเกินค่า EU MRL 4 ชนิด 4 ตัวอย่าง (24 %) ได้แก่ cypermethrin, methomyl, triazophos และ omethoate พบสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 2 ชนิด 2 ตัวอย่าง (12 %) ได้แก่ omethoate และ triazophos การเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง ได้นำค่า EU MRL และ Japan MRL มาใช้เปรียบเทียบ เนื่องจาก สารที่พบ 54 ชนิด มีค่า EU MRL กำหนดไว้ในพืชผักตระกูลถั่ว 49 ชนิดสารหรือคิดเป็น 91 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ ซึ่งเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (defaults level) ถึง 38 ค่า หรือ 70 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ ทำให้พบจำนวนตัวอย่างที่เกินค่า EU MRL จำนวนมาก ส่วนค่า Japan MRL มีการกำหนดไว้ 30 ชนิดสาร หรือคิดเป็น 56 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ การไม่นำค่า Codex MRL มาใช้เปรียบเทียบเนื่องจากสารที่ตรวจพบ 54 ชนิด มีการกำหนดค่าในพืชผักตระกูลถั่ว ไว้เพียง 16 ชนิดสารหรือคิดเป็น 30 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ ผลการตรวจวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร ต่อไป ซึ่งชนิดของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบ เป็นการสะท้อนให้เห็นถึง การใช้สารเคมีในการดูแลผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกร และแสดงให้เห็นว่ายังคงมีปัญหาสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่ว

6. คำนำ

พืชผักตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วลันเตาหวาน ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว และ ถั่วแขก เป็นพืชที่มีปัญหาพบสารพิษตกค้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถั่วฝักยาว ได้รับการแจ้งเตือนสินค้าประเภทผักสด จากประเทศไทย ที่ส่งออกไปยังสหภาพยุโรป (EU) ในระบบ RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed) ในปี พ.ศ. 2553 ว่าพบสารพิษตกค้าง dimethoate , omethoate, formetanate, triazophos และ methomyl เกินค่าปลอดภัย (European Communities. 2011) ซึ่งพืชผักตระกูลถั่วมีโรคและแมลงมากจึงต้องใช้สารป้องกันกำจัดหลายชนิด เช่น ถั่วฝักยาว มีแมลงและโรคที่สำคัญ ได้แก่ หนอนแมลงวันเจาะต้นถั่ว หนอนเจาะฝักถั่ว โรคใบจุด โรคราสนิม โรคใบด่าง ถั่วแขก มีแมลงและโรคที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่น ไธแดง แมลงหวี่ขาว หนอนเจาะฝัก หนอนกระทู้ผัก และ ถั่วลันเตา มีแมลงและโรคที่สำคัญได้แก่ โรคเหี่ยว, โรคใบจุด, โรคราแป้ง, โรคเน่าเปียก, หนอนขอนใบ, เพลี้ยไป

ถั่วฝักยาวแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ ราชบุรี นครปฐม สระบุรี ปทุมธานี อ่างทอง นครนายก นครราชสีมาหนองคาย อุดรธานี บุรีรัมย์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ตรัง นครสวรรค์ เชียงใหม่ ลำปาง ถั่วลันเตานิยมปลูกในทุกภาค มักปลูกในแถบถิ่นที่มีอากาศเย็น และชุ่มชื้น เช่น จังหวัดเพชรบูรณ์ ลำปาง เชียงใหม่ ตาก นครสวรรค์ นครราชสีมา ปราจีนบุรี กาญจนบุรี นครปฐม และสุราษฎร์ธานี

การศึกษาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่วทำให้ทราบข้อมูลและปัญหาสารพิษตกค้างและการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรของเกษตรกร โดยมีการตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารพิษตกค้าง โดยใช้เครื่อง GC/MS โดยเทียบกับฐานข้อมูลที่มีสารพิษตกค้าง 430 ชนิด และมีการตรวจสอบชนิดใหม่ด้วยเครื่อง LC/MS/MS ทำให้สามารถหาชนิดของสารได้ครอบคลุมมากขึ้น ทำให้ทราบถึงชนิดของสารพิษตกค้างชนิดอื่นๆ ที่มีปัญหาสารพิษตกค้าง นำไปสู่การกำหนดนโยบายในการจัดการ การขึ้นทะเบียน และการใช้วัตถุพิษการเกษตรในประเทศไทย และกำหนดการแก้ปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตการเกษตร

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 วัตถุพิษมาตรฐาน 131 ชนิด ความบริสุทธิ์ 93.5-99.9 %

7.1.2 สารเคมี ได้แก่ acetone, dichloromethane, ethyl acetate, acetonitrile, sodium sulfate, sodium chloride, sodium acetate, anhydrous magnesium sulfate, primary secondary amine (PSA) และ graphite carbon black (GCB)

7.1.3 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, Food Processor , rotary evaporator, homogenizer และ centrifuge

7.1.4 เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิด, กระจกตวง, บีกเกอร์, volumetric pipet, test tube, volumetric flask, กรวยแก้ว และ centrifuge tubes ขนาด 15 และ 50 ml

7.1.5 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง GC/MS Single Quadrupole , Agilent:7890, MSD:5973 N โดยใช้ capillary column ชนิด DB-5MS i.d 0.25 mm , 30 m, film thickness 0.25 μm ตั้ง Mass Spectrometer เป็น Scan Mode เพื่อทราบชนิดของสารพิษตกค้าง และ SIM Mode เพื่อทราบปริมาณสารพิษตกค้าง และใช้ Atune.u

7.1.6 เครื่องตรวจวิเคราะห์ Gas Chromatograph (GC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890 ซึ่งมีหัวตรวจชนิด Electron Captured Detector (ECD) ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan หัวตรวจชนิด Flame Photometric Detector (FPD) ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate โดยใช้ capillary column ชนิด Ultra-1 ,i.d. 0.32 mm , 25 m, film thickness 0.17 μm

7.1.7 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 ซึ่งมีหัวตรวจชนิด Fluorescence Detector (FLD) ต่อกับเครื่อง Post Column Derivatization (Pickering) โดยใช้ column ชนิด Lichrosphere 60 -RP select B, i.d. 4.0 mm ความยาว 250 mm particle size 5 μm โดย FLD กำหนด excitation 330 nm และ emission 465 nm

7.1.8 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง Liquid Chromatograph / Mass Spectrometer/ Mass Spectrometer (LC/MS/MS) Triple Quadrupole , Agilent:7890, MSD:5973 N ใช้ column : Kinetex™ 2.6 μm XB-C18 100 Å, LC Column 100 x 2.1 mm โดยใช้ ESI,Positive mode

7.1.9 ตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วลันเตาหวาน ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว และ ถั่วแขก

7.2 วิธีดำเนินการ

เก็บตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่วในช่วง กุมภาพันธ์-มิถุนายน 2555 จาก ภาคต่างๆ ดังนี้ ภาคเหนือ 51 ตัวอย่าง ภาคกลาง 46 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 27 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก 34 ตัวอย่าง และ ภาคใต้ 33 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 191 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถั่วลันเตาหวาน 59 ตัวอย่าง ถั่วลันเตา 44 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 71 ตัวอย่าง และ ถั่วแขก 17 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 131 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม organophosphate 40 ชนิด carbamate 14 ชนิด pyrethroid 7 ชนิด endosulfan และสารชนิดอื่นๆ 70 ชนิด โดยสกัดตัวอย่างด้วย วิธีการที่ปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) สารกลุ่ม organophosphate นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/FPD สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan ขจัดสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างด้วย ปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985) นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/ECD สารกลุ่ม carbamate สารชนิดอื่นๆ ขจัดสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างด้วย วิธีการ QuEChERS (Lehotay, 2003) นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC, LC/MS/ MS และ GC/ MS เพื่อหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างและยืนยันชนิดของสารพิษตกค้างที่พบ

7.2.1 วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

7.2.1.1 การสกัดและ การ clean up

เตรียมตัวอย่าง โดยนำมาปั่นละเอียดด้วย Food Processor และชั่งน้ำหนักตามวิธีการที่ตรวจวิเคราะห์

1) วิธีการสกัดปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985)

ตัวอย่าง 25 g สกัดด้วย acetone, dichloromethane และ sodium chloride โดยใช้เครื่อง homogenizer กรองสารละลายผ่าน sodium sulfate นำสารละลาย 50 ml ไปลดปริมาตรตัวทำละลายด้วยเครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40^o C จนเกือบแห้งแล้วเป่าด้วย แก๊สไนโตรเจนจนแห้ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml ด้วย ethyl acetate นำตัวอย่างใส่ vial และนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างสารกลุ่ม organophosphate ด้วยเครื่อง GC/FPD

2) การ clean up

2.1) ปรับจากวิธีการของ Steinwandter (1985)

ขจัดสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างด้วย silica gel 60 ซึ่ง deactivated ด้วยน้ำ 10% น้ำหนัก 1.0 กรัม ซึ่ง pack ใน Bond Elut Reservoir โดย elute ด้วย hexane – dichloromethane (4:1) ตามด้วย hexane – dichloromethane (1:1) นำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์นำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยสารละลายที่อุณหภูมิ 40^o C จนเกือบแห้ง แล้วเป่าด้วย แก๊สไนโตรเจนจนแห้ง ปรับปริมาตรด้วย hexane ชนิด PR grade เป็น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ vial และนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan ด้วยเครื่อง GC/ECD

2.2) ปรับจากวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, *et al.*, 2003)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 ml ใส่ลงใน centrifuge tubes ขนาด 15 ml เป่าด้วย แก๊สไนโตรเจนจนแห้ง เติม acetonitrile 2 ml เขย่าให้ละลาย เติม MgSO₄ 300 mg, PSA 200 mg และ GCB 50 mg ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer นาน 30 วินาที นำไป centrifuge ด้วย ที่ระดับความเร็วรอบ >3,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตูดสารละลาย ใส่ใน GC-vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC, LC/MS/ MS และ GC/ MS เพื่อหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างชนิดอื่นและยืนยันชนิดของสารพิษตกค้างที่พบ

7.2.1.2 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/ECD/FPD

การตั้งค่าสถานะของเครื่อง มีรายละเอียดของเครื่องดังนี้

- gas chromatograph ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890 หัวตรวจชนิด Electron Captured Detector (ECD) ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ endosulfan หัวตรวจชนิด Flame Photometric Detector (FPD) ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate

- capillary column ชนิด Ultra-1 เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตร ความหนาของฟิล์ม liquid phase ที่ใช้เคลือบใน column 0.17 ไมโครเมตร

- อุณหภูมิ oven เริ่มต้นที่ 700 C คงไว้ 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิอัตรา 50 C / นาที จนถึง 1200C คงไว้ 1 นาที และ อัตรา 150 C / นาที จนถึง 2500C คงไว้ 6.33 นาที และเพิ่มอุณหภูมิ อัตรา 150 C/นาที จนถึง 2600 C คงไว้ 9.3 นาที

- อุณหภูมิ injector 2500 C
- อุณหภูมิ detector 3000C
- ใช้ helium เป็น carrier gas อัตราไหล 2.2 ml/นาที
- volume inject 1 µl
- ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง (run time) 39 นาที

7.2.1.3 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC / MS

เครื่อง GC/MS Single Quadrupole ยี่ห้อ Agilent รุ่น Agilent-7890A, MSD :
5975C

- capillary column ชนิด DB-5MS เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม liquid phase ที่ใช้เคลือบใน column 0.25 µm carrier gas ใช้ mode : constant flow อัตราไหล 1.5 ml/นาที

- oven อุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 500 C คงไว้ 1 นาที เพิ่มอุณหภูมิอัตรา 250 C / นาที จนถึง 1250C คงไว้ 0 นาที และ อัตรา 100 C / นาที จนถึง 3000C คงไว้ 10 นาที ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง (run time) 31.5 นาที

- inlet ใช้ Mode splitless ตั้งอุณหภูมิ 2500 C อัตราการไหลของ carrier gas ตั้งนี้ Vent Flow 50 ml/นาที ที่ 3.5 นาที และ gas saver 20 ml/นาที ที่ 7 นาที

- ปริมาณสารที่ฉีด 2 µl

- Mass Spectrometer ตั้งสภาวะของเครื่องตั้งนี้ อุณหภูมิ transfer line 280 oC, Quadrupole 150 oC และ MS source 230 oC ใช้ solvent delay 6 นาที ใช้ Mode Scan เพื่อทราบชนิดของสารพิษตกค้าง และ SIM เพื่อทราบปริมาณสารพิษตกค้าง และใช้ Atune.u

7.2.1.4 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/FLD

การตั้งค่าสภาวะของเครื่อง มีรายละเอียดดังนี้

- HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 หัวตรวจชนิด Fluorescence Detection (FLD) ต่อกับเครื่อง Post Column Derivatization (Pickering)

- column ชนิด Lichrosphere 60 -RP select B เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 mm ความยาว 250 mm particle size 5 µm

- mobile phase ใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ Water, Methanol และ Acetonitril ตั้งแบบ gradient ในเวลา 30 นาที Flow Rate 0,8 ml/นาที

- excitation 330 nm และ emission 465 nm

- volume inject 20 µl

7.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม mixed working standard solution สารพิษตกค้าง 131 ชนิด แยกเป็นกลุ่มตามชนิดของเครื่องตรวจวิเคราะห์ ประกอบด้วย สารกลุ่ม organophosphate 40 ชนิด ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/FPD สารกลุ่ม pyrethroid 7 ชนิด และ endosulfan ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/ECD สารกลุ่ม carbamate 14 ชนิด ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC/FLD สารชนิดอื่นๆ 70 ชนิด ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS และ LC/MS/MS โดยเตรียมในสารละลายที่สกัดจาก Blank Sample ตามวิธีการสกัด เพื่อทำ calibration curve

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ : กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร สปพ. กรมวิชาการเกษตร

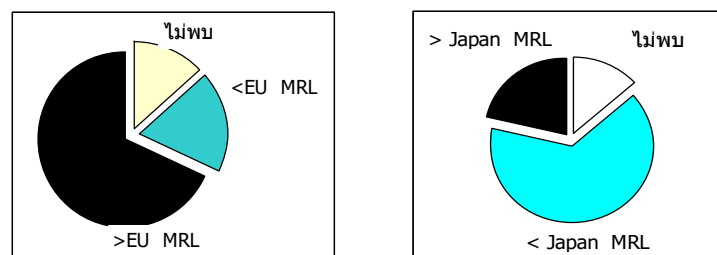
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่วในช่วง กุมภาพันธ์-มิถุนายน 2555 จาก ภาคต่างๆ ดังนี้ ภาคเหนือ 51 ตัวอย่าง ภาคกลาง 46 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 27 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก 34 ตัวอย่าง และ ภาคใต้ 33 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 191 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถั่วลิ้นเต้าหวาน 59 ตัวอย่าง ถั่วลิ้นเต้า 44 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 71 ตัวอย่าง และ ถั่วแขก 17 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 131 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม organophosphate 40 ชนิด carbamate 14 ชนิด pyrethroid 7 ชนิด endosulfan และสารชนิดอื่นๆ 70 ชนิด ด้วยเครื่อง GC, HPLC, GC/MS และ LC/MS/MS พบสารพิษตกค้าง 165 ตัวอย่าง (86 % ของตัวอย่างทั้งหมด) พบสาร 54 ชนิด ปริมาณ <0.01- 1.64 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.05 mg/kg สารที่พบเกินค่า MRL (Maximum Residue Limited) มีดังนี้ พบตัวอย่างเกินค่า EU MRL (ใช้ค่า uncertainty 50 % ของปริมาณสารพิษตกค้างที่พบ) 130 ตัวอย่าง คิดเป็น 68 % ของตัวอย่างทั้งหมด และ เกินค่า Japan MRL (ใช้ค่า uncertainty 30 % ของปริมาณสารพิษตกค้างที่พบ) 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 21 % ของตัวอย่างของตัวอย่างทั้งหมด (ภาพที่ 1) ซึ่งสารที่พบ 54 ชนิด มีการกำหนดค่า EU-MRL ไว้ในพืชผักตระกูลถั่ว 49 ชนิดสารหรือคิดเป็น 91 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ ซึ่งเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (defaults level) ถึง 38 ค่า หรือ 78 % ของชนิดสารที่มีค่า MRL ทำให้พบจำนวนตัวอย่างที่เกินค่า EU MRL จำนวนมาก สารที่พบ 54 ชนิด มีค่า EU MRL ส่วนค่า Japan MRL มีการกำหนดไว้ 30 ชนิดสาร หรือคิดเป็น 56 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ การไม่นำค่า Codex MRL มาใช้เปรียบเทียบเนื่องจากสารที่ตรวจพบ 54 ชนิด มีการกำหนดค่าในพืชผักตระกูลถั่ว ไว้เพียง 16 ชนิดสารหรือคิดเป็น 30 % ของชนิดสารที่ตรวจพบ

ชนิดของสารที่พบมาก โดยเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด เช่น carbendazim 124 ตัวอย่าง (65 %), acetamiprid 94 ตัวอย่าง (49 %), pyrimethanil 71 ตัวอย่าง (37%), tebuconazole 47 ตัวอย่าง (25 %), difenoconazole 36 ตัวอย่าง (19 %), triadimenol 34 ตัวอย่าง (18 %), flusilazole 30 ตัวอย่าง (16 %), omethoate 29 ตัวอย่าง (15 %), procymidone 26 ตัวอย่าง (14 %) และ

methomyl 25 ตัวอย่าง (13%), propiconazole 24 ตัวอย่าง (13%) dimethomorph 21 ตัวอย่าง (11%) cypermethrin 20 ตัวอย่าง (10%)

สารตกค้างที่พบเกินค่า EU MRL 23 ชนิด เช่น acetamiprid 85 ตัวอย่าง (45%) carbendazim 32 ตัวอย่าง (17%) methomyl 24 ตัวอย่าง (13%) omethoate 17 ตัวอย่าง (9%) flusilazole 10 ตัวอย่าง (5%) myclobutanil 7 ตัวอย่าง (4%) chlorpyrifos 7 ตัวอย่าง (4%) สารตกค้างที่พบเกินค่า Japan MRL 12 ชนิด fipronil 11 ตัวอย่าง (6%) cypermethrin 4 ตัวอย่าง (4%) chlorpyrifos 5 ตัวอย่าง (3%) เกินค่า Japan MRL (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 การพบสารพิษตกค้างในตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่ว 191 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่า MRL

การพบชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างแบ่งตามชนิดของตัวอย่าง (ตารางที่ 2) มีดังนี้

ถั่วฝักยาว พบสารพิษตกค้าง 39 ชนิด คิดเป็น 73 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 1.63 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.09 mg/kg ชนิดของสารที่พบมาก ได้แก่ carbendazim, methomyl, chlorpyrifos, carbofuran และ cypermethrin พบสารตกค้างเกินค่า EU MRL 19 ชนิด 33 ตัวอย่าง (46%) เช่น methomyl, chlorpyrifos, carbendazim, และ carbofuran พบตัวอย่างที่มีสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 11 ชนิด 20 ตัวอย่าง (28%) เช่น cypermethrin, chlorpyrifos และ triadimenol

ถั่วลันเตา พบสารพิษตกค้าง 38 ชนิด คิดเป็น 100 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 0.57 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.03 mg/kg ชนิดของสารที่พบมาก ได้แก่ acetamiprid, carbendazim, pyrimethanil, difenoconazole, tebuconazole, procymidone, flusilazole และ omethoate พบตัวอย่างที่มีสารตกค้างเกินค่า EU MRL 15 ชนิด 41 ตัวอย่าง (93%) เช่น acetamiprid, carbendazim, dimethoate, flusilazole, methomyl และ omethoate พบตัวอย่างที่มีสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 3 ชนิด 11 ตัวอย่าง (25%) เช่น fipronil, methamidophos และ lambda-cyhalothrin

ถั่วลันเตาหวาน พบสารพิษตกค้าง 37 ชนิด คิดเป็น 100 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 1.64 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.04 mg/kg สารที่พบมาก ได้แก่ carbendazim, acetamiprid, pyrimethanil, tebuconazole flusilazole, propiconazole และ triadimenol พบสารตกค้างเกินค่า EU

MRL 19 ชนิด 53 ตัวอย่าง (90 %) เช่น acetamiprid, carbendazim, omethoate, flusilazole และ myclobutanil พบสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 6 ชนิด 9 ตัวอย่าง (15 %) เช่น fipronil และ propiconazole

ถั่วแขก พบสารพิษตกค้าง 9 ชนิด คิดเป็น 59 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ <0.01- 0.59 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.06 mg/kg พบสารตกค้างเกินค่า EU MRL 4 ชนิด 4 ตัวอย่าง (24 %) ได้แก่ cypermethrin, methomyl, triazophos และ omethoate พบสารตกค้างเกินค่า Japan MRL 2 ชนิด 2 ตัวอย่าง (12 %) ได้แก่ omethoate และ triazophos

11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างใน ผักตระกูลถั่วในช่วง กุมภาพันธ์-มิถุนายน 2555 จาก ภาคต่างๆ ดังนี้ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และ ภาคใต้ รวมทั้งสิ้น 191 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถั่วลิ้นเตาหวาน 59 ตัวอย่าง ถั่วลิ้นเตา 44 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 71 ตัวอย่าง และ ถั่วแขก 17 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 131 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม organophosphate, carbamate, pyrethroid, endosulfan และสารชนิดอื่นๆ ด้วยเครื่อง GC, HPLC, GC/MS และ LC/MS/MS พบสารพิษตกค้าง 165 ตัวอย่าง (86 % ของตัวอย่างทั้งหมด) พบสาร 54 ชนิด ปริมาณ <0.01- 1.64 mg/kg ปริมาณเฉลี่ย 0.05 mg/kg สารที่พบเกินค่า MRL (Maximum Residue Limited) มีดังนี้ พบตัวอย่างเกินค่า EU MRL (ใช้ค่า uncertainty 50 % ของปริมาณสารพิษตกค้างที่พบ) 130 ตัวอย่างคิดเป็น 68 % ของตัวอย่างทั้งหมด และ เกินค่า Japan MRL (ใช้ค่า uncertainty 30 % ของปริมาณสารพิษตกค้างที่พบ) 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 21 % ของตัวอย่างของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่พบใกล้เคียงกับการศึกษาในปี 2554 ซึ่งมีการสำรวจชนิดและปริมาณสารตกค้างในพืชผักตระกูลถั่ว 221 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้าง 57 ชนิด 199 ตัวอย่าง (90 % ของตัวอย่างทั้งหมด) พบสารเกินค่า EU-MRL 62 % ของตัวอย่างทั้งหมด พบเกินค่า Japan-MRL 29 % ของตัวอย่างทั้งหมด และพบว่าปริมาณสารพิษตกค้าง cypermethrin และ chlopyrifos มีการพบลดลงจากปี 2554 ซึ่งการศึกษาในปี 2554 พบ cypermethrin และ chlopyrifos 38 % และ 17 % (ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์) ส่วนการศึกษาในปี 2555 พบ 11 % และ 6 % (ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์) แสดงให้เห็นว่ามีการใช้สารชนิดอื่นๆ ทดแทนสารทั้งสองชนิดที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและพบว่าการตกค้างในหลายพืช สำหรับการพบสาร carbendazim, acetamiprid และ pyrimethanil ยังคงมีการพบในตัวอย่างในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ทั้ง 2 ปี ที่ทำการศึกษา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพืชผักตระกูลถั่ว มีปัญหาด้านสารพิษตกค้างสูง และมีความเสี่ยงภัยในด้านสารพิษในการบริโภคโดยเฉพาะการบริโภคสด แม้ว่าปริมาณที่พบไม่สูง ซึ่งปริมาณเฉลี่ย 0.05 mg/kg และปริมาณสูงสุดที่พบ 1.64 mg/kg แต่มีการพบสารพิษตกค้างในตัวอย่างเดียวกัน พบสาร 5 ชนิดขึ้นไป 68 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถั่วลิ้นเตาหวาน 33 ตัวอย่าง ถั่วลิ้นเตา 27 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 8 ตัวอย่าง พบสาร

10 ชนิดขึ้นไป 9 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ถั่วลิ้นเตาหวาน 2 ตัวอย่าง ถั่วลิ้นเตา 7 ตัวอย่าง และพบสารในถั่วลิ้นเตา 1 ตัวอย่างถึง 13 ชนิด แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรมีการใช้สารหลายชนิดในหนึ่งฤดูการเพาะปลูก

ชนิดของสารที่พบมาก คือสารกลุ่ม fungicide ได้แก่ carbendazim, pyrimethanil difenoconazole, tebuconazole , triadimenol, flusilazole, propiconazole, hexaconazole และ dimethomorph สารกลุ่ม insecticide ได้แก่ acetamiprid ,chlorpyrifos, cypermethrin, methomyl , prochloraz และ omethoate มีการพบสารที่ห้ามใช้คือ methamidophos 14 ตัวอย่าง ในถั่วลิ้นเตา 5 ตัวอย่าง ถั่วลิ้นเตาหวาน 6 ตัวอย่าง และ ถั่วฝักยาว 3 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร ต่อไป ซึ่งชนิดของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบ เป็นการสะท้อนให้เห็นถึง การใช้สารเคมีในการดูแลผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกร และแสดงให้เห็นว่าถึงปัญหาสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่ว

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เป็นข้อมูลในการแก้ปัญหาสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่วและกำหนดชนิดของสารเพื่อการเฝ้าระวังในพืชผัก
2. ใช้ประกอบการกำหนดค่า MRL (Maximum Residue Limited) ของสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่ว
3. เป็นข้อมูลในการกำหนดชนิดของวัตถุอันตรายทางการเกษตรเพื่อศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างในการทำแปลงทดลองเพื่อกำหนดค่า MRL (Maximum Residue Limited) ของสารพิษตกค้างในพืชผักตระกูลถั่ว
4. เป็นข้อมูลในการกำหนดชนิดของวัตถุอันตรายทางการเกษตร ที่ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่ว ก่อนการส่งออก

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่พบมากในตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่ว

ชนิดของสาร	ปริมาณ (mg/kg)	ปริมาณเฉลี่ย (mg/kg)	จำนวนตัวอย่างที่พบ	%ตัวอย่างที่พบ	จำนวนตัวอย่าง > MRL	
					EU	Japan
Carbendazim	< 0.01 - 0.66	0.05	124	65	32	2
Acetamiprid	< 0.01 - 0.52	0.06	94	49	85	2
Pyrimethanil	< 0.01 - 0.10	0.02	71	37	-	-
Tebuconazole	< 0.01 - 0.18	0.03	47	25	-	1
Difenoconazole	< 0.01 - 0.06	0.02	36	19	-	-
Triadimenol	< 0.01 - 0.36	0.03	34	18	4	3
Flusilazole	< 0.01 - 0.06	0.01	30	16	10	-
Omethoate	< 0.01 - 0.57	0.06	29	15	17	1
Procymidone	< 0.01 - 1.64	0.11	26	14	2	-
Methomyl	< 0.01 - 0.61	0.09	25	13	24	-
Propiconazole	< 0.01 - 0.09	0.01	24	13	3	2
Dimethomorph	< 0.01 - 0.17	0.01	21	11	2	-
Cypermethrin	0.01 - 0.93	0.21	20	10	3	8
Myclobutanil	< 0.01 - 0.35	0.07	18	9	7	-
Carbofuran	< 0.01 - 0.10	0.01	17	9	6	-
Prochloraz	< 0.01 - 0.02	0.00	16	8	-	-
Methamidophos	< 0.01 - 0.06	0.02	14	7	3	4
Chlorpyrifos	< 0.01 - 1.07	0.14	13	7	7	5
Acephate	< 0.01 - 0.42	0.07	12	6	6	-
Dimethoate	< 0.01 - 0.13	0.03	11	6	5	-
Fipronil	< 0.01 - 0.22	0.03	11	6	3	11
Formetanate	< 0.01 - 0.10	0.02	9	5	-	-
Hexaconazole	< 0.01 - 0.01	0.00	9	5	2	-
EPN	< 0.01 - 1.63	0.25	8	4	-	-
Metalaxyl	< 0.01 - 0.18	0.03	8	4	1	-
Lambda cyhalothrin	0.03 - 0.76	0.19	7	4	-	2
Carbosulfan	< 0.01 - 0.00	0.00	7	4	-	-
Kresoxim-methyl	< 0.01 - 0.01	0.01	7	4	-	-
Azoxystrobin	< 0.01 - 0.04	0.01	5	3	-	-
Carbaryl	< 0.01 - 0.02	0.01	5	3	-	-
Cyproconazole	< 0.01 - 0.01	0.01	4	2	-	-
Oxadixyl	< 0.01 - 0.02	0.01	4	2	2	-
Pyridaben	< 0.01 - 0.05	0.02	4	2	1	-
Tetraconazole	< 0.01 - 0.05	0.02	4	2	4	-
Triazophos	< 0.01 - 0.02	0.01	4	2	3	2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง ในตัวอย่างพืชผักตระกูลถั่ว แยกตามชนิดพืช

พืช	รายละเอียดตัวอย่าง		ชนิดสารตกค้าง	ตัวอย่างที่พบ	EU- MRL		Japan- MRL	
					mg/kg	ตัวอย่าง >MRL	mg/kg	ตัวอย่าง > MRL
ถั่วฝักยาว	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	71	Carbendazim	29	0.1	4	0.6	1
	ตัวอย่างพบสารพิษตกค้าง	52	Methomyl	22	0.02	18	-	-
	จำนวนชนิดสารพิษตกค้างที่	39	Chlorpyrifos	11	0.05	5	0.05	5
	ปริมาณสารพิษตกค้าง	<0.01-1.63	Carbofuran	10	0.02	5	0.2	-
			Cypermethrin	9	0.7	2	0.05	8
			Acetamiprid	7	0.01	3	0.4	1
			EPN	7	-	-	-	-
			Formetanate	7	0.3	-	-	-
			Metalaxyl	6	0.05	1	-	-
			Omethoate	6	0.02	2	2.00	-
			Triadimenol	6	0.1	3	0.1	3
		Acephate	4	0.02	3	2.00	-	
		Azoxystrobin	3	3	-	0.5	-	
ถั่วลิ้นเตา	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	44	Acetamiprid	36	0.01	35	-	-
	ตัวอย่างพบสารพิษตกค้าง	44	Carbendazim	36	0.1	9	0.6	-
	จำนวนชนิดสารพิษตกค้างที่	38	Pyrimethanil	24	3	-	-	-
	ปริมาณสารพิษตกค้าง	<0.01-0.57	Difenoconazol	21	1	-	-	-
			Tebuconazole	20	2	-	0.2	-
			Procymidone	14	1	-	5	-
			Flusilazole	11	0.02	5	-	-
			Omethoate	11	0.02	5	1	-
			Triadimenol	8	0.1	-	-	-
			Dimethoate	7	0.02	5	1	-
			Fipronil	7	0.05	2	0.002	7
		Methomyl	7	0.02	5	-	-	
		Prochloraz	7	0.05	-	-	-	
ถั่วลิ้นเตาหวาน	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	59	Carbendazim	54	0.10	19	0.6	1
	ตัวอย่างพบสารพิษตกค้าง	53	Acetamiprid	51	0.01	47	0.4	1
	จำนวนชนิดสารพิษตกค้างที่	37	Pyrimethanil	45	3.00	-	0.3	-
	ปริมาณสารพิษตกค้าง	<0.01-1.64	Tebuconazole	27	2.00	-	0.2	1
			Flusilazole	19	0.02	5	-	-
			Triadimenol	19	0.10	1	0.2	-
			Propiconazole	17	0.05	3	0.05	2
			Dimethomorp	14	0.10	1	-	-
			Difenoconazol	13	1.00	-	-	-
			Myclobutanil	11	0.02	7	-	-
			Omethoate	11	0.02	9	1	-
		Procymidone	11	1.00	2	5	-	
		Prochloraz	8	0.05	-	0.3	-	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืช	รายละเอียดตัวอย่าง		ชนิดสารตกค้าง	ตัวอย่างที่พบ	EU- MRL		Japan- MRL	
					mg/kg	ตัวอย่าง >MRL	mg/kg	ตัวอย่าง > MRL
ถั่วแขก	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	17	Carbendazim	5	0.1		0.1	
	ตัวอย่างพบสารพิษตกค้าง	10	Carbofuran	2	0.02		0.02	
	จำนวนชนิดสารพิษตกค้างที่	9	Cypermethrin	3	0.7	1	0.7	
	ปริมาณสารพิษตกค้าง	<0.01-0.59	Fenobucarb	1	0.02		0.02	
			Methomyl	3	0.02	1	0.02	
			Omethoate	1	0.02	1	0.02	1
			Pyrimethanil	1	3		3	
			Triadimenol	1	0.1		0.1	
		Triazophos	1	0.01	1	0.01	1	

13. เอกสารอ้างอิง

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaber. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive solid- Phase Extraction” for determination of Pesticide Residues in Produce. J.AOAC. Int.86, 412-431.

Codex. 1995. Codex Alimentarius volume 3. Residues of Veterinary Drugs in Food.

European Communities. 2011. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2010.

Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to Validate Pesticide Residue Method Performance. In : Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus (eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

Lehotay, S. J. 2007. Determination of Pesticides Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium sulfate : Collaborative Study. J.AOAC. Int. 90, 485-520.

Pesticide EU-MRLs Regulation (EC) No 396/2005. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm (May 29, 2011).

SANCO/12495/2011. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed .

Steinwandter H. 1985. Universal 5 min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residue and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem. No. 1155.

The Japan Food chemical Research Foundation. Positive list System for Agricultural Chemical Residues in Foods. “Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods”. <http://www.ffcr.or.jp>. (May 29, 2011).

