

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช
2. โครงการวิจัย : การศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้และผัก
- กิจกรรม : 2. ศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างในผักบริโภคผล (fruiting vegetable) เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง
3. ชื่อการทดลอง : 2.1 วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของอะซอกซิสโตรบิน (azoxystrobin) ในพริกเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง
- : Residue Trials of Azoxystrobin in Chilli to Establish Maximum Residue Limit (Trial 1 - 6)

### 4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายประพันธ์ เคนท้าว	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมการทดลอง	นางสาวจินตนา ภูมังกูญชัย	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวสุพัตร์ หนูสังข์	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวศศิณีญา คงเข้มดี	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### 5. บทคัดย่อ

#### ภาษาอังกฤษ

This research aimed to determine the amount of azoxystrobin residues in Chilli for establish the maximum residue limits (MRLs). It was carried out in 6 trial plots, each trial plot was split into 2 sub-experimental plots, control and treated plot (spraying with 10 mL of 25 % W/V SC azoxystrobin per 20 L of water, at 3 sprays every 7 days. The samples were collected after the last application at 0 (2 hrs), 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 and 17 days, the residues using the QuEChERS method (EN 15662) for extraction, the pesticide using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique and which of this test method was validated. The results showed that linearity of test method was in the range of 0.01-0.05 mg/kg, limit of detection and limit of quantitation (LOD and LOQ) were 0.005 and 0.01 mg/kg, respectively. The pesticide residues from first to sixth trail plots were in the range of 0.88 – 0.01 mg/kg. The experiment results will be submitted to the National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards

to determine the maximum limit of residue in Thailand. And submit the information to Codex as part of determining the maximum residue limits of azoxystrobin in chilies.

### บทคัดย่อ

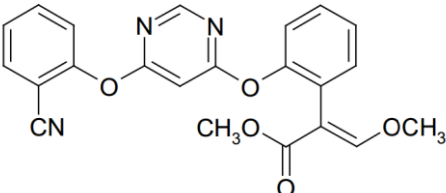
งานวิจัยนี้เป็นการหาปริมาณที่ตกค้างในพริกเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดสารพิษตกค้าง (MRLs) ทำการทดลองทั้งหมด 6 แปลง แต่ละแปลงทดลองแบ่งเป็น 2 แปลงทดลองย่อย คือแปลงควบคุม และแปลงที่พ่นสารอะซอกซีสโตรบิน 25 % W/V SC ที่อัตราแนะนำ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน ภายหลังจากพ่นสารครั้งสุดท้ายสุ่มเก็บตัวอย่างพริกที่ระยะเวลา 0 (2 ชั่วโมง), 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 และ 17 วัน ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างโดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS) พร้อมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ พบว่าความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบอยู่ในช่วง 0.01-0.05 mg/kg ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณคือ 0.005 และ 0.01 mg/kg และปริมาณสารพิษตกค้างที่ระยะเวลาต่างๆในแปลงทดลองที่ 1 - 6 มีค่าอยู่ในช่วง 0.88 - 0.01 mg/kg ซึ่งจะนำผลการทดลองที่ได้เสนอต่อสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและมาตรฐานแห่งชาติ (มกอช.) เพื่อกำหนดเป็นค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างของประเทศไทย และเสนอข้อมูลดังกล่าวต่อ Codex เพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการพิจารณา กำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของอะซอกซีสโตรบินในพริกต่อไป

### 6. คำนำ

พริก เป็นเครื่องเทศปรุงรสที่สำคัญในการประกอบอาหารของชาวโลกและชาวไทยมาอย่างช้านาน โดยสำหรับคนไทยแล้วพริกมีความสำคัญทั้งด้านเศรษฐกิจ สังคม และการสืบทอดภูมิปัญญาท้องถิ่น ซึ่งในปี พ.ศ. 2559 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพริกรวมทุกชนิดราวๆ 2.5 แสนไร่ จากพื้นที่ปลูกพืชผักทั้งหมด 1.3 ล้านไร่ คิดเป็นผลผลิตพริกรวมทุกชนิดมากกว่า 280 ล้านกิโลกรัม โดยพริกที่นิยมปลูกมากที่สุดคือพริกชี้หนูผลใหญ่ (พริกจินดา และชูเปอร์ฮอต) พริกชี้หนูผลเล็ก (พริกชี้หนูสวน) และพริกใหญ่ตามลำดับ (วรรณภา และคณะ, 2561) ปัจจุบันประเทศไทยมีแนวโน้มในการส่งออกพริกเพิ่มสูงขึ้นโดยพบว่าปี พ.ศ. 2559 มีการส่งออกเฉพาะพริกแห้งในยังประเทศต่างๆทั่วโลกประมาณ 9.1 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 469 ล้านบาท ขณะที่ปี พ.ศ. 2560 ปริมาณการส่งออกขยับเพิ่มขึ้นเป็น 12 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 525 ล้านบาท (ส่วนปฏิบัติการข้อมูลการเกษตร, 2561) ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีพื้นที่ปลูกพริกค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ปลูกพืชผักทั้งหมด แต่ผลผลิตที่ได้กลับไม่สอดคล้องกับปริมาณพื้นที่การเพาะปลูก เนื่องจากพริกเองก็มีโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ โดยโรคที่สำคัญของพริกคือโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotricum gloeosporioides* Penz. (Ahiladevi and Prakasam (2013)) จากคู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชของกลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้ใช้วัตดูอันตรายที่มีสารออกฤทธิ์ของ (azoxystrobin 25% W/V SC) อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตรและใช้น้ำปริมาตร 80 ลิตรต่อไร่ พ่นแปลงพริกเพื่อกำจัดโรคดังกล่าว (อรพรรณ, 2552) ซึ่งจัดเป็นสารกำจัดโรคพืชประเภทดูดีซึม สามารถกำจัดโรคแอนแทรคโนสและโรคราน้ำค้างได้ มีชื่อตามระบบ IUPAC ว่า Methyl (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl]oxy]phenyl-3-methoxyacrylate (รายละเอียดดังตารางที่ 1) องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จัดให้สารนี้อยู่

ใน Class III เนื่องจากมีความเป็นอันตรายน้อย โดยมีค่า LD50 ที่ประเมินจากการกินของหนูมากกว่า 5,000 mg/kg (FAO (2008))

### ตารางที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับสาร

สูตรโครงสร้าง	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	เลข CAS
	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	403.4 g/mol	131860-33-8

แต่อย่างไรก็ตามวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ใช้เพื่อป้องกัน กำจัด หรือควบคุมโรคและแมลงของพืชผัก นั้นอาจก่อให้เกิดโทษและส่งผลเสียร้ายแรงต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้หากมีการใช้งานอย่างไม่ถูกต้องเหมาะสม ดังนั้นประเทศต่างๆทั่วโลกที่นำเข้าผลผลิตทางการเกษตรจึงตระหนักในปัญหานี้ และได้กำหนดมาตรการที่เข้มงวด ในการอนุญาตให้นำเข้าเฉพาะสินค้าทางการเกษตรที่มีปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limits; MRLs) อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดเท่านั้น ซึ่งค่าดังกล่าวนี้ประเมินได้จากการศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างชนิด นั้นๆ (Residue trial) ในพืชผักแต่ละประเภท โดยหากปราศจากข้อมูลชุดดังกล่าว ประเทศคู่ค้าจะกำหนดค่า Export default limit สำหรับสารพิษตกค้างทุกชนิดในสินค้าทางการเกษตรทุกประเภทให้มีค่าอยู่ที่ 0.01 mg/kg ซึ่งถือเป็นมาตรการกีดกันทางการค้าว่าด้วยการจำกัดปริมาณสารพิษตกค้าง และนับเป็นอุปสรรคสำคัญในการ ส่งออกสินค้าทางการเกษตรของไทย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการทดลองหาค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของในพริก โดยสกัดตัวอย่างพริกด้วย วิธี QuEChERS: EN 15662 (Anastassiades et al. (2003)) และวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Mukherjee et al. (2015)) เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปแนะนำเกษตรกรผู้ปลูกพริกในการใช้สารให้ถูกต้อง และเหมาะสม และนำไปประกอบการพิจารณากำหนดค่า MRLs สำหรับใช้ต่อรองกับประเทศคู่ค้าในการส่งออก พริกเพื่อประโยชน์สูงสุดทางการค้าของประเทศไทยในอนาคตต่อไป

## 7. วิธีดำเนินการ

### 7.1 อุปกรณ์

- 1) เครื่องพ่นสารแบบสะพายหลัง (knapsack sprayer) และชุดป้องกันอันตรายจากละอองสาร
- 2) อุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่าง เช่น มีดสแตนเลส เขียงพลาสติก และโถปั่นตัวอย่าง (Micronizer)
- 3) อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องแก้วต่างๆ เครื่องชั่งดิจิทัลชนิด 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo AT261, SN; 115323175) และเครื่องมือตรวจวิเคราะห์สารชนิด Liquid chromatography-mass spectrometer (Agilent technologies 6410 Series triple quadrupole, LC-MS/MS)

## 7.2 สารเคมี

- 1) ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ชื่อการค้า อมิस्ता (25% W/V SC azoxystrobin, batch No. BPO6F134B, Syngenta Co., Ltd.)
- 2) สารมาตรฐานปฐมภูมิ (Primary standard of azoxystrobin, Dr. Ehrenstorfer 99.23 % Lot No. G128076, Exp. date 23 September 2021)
- 3) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเช่น acetonitrile (ACN), sodium chloride (NaCl), primary secondary amine (PSA), magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ), disodium hydrogencitrate sesquihydrate ( $Na_2C_3H_5O(CO_2)_3 \cdot 1.5H_2O$ ), trisodium citrate dihydrate ( $Na_3C_3H_5O(CO_2)_3 \cdot 2H_2O$ ), graphite carbon black (GCB), ammonium formate ( $NH_4HCO_2$ ) และ formic acid ( $HCO_2H$ )

## 7.3 วิธีการ

### 1) การทำแปลงทดลอง

1.1) สำรวจพื้นที่ปลูกพริกในจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง นครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรีเพื่อเลือกแปลงทดลองจำนวน 2 แปลง (ต้องมีระยะทางห่างกันมากกว่า 30 กิโลเมตร หรือมีฤดูกาลเพาะปลูกแตกต่างกัน) โดยพันธุ์พริกที่ใช้ในการทดลองคือ ชูเปเปอร์ฮอต พริกเกษตร พริกอัมพวา และพริกหอมสุพรรณ

1.2) วางแผนการทดลองแบบ supervised trial ตาม Codex Guideline ประกอบด้วย 2 แปลงทดลองย่อย ได้แก่ แปลงที่พ่นวัตถุอันตราย (treated) โดยพ่นสาร 25 % W/V SC ตามคำแนะนำบนฉลากผลิตภัณฑ์ (recommended dose) คือ 10 mL/น้ำ 20 L อัตราใช้น้ำ 80 L/ไร่ พ่นทุก 7 วัน รวม 3 ครั้ง และแปลงควบคุม (control) เป็นแปลงพริกที่ไม่มีการพ่นสารดังกล่าว

1.3) สุ่มเก็บตัวอย่างผลผลิตจากแปลง treated และ control ภายหลังจากการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ระยะเวลาต่างๆคือ 0 (2 ชั่วโมง), 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 และ 17 วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 และวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างในพริกด้วยเครื่อง LC-MS/MS

### 2) การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

#### 2.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

##### 2.1.1) Stock standard solution

ชั่งสารมาตรฐานปฐมภูมิ (AZX) ด้วยเครื่องชั่งดิจิทัลทศนิยม 5 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักประมาณ  $10 \pm 0.01$  mg ใส่ในขวดวัดปริมาตร (class A) ขนาด 10 mL เติมน้ำทำละลาย acetonitrile (PR grade) ประมาณสามส่วนสี่ของปริมาตรขวดเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้

เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยตัวทำละลายข้างต้น โดยความเข้มข้นของสารฯคำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$\text{ความเข้มข้นของ AZX } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{น้ำหนักสารที่ชั่ง (g)} \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร (\%)}}{\text{ปริมาตรสารที่เตรียม (mL)} \times 100} \times 10^6 (\mu\text{g/g}) \dots\dots\dots (1)$$

### 2.1.2) Intermediate standard solution

เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 100  $\mu\text{g/mL}$  จาก stock standard solution โดยใช้ตัวทำละลาย acetonitrile (PR grade) คำนวณหาปริมาตรสารตั้งต้นที่ต้องใช้ได้จากสมการที่ (2)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \dots\dots\dots (2)$$

เมื่อ  $C_1$  = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ( $\mu\text{g/mL}$ )       $V_1$  = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องปิเปตมา (mL)  
 $C_2$  = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม ( $\mu\text{g/mL}$ )       $V_2$  = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (mL)

### 2.1.3) Working standard solution

เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10  $\mu\text{g/mL}$  จาก intermediate standard solution ส่วน calibration standard solution ในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.10  $\mu\text{g/mL}$  ทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการใช้งาน โดยเตรียมจากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/mL}$  โดยใช้ตัวทำละลาย acetonitrile (PR grade)

## 2.2) สภาวะเครื่อง LC-MS/MS

ฉีดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำแล้วปรับอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) A : B และ Mass spectrometer ตามความเหมาะสม เพื่อให้สามารถตรวจวัดสัญญาณสารได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

### 2.2.1) LC-MS/MS

: รายละเอียดของ Column

Column	Brand	Phase	Particle size	Pore size	Length	Internal diameter
	Kinetex	XB-C18	2.6 $\mu\text{m}$	100 $\text{\AA}$	100 mm	2.1 mm

Flow rate : 0.3 mL/min และ Injection volume : 1.0  $\mu\text{L}$

Mobile phase : 5 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>2</sub> : 0.01% HCO<sub>2</sub>H ในน้ำ (สารละลาย A) และ ACN (สารละลาย B)  
อัตราส่วนของ A : B ดังนี้

เวลา (min)	สารละลาย A (%)	สารละลาย B (%)
0	40	60
2	40	60
4	2	98
6	2	98
7	40	60
8	40	60

2.2.2) Mass spectrometer (MS) มีการตั้งสภาวะของ MS รายละเอียดดังนี้

Analyte	Precursor	Product ion	Dwell time	Fragmentor (v)	Collision energy (v)
azoxystrobin	404	372	50	100	15
	404	344	50	100	25
	404	329	50	100	35

Mode: Positive, Gas temperature: 350 °C, Nebulizer: 45 psi, Capillary: 3500 V and Gas flow: 10 L/min

## 2.3) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี QuEChERS EN 15662 โดยการตรวจวัดในตัวอย่างพริก ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

### 2.3.1) การตรวจสอบช่วงและความเป็นเส้นตรงของการวัด (Range/Linearity)

#### 1) การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

มีดีสารละลายมาตรฐานในตัวทำละลาย acetonitrile จำนวน 6 ระดับความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ ได้แก่ 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 และ 0.10  $\mu\text{g/mL}$  ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ (แกน y) พิจารณาเลือกช่วงที่ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยประเมินจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation of coefficient:  $r \geq 0.995$ ) เพื่อประเมินช่วงของการวัดสารด้วยเครื่อง LC-MS/MS

#### 2) การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Linearity)

ทดสอบ fortified samples โดยเติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างพริก (sample blank) ที่ 6 ระดับความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ โดยขยายความเข้มข้นที่ได้จากการทำ working range ในข้อ 1) ออกเป็น 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 และ 0.05 mg/kg สกัดด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารที่ตรวจวัดได้กับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination:  $R^2$ ) โดยเกณฑ์ยอมรับต้องมีค่า  $R^2 \geq 0.990$  เพื่อประเมินความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์สารอะซอกซีในพริก

### 2.3.2) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงคุณภาพ (Limit of detection: LOD)

เป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยทำการ fortified สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างพริก จำนวน 10 ซ้ำ สกัดด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง และ LC-MS/MS ประเมินค่า LOD จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ของความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการทดสอบ accuracy ซึ่ง LOD มีค่าเท่ากับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\text{LOD} = 3 \times \text{SD}$ )

### 2.3.3) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation: LOQ)

ทดสอบ fortified sample จำนวน 10 ซ้ำ สกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีข้างต้น ประเมินค่า LOQ จากค่า SD ของความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการทดสอบ accuracy ซึ่ง LOQ มีค่าเท่ากับสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$ ) และประเมินค่า accuracy และ precision ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

### 2.3.4) ความแม่นยำ (Accuracy)

เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างพริกที่ 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง สูง) คือ 0.01, 0.02 และ 0.05 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ สกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีดังที่กล่าวมาแล้ว

#### 1) ค่าที่แท้จริง (Trueness)

ประเมินค่าความถูกต้องและแม่นยำจากค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสาร (% recovery) ดังสมการที่ (3) โดยเกณฑ์การยอมรับคือตัวอย่างทุกตัวต้องมี % recovery เท่ากับ 70 – 120%



$$\text{เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสาร (\% recovery)} = \frac{C_{\text{Fortified}}}{C_{\text{Addition}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

เมื่อ  $C_{\text{Fortified}}$  = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ ( $\mu\text{g/g}$ )

$C_{\text{Addition}}$  = ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารที่เติมลงในตัวอย่าง ( $\mu\text{g/g}$ )

## 2) ความเที่ยง (Precision)

ประเมินค่าความเที่ยงจากค่า HORRAT ดังสมการที่ (4.1-4.3) โดยตัวอย่างทุกความเข้มข้นที่ทดสอบต้องให้ค่า HORRAT < 2

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD}}{\text{Predicted RSD}} \quad \dots\dots\dots (4.1)$$

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (4.2)$$

$$\text{Predicted RSD} = 0.66 \times 2^{1-0.5 \log C} \quad \dots\dots\dots (4.3)$$

### 2.4) การศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างในผลผลิตพริก

สุ่มเก็บตัวอย่างผลผลิตจากแปลง treated และ control ภายหลังการพ่นสารฯครั้งสุดท้ายที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0 (2 ชั่วโมง), 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 และ 17 วัน จากนั้นนำส่งตัวอย่างเข้าสู่ห้องปฏิบัติการทำการปั่นละเอียดในสถานะไนโตรเจนเหลว และสกัดด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 โดยชั่งตัวอย่าง  $10 \pm 0.01$  g ใน centrifuge tubes ขนาด 50 mL เติม acetonitrile 10 mL เขย่าด้วยมือนาน 1 นาที เติมสารสกัด  $\text{Na}_2\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{CO}_2)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{CO}_2)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 g, NaCl 1 g และ  $\text{MgSO}_4$  4 g เขย่าต่ออีก 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิดสารละลายส่วนใส 5 mL ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 mL ที่บรรจุด้วยสารทำความสะอาด  $\text{MgSO}_4$  750 mg, PSA 125 mg และ GCB 50 mg จากนั้น vortex ต่ออีก 1 นาที แล้วนำไป centrifuge อีกครั้งที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสใส่ใน LC-vial ให้ได้ปริมาตร 1 mL โดยใช้ PTFE syringe filter ขนาด  $0.2 \mu\text{m}$  พร้อมทั้งเติม 5 %  $\text{HCO}_2\text{H}$  10  $\mu\text{L}$  นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

เวลาและสถานที่สถานที่

ระยะเวลา

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 รวมระยะเวลา 3 ปี

## สถานที่ทำแปลงทดลอง

1. อ. เมืองนครปฐม จ. นครปฐม มีนาคม – เมษายน 2560
2. อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี กรกฎาคม – กันยายน 2560
3. อ. เมืองนครปฐม จ. นครปฐม เมษายน – มิถุนายน 2561
4. อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี กรกฎาคม – สิงหาคม 2561
5. อ. เมืองสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี มีนาคม – เมษายน 2562
6. อ. เมืองนครปฐม จ. นครปฐม มีนาคม – เมษายน 2562

## สถานที่ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 8.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยวิธี QuEChERS: EN 15662 ในตัวอย่างพริก ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีผลการทดลองดังนี้

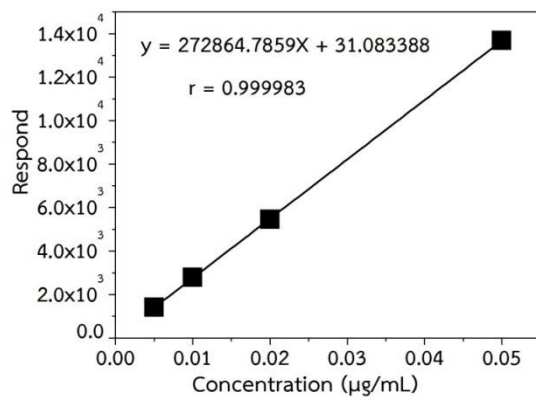
#### 8.1.1) การตรวจสอบช่วงการวัด /ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Range/Linearity)

พิจารณาช่วงของการใช้งานของสารละลายมาตรฐานอะซอกซีสโตรบิน โดยประเมินด้วยสายตา (Visual evaluation) จากความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณที่ตรวจวัดได้กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วงไดนามิก (Dynamic range) ที่ความเข้มข้น 0.001 - 0.10 µg/mL แล้วเลือกเฉพาะช่วงที่ตอบสนองเชิงเส้นตรง พบว่ามี 4 ระดับความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 0.005 - 0.05 µg/mL ที่ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมากที่สุด โดยมีค่า  $r = 0.999983$  (ภาพที่ 1) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ( $r \geq 0.995$ ) แสดงให้เห็นว่าเครื่อง LC-MS/MS มีช่วงของการวัดสารอยู่ในช่วง 0.005 - 0.05 µg/mL

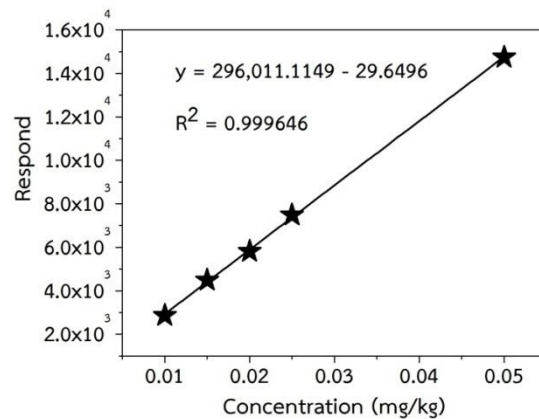
ทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Linearity) โดยตรวจวิเคราะห์ fortified samples ที่ช่วงความเข้มข้นขยายจำนวน 6 ระดับๆละ 3 ซ้ำ คือ 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 และ 0.05 mg/kg หาค่า  $R^2$  จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารในตัวอย่างกับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ พบว่าช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความเป็นเส้นตรงสูงสุดอยู่ที่ 0.01 - 0.05 mg/kg (ภาพที่ 2) โดยมีค่า  $R^2 = 0.999702$  และมีค่าเข้าใกล้ 1 เป็นอย่างมาก แสดงว่าวิธี QuEChERS: EN 15662 มีช่วงของการวัดสารอยู่ในช่วง 0.01 - 0.05 mg/kg

#### 8.1.2) Matrix effect

จากการเปรียบเทียบ slope ของสารมาตรฐานที่เตรียมจากตัวทำละลาย acetonitrile (ACN) ดังภาพที่ 1 กับกราฟของการ fortified sample (Mtrx) ในตัวอย่างพริก ดังภาพที่ 2 พบว่า % ME เท่ากับ 108.5 ( $\% ME = (\text{slope Mtrx}/\text{slope ACN}) \times 100$ ) ซึ่ง slope ของสารมาตรฐานใน matrix กับ slope ของสารมาตรฐานใน acetonitrile ต่างกันไม่เกิน 20 % ถือว่าไม่มี matrix effect จึงเตรียมสารละลายมาตรฐานด้วย acetonitrile เพื่อหาปริมาณในพริกได้



ภาพที่ 1 สัญญาณที่ตรวจวัดได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในตัวทำละลาย ACN ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005 - 0.05 µg /mL



ภาพที่ 2 สัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการ fortified สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างพริก ที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 - 0.05 mg/kg

### 8.1.3) ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection: LOD)

จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายที่สามารถตรวจวัดได้ ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า SD เพื่อประเมินค่า LOD จาก  $3 \times SD$  (แสดงในตารางที่ 6) พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีทดสอบนี้มีค่าประมาณ 0.002 mg/kg จากการตรวจสอบค่า LOD ที่จุดนี้ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณของสารได้ดังนั้นจึงกำหนดความเข้มข้นของ LOD ที่ 0.005 mg/kg ทำการทดสอบตัวอย่างพริก จำนวน 10 ซ้ำ พบว่ามีสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ของทุกตัวอย่าง จึงกำหนดให้ค่า LOD ของวิธีทดสอบนี้มีค่าเท่ากับ 0.005 mg/kg ผลดังตารางที่ 5

### 8.1.4) ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation: LOQ)

ประเมินค่า LOQ จากสิบเท่าของค่า SD ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg (ตารางที่ 6) พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 0.01 mg/kg โดยตัวอย่างทุกตัวให้ค่า % recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

### 8.1.5) ความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบ fortified samples ที่ 3 ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ คือ 0.01 0.02 และ 0.05 mg/kg

### 1) ค่าที่แท้จริง (Trueness)

คำนวณหาค่า % recovery พบว่าวิธีทดสอบนี้ให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนมาของตัวอย่างทุกตัว อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่าการทำซ้ำทุกครั้งของวิธีทดสอบนี้ให้ค่าผลการทดลองใกล้เคียงกันและเข้าใกล้ค่าที่แท้จริง

### 2) ความเที่ยง (Precision)

คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ตรวจพบเฉลี่ย ( $\bar{x}$ ), SD, % RSD เพื่อหาค่า HORRAT ดังตารางที่ 5 พบว่าวิธีทดสอบนี้มีความเที่ยง ซึ่งยืนยันได้จากค่า HORRAT < 2 แสดงให้เห็นว่าการทำซ้ำทุกครั้งของวิธีทดสอบนี้ให้ค่าผลการทดลองใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 5 สัญญาณการตรวจวัด ที่ระดับความเข้มข้น LOD และ LOQ ของในพริก

Conc. (mg/kg)	Respond of fortified samples										Avg.	% RSD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0.05	1,531	1,595	1,561	1,557	1,525	1,534	1,406	1,482	1,474	1,508	1,517	3.78
0.01	2,869	2,964	3,003	3,032	3,065	2,763	2,807	2,675	2,707	2,697	2,858	5.41

ตารางที่ 6 การศึกษาความเที่ยงและความแม่นยำที่ fortified samples ของในพริก (n = 10)

No.	Conc. (mg/kg)	$\bar{x}$ (mg/kg)	Recovery (%)	SD	RSD (%)	C	$1 - 0.5 \log C$	Pre- dicted RSD	HORRAT
1	0.01	$1.06 \times 10^{-2}$	99 -114	$6.00 \times 10^{-4}$	5.41	$1.06 \times 10^{-8}$	4.99	20.95	0.26
2	0.02	$2.19 \times 10^{-2}$	106 -115	$5.00 \times 10^{-4}$	2.45	$2.19 \times 10^{-8}$	4.83	18.77	0.13
3	0.05	$5.61 \times 10^{-2}$	109 -115	$1.10 \times 10^{-3}$	1.87	$5.61 \times 10^{-8}$	4.63	16.29	0.12

เมื่อ C = สัดส่วนความเข้มข้น (fraction concentration)

## 8.2 การทำแปลงทดลอง

ทำแปลงทดลองพริกรวม 6 แปลงทดลอง ในช่วง มีนาคม 2560 – เมษายน 2562 ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี โดยแต่ละแปลงทดลองแบ่งเป็น 2 แปลงทดลองย่อย คือ แปลงที่พ่นสาร 25 % W/V SC ในอัตราแนะนำ 10 mL/น้ำ 20 L โดยใช้น้ำ 80 L/ไร่ พ่นสารทุก 7 วัน รวม 3 ครั้ง และแปลงควบคุมที่ไม่ใช้

สาร หลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายสู่แม่ไก่ตัวอย่างพริกที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 และ 17 มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง พบปริมาณสารพิษตกค้างในแปลงทดลองที่ 1 – 6 แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณสารพิษตกค้างอะซอกซีสไตรบินในตัวอย่างพริกแต่ละแปลงทดลอง

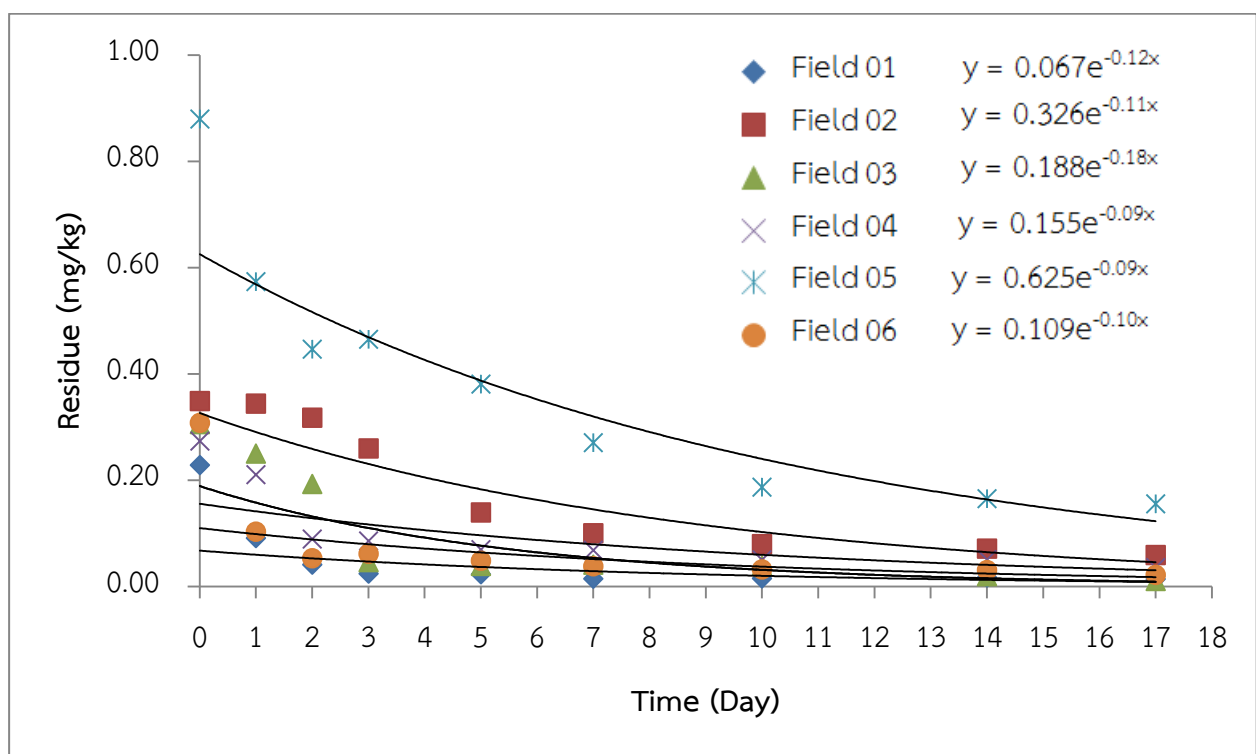
แปลงทดลองที่	สถานที่ปลูกพริก	treated plot (mg/kg) ที่ระยะเวลาต่างๆ (วัน)									control plot
		0	1	2	3	5	7	10	14	17	
1.	อ. เมืองนครปฐม จ. นครปฐม	0.23	0.09	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	ND
2.	อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี	0.35	0.34	0.32	0.26	0.14	0.10	0.08	0.07	0.06	ND
3.	อ. เมืองนครปฐม จ. นครปฐม	0.31	0.25	0.19	0.05	0.04	0.04	0.04	0.02	0.01	ND
4.	อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี	0.27	0.21	0.09	0.09	0.07	0.07	0.05	0.05	0.04	ND
5.	อ. เมืองสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	0.88	0.57	0.45	0.47	0.38	0.27	0.19	0.16	0.16	ND
6.	อ. เมืองนครปฐม จ. นครปฐม	0.31	0.10	0.05	0.06	0.05	0.04	0.03	0.03	0.02	ND

หมายเหตุ: ค่า LOQ (Limit of detection) = 0.01 mg/kg  
 ND < LOD (Limit of quantitation) = 0.005 mg/kg

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารพิษตกค้างในพริกมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่ผ่านไป ดังภาพที่ 3 ทั้งนี้เนื่องจากการการสลายตัวของสารตกค้าง หรืออาจเกิดจากกระบวนการสลายตัวเนื่องจากอิทธิพลของแสงอาทิตย์ อากาศ สิ่งแวดล้อมหรือกิจกรรมภายในผลพริกเอง (FAO (2008)) และถึงแม้ว่าจะเก็บตัวอย่างพริก 2 ชั่วโมง หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย (0 วัน) ก็พบว่าค่าปริมาณการตกค้างของสารอะซอกซีสโตรบินในพริกยังต่ำกว่าค่า MRLs ที่หลายประเทศทั่วโลกได้กำหนดไว้ (ตารางที่ 8) จึงชี้บ่งได้ว่าวัตถุอันตรายทางการเกษตรดังกล่าวที่ใช้เพื่อป้องกันกำจัดโรคในแปลงพริกไม่ก่อให้เกิดการตกค้างในระดับที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค หากมีการใช้งานอย่างถูกวิธี ส่วนแปลงควบคุมไม่พบการตกค้างของสารอะซอกซีสโตรบินในพริกทุกระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 8 ค่า MRLs ของสารอะซอกซีสโตรบินในพริกสด (Chillies MRL datasheet (2550))

Active ingredient	MRLs (mg/kg)								
	Export default	UK	Austria	Belgium	Denmark	Italy	Portugal	Sweden	Norway
azoxystrobin	0.01	2.00	2.00	2.00	2.00	0.05	2.00	2.00	2.00



ภาพที่ 3 ปริมาณสารพิษตกค้างอะซอกซีสโตรบิน ที่ตรวจพบจากแปลงทดลองที่ 1 - 6





## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างอะซอกซีสโตรบินในพริก 6 แปลงทดลอง โดยสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS: EN 15662 และตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบว่าปริมาณสารพิษตกค้างที่ระยะเวลา 0 (2 ชั่วโมง), 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 และ 17 วัน หลังพ่นสารครั้งสุดท้ายสำหรับแปลงทดลองที่ 1 – 6 มีค่าอยู่ในช่วง 0.23 – 0.01, 0.35 – 0.06, 0.31 – 0.01, 0.27 – 0.04, 0.88 – 0.16 และ 0.31 – 0.02 mg/kg ตามลำดับ ส่วนแปลงควบคุมไม่พบการตกค้างของสารดังกล่าวแต่อย่างใด

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) นำข้อมูลที่ได้ไปแนะนำเกษตรกรในการใช้สารอะซอกซีสโตรบินพ่นแปลงพริกได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาสารพิษตกค้างที่ส่งผลกระทบต่อทั้งสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภค

2) นำผลการทดลองที่ได้ไปประกอบการพิจารณากำหนดค่ามาตรฐานสารพิษตกค้างสูงสุดทั้ง Thailand Asean และ CODEX MRLs

## 11. เอกสารอ้างอิง

วรรณภา เสนาดี ปกป้อง ป้อมฤทธิ์ และ ชิตชนก ไชยพร. 2561. พลิกพริก เป็นพริกปลอดภัยด้วยโมเดลพริก.

วารสารเคหการเกษตร ปีที่ 42 ฉบับที่ 2, หน้า 64 - 82.

ส่วนปฏิบัติการข้อมูลการเกษตร. 2561. การนำเข้าและส่งออกพริกแห้ง. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. [จดหมายอิเล็กทรอนิกส์], แหล่งที่มา prcai@oae.go.th โทร 02-5612870 (4 ตุลาคม 2561)

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2552. คู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 128 น.

Ahiladevi, P. and V. Prakasam. 2013. Bioefficacy of Azoxystrobin 25 SC along with bioagents against chilli anthracnose diseases under field conditions. Pest Management in Horticultural Ecosystems 19: 57-62.

Anastassiades, M., S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck. 2003. Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86: 412-431.

Chillies MRL datasheet. 2007. Agri-business systems international (ABSI). [Online], Source

<https://www.nda.agric.za/daDev/sideMenu/foodSafety/doc/Chillies%20MRL%20Dataset.pdf>. (Sited on 3 February 2020).

FAO. 2008. Evaluation of data for acceptable daily intake and acute dietary intake for humans, maximum residue levels and supervised trial median residue values; Azoxystrobin. Food and agriculture organization of the United Nations. [Online], Source [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Report08/Azoxystrobin.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report08/Azoxystrobin.pdf) (Sited on 1 July 2018).

Mukherjee, S., G. K. Das and A. Bhattacharyya. 2015. Analytical method validation and comparison of two extraction techniques for screening of azoxystrobin from widely used crops using LC-MS/MS. *Food Measure* 9: 517-524.