วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของไดฟีโนโคนาโซล (difenoconazole) ในส้มเขียวหวาน เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง

Pesticide residue trials of difenoconazole in mandarin to establish maximum residue limits (MRLs)

พรนภัส วิชานนะณานนท์ ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ พชร เมินหา มติมล แสงสว่าง ศิริพันธ์ สมุทรศรี

Pornnaphat Wichannananon Prachatipat Pongpinyo Pachara Meanha

Matimon Sangsawang Siripan Samutsri

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Difenoconazole is a systematic triazole fungicide that inhibits a variety of disease caused by fungi. Such a compound is broadly used in several fruits, vegetables, cereals and other field crops. In this research, we aim to study degradation of difenoconazole on mandarin under environmental condition and develop analytical protocol to quantify the amount of difenoconazole residue in mandarin by using solid-phase extraction (QuEChERS method EN15662:2008) and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Supervised residue trials of difenoconazole on mandarin were conducted in 5 locations coverage major productions in Thailand. Mandarin samples in each field were divided into two groups including treated and untreated samples with recommended dose rate of difenoconazole, 20 milliliters of 25% EC difenoconazole in 20 liters of water with spray volume 5 liters for each mandarin tree. All treated samples collected at 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 and 30 days after the last application were found the range amount of difenoconazole as 0.21-1.24 mg/kg. While, target analytes could not be observed in untreated samples. These data set suggested that 30 days was a suitable pre-harvest interval (PHI) after the last fungicide treatments. The PHI of these fungicide residue in mandarin samples would signify the importance of harvesting time for agricultural products. Moreover, these data will be submitted to set THAI, ASEAN and CODEX maximum residue limits (MRLs) for further work.

Keywords : difenoconazole, mandarin, residue, pre-harvest interval (PHI), maximum residue limits (MRLs)

บทคัดย่อ

ไดฟีโนโคนาโซลเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม triazole ประเภทดูดซึม ใช้ในการกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราได้อย่างหลากหลายทั้งในไม้ผล ผัก ธัญพืช และอื่นๆ งานวิจัยนี้ ศึกษาการสลายตัวของสารป้องกันกำจัดเชื้อราไดฟีโนโคนาโซลในส้มภายใต้สภาพแวดล้อมและตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างไดฟีโนโคนาโซลโดยใช้การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (วิธี QuEChERS, EN15662:2008) และเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี (LC-MS/MS) ในการทำแปลงทดลองสารพิษตกค้างเพื่อศึกษาการสลายตัวของสารป้องกันกำจัดเชื้อราไดฟีโนโคนาโซลในส้มเขียวนั้น มีทั้งหมด 5 แปลงทดลองในแหล่งเพาะปลูกส้มเขียวหวานของประเทศไทย โดยแต่ละแปลงทดลองแบ่งเป็น 2 แปลงย่อย ได้แก่ แปลงที่ไม่ใช้ไดฟีโนโคนาโซลซึ่งเป็นแปลงควบคุมและแปลงที่ใช้ไดฟีโนโคนาโซลตามคำแนะนำ (ไดฟีโนโคนาโซล 25% EC 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ในอัตราการใช้น้ำ 5 ลิตรต่อต้นส้ม) สุ่มเก็บตัวอย่างส้มที่ 0 3 5 7 10 14 21 และ 30 วันหลังพ่นสารครั้งสุดท้ายตรวจวิเคราะห์พบปริมาณสารพิษตกค้างไดฟีโนโคนาโซลทุกตัวอย่างจากแปลงที่ใช้ไดฟีโนโคนาโซลของแปลงทดลองที่ 1 ถึง 5 โดยอยู่ในช่วง 0.21 ถึง 1.24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างไดฟีโนโคนาโซลในตัวอย่างจากแปลงที่ไม่ใช้ไดฟีโนโคนาโซล นำข้อมูลสารพิษตกค้างที่ได้ไปพิจารณาเพื่อเสนอขอกำหนดระยะเวลาที่ปลอดภัยในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย (pre harvest interval หรือ PHI) ที่ 30 วัน ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร นอกจากนี้ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นส่วนหนึ่งในการพิจารณาเสนอขอกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (maximum residue limits หรือ MRL) สำหรับประเทศไทย อาเซียน และ codex ต่อไป

คำหลัก: ไดฟีโนโคนาโซล ส้มเขียวหวาน สารพิษตกค้าง ระยะเวลาที่ปลอดภัยในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง

คำนำ

ส้มเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญ และบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย มีแหล่งเพาะปลูกกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาค ในการเจริญเติบโตของส้มตั้งแต่ผลิตาอ่อนจนกระทั่งผลแก่เริ่มเก็บเกี่ยวใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ปี ซึ่งการเข้าทำลายของศัตรูพืชจะมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการของส้มตั้งแต่ผลิใบจนถึงระยะผล ศัตรูพืชที่เข้าทำลายส้มจึงมีมากมายหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นโรคพืช แมลง วัชพืช หรือสัตว์ต่างๆ ปัญหาหนึ่งที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลส้มซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ใบส้มร่วงก่อนกำหนด ส่งผลให้ต้นส้มทรุดโทรมและผลผลิตลดลง คือ การระบาดของโรคในกลุ่มเมลาโนสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา ได้แก่ โรคเมลาโนสและโรคกรีสซีเมลาโนส ดัง Figure 1 สำหรับโรคส้มในกลุ่มนี้สามารถพบได้ตลอดปี จึงจำเป็นต้องมีการป้องกันกำจัดการระบาดของโรคกลุ่มนี้ในสวนส้ม (สวนเกษตรผสมผสานนครปฐม, 2563) เมื่อพิจารณาข้อมูลการขึ้นทะเบียนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตร พบว่า ไดฟีโนโคนาโซล (difenoconazole) เป็นสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ได้รับการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายในการป้องกันกำจัดโรคเมลาโนสและโรคกรีสซีเมลาโนสในส้ม (อรพรรณ, 2554)

Difenoconazole เป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม conazole fungicide ซึ่งมีกลุ่ม triazole ($C_2H_3N_3$) เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงใน Figure 2 สารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดนี้เป็นสารประเภทดูดซึม (systematic fungicide) ที่สามารถใช้ป้องกันและกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้หลายชนิด โดยจะเข้าทำการยับยั้งการงอกของสปอร์และขบวนการสร้างเส้นใยของเชื้อรา difenoconazole บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผงคริสตัลสีขาวเบจ มีสูตรโมเลกุล (molecular formula) เป็น $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$ และมวลโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 406.3 (Tomlin, 2006)

Figure 1 (a) Citrus melanose and (b) Greasy melanose on citrus (สวนเกษตรผสมผสาน นครปฐม, 2563)

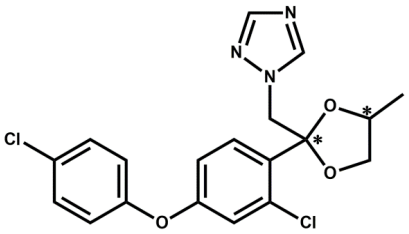

Figure 2 Chemical structure of difenoconazole (Elin, *et al.*, 2012)

การศึกษาการสลายตัวของ difenoconazole ในส้มเขียวหวานนี้ ดำเนินงานวิจัยตามหลักเกณฑ์การทำแปลงทดลองสารพิษตกค้าง (supervised residue trials) และตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามหลักเกณฑ์ของหลักปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการ (Good Laboratory Practice หรือ GLP) เพื่อให้ได้ข้อมูลสารพิษตกค้าง difenoconazole ที่มีคุณภาพและเป็นไปตามมาตรฐานสากล ข้อมูลจากการทดลองสามารถประเมินระยะเวลาที่ปลอดภัยในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย (pre harvest interval หรือ PHI) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร นอกจากนี้ จะนำเสนอข้อมูลที่ได้ไปเสนอขอกำหนดค่า MRLs สำหรับประเทศไทย อาเซียน และ codex ต่อไป โดยค่า MRLs นั้น เป็นค่าที่ใช้ในทางการค้า ทำให้ประเทศไทยสามารถส่งออกสินค้าเกษตรไปยังกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียนและ codex ได้อย่างเสรี

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. การทำแปลงทดลอง
    1) ผลิตภัณฑ์ difenoconazole (Score 250 EC)
    2) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดแก้ว เป็นต้น
    3) เครื่องพ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตรแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง (knapsack sprayer)
    4) ชุดป้องกันสารพิษ
    5) นาฬิกาจับเวลา
    6) เครื่องวัดความเร็วลม
    7) เครื่องวัดและบันทึกอุณหภูมิ (temperature data logger หรือ TDL)
    8) เทอร์โมมิเตอร์
    9) เชือกฟางและหมุดหัวน็อต
2. ห้องปฏิบัติการ
    2.1 สารมาตรฐาน difenoconazole ซึ่งมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.58
    2.2 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น autosampler vial กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดแก้ว ขวดปรับปริมาตร และแท่งแก้วคนสาร เป็นต้น
    2.3 หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
    2.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งและ 5 ตำแหน่ง
    2.5 micropipet 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร
    2.6 syringe filter ชนิด PTFE 0.2 ไมครอน
    2.7 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ homogenizer และ centrifuge
    2.8 สารเคมีต่างๆ ได้แก่ acetonitrile, ammonium formate ($HCOONH_4$), formic acid (HCOOH), magnesium sulphate anhydrous ($MgSO_4$), primary-secondary amine (PSA), sodium chloride (NaCl), sodium citrate dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) และ di-sodium hydrogen citrate esequihydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$)
    2.9 เครื่องตรวจวิเคราะห์ high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS)

วิธีการ

1. การทำแปลงทดลอง
    1.1 สำรวจและเลือกแปลงส้มเพื่อเป็นแปลงทดลอง โดยแต่ละแปลงควรห่างกันอย่างน้อย 30 กม. และพิจารณาเลือกแปลงที่มีความแตกต่างกัน เช่น อายุ ชนิดของดินที่ปลูก และการดูแลรักษา
    1.2 วางแผนการทดลองแบบ supervised trial โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กรรมวิธี (treatment) คือ
กรรมวิธีที่ 1 แปลงที่ไม่ใช้วัตถุมีพิษ difenoconazole เป็นแปลงควบคุม
กรรมวิธีที่ 2 แปลงที่ใช้วัตถุมีพิษ difenoconazole ตามอัตราแนะนำ คือ difenoconazole 25% EC 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ในอัตราการใช้น้ำ 5 ลิตรต่อต้นส้ม (กรมวิชาการเกษตร, 2553)
    1.3 ทำแปลงทดลองจำนวน 5 แปลง มีรายละเอียด ดังนี้
แปลงที่ 1 ทำในพื้นที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี
แปลงที่ 2 ทำในพื้นที่อำเภอนาดี จังหวัดปราจีนบุรี
แปลงที่ 3 ทำในพื้นที่อำเภอนาดี จังหวัดปราจีนบุรี
แปลงที่ 4 ทำในพื้นที่อำเภอศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย

แปลงที่ 5 ทำในพื้นที่อำเภอศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย

1.4 ก่อนการพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole จะ calibrate เครื่องพ่นวัตถุอันตรายและปรับการเดินของผู้พ่นสาร เพื่อให้การพ่นสารมีความแม่นยำและสม่ำเสมอ ในการทำ calibrate เครื่องพ่นวัตถุอันตรายนั้น ทำโดยการพ่นน้ำเป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย ส่วนการปรับการเดินของผู้พ่นวัตถุอันตราย จะจับเวลาการเดิน ซึ่งในการทำ calibrate เครื่องพ่นวัตถุอันตรายและปรับการเดินของผู้พ่นนั้น แต่ละครั้งต้องแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 5 จากการทำการทดลองติดต่อกัน 3 ครั้ง

1.5 การพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole ในแต่ละแปลงทดลอง พ่น 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน ดังนี้

แปลงที่ 1 พ่นในวันที่ 12, 19 และ 26 พฤศจิกายน 2561

แปลงที่ 2 พ่นในวันที่ 4, 11 และ 18 เมษายน 2562

แปลงที่ 3 พ่นในวันที่ 29 ตุลาคม 6 และ 12 พฤศจิกายน 2562

แปลงที่ 4 พ่นในวันที่ 21, 28 ตุลาคม และ 4 พฤศจิกายน 2563

แปลงที่ 5 พ่นในวันที่ 21, 28 ตุลาคม และ 4 พฤศจิกายน 2563

1.6 สุ่มเก็บตัวอย่างหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 0 3 5 7 10 14 21 และ 30 (แปลงที่ 4 และ 5) วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ซึ่งแต่ตัวอย่างจะสุ่มเก็บอย่างน้อย 2 กิโลกรัม วันละ 2 ซ้ำ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงควบคุมและแปลงที่ใช้วัตถุมีพิษ difenoconazole ตามลำดับ

1.7 หลังจากสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงทดลอง ทำการบรรจุตัวอย่างใส่ลังโฟมที่มีน้ำแข็ง พร้อมติดตามอุณหภูมิขณะขนส่งตัวอย่างด้วยเครื่องวัดและบันทึกอุณหภูมิ (temperature data logger หรือ TDL) เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารพิษตกค้างระหว่างการขนส่งตัวอย่างจากแปลงทดลองกลับห้องปฏิบัติการ

2. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole

2.1 การเตรียมตัวอย่าง ทำโดยใส่ไนโตรเจนเหลวในตัวอย่างส้ม แล้วบดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง และเก็บที่อุณหภูมิ -20±5ºC

2.2 วิธีวิเคราะห์ (QuEChERS Method, EN 15662:2008) สุ่มชั่งตัวอย่างส้ม 10 กรัมในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร สกัดด้วย acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติม $MgSO_4$ 4 กรัม NaCl 1 กรัม $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 1 กรัม และ $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ 0.5 กรัม แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี $MgSO_4$ 750 มิลลิกรัม PSA 125 มิลลิกรัม และ C18 50 มิลลิกรัม เขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วกรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter ใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ได้ใส่ autosampler vial ไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ด้วยเครื่อง LC/MS-MS

2.3 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS: Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS-MS มีรายละเอียด ดังนี้

<u>High performance liquid chromatograph</u>

Column:	Phenomenex Kinetex^{TM} 1.7 µm XB-C18 100 Å ขนาด 100 x 2.1 mm
Mobile phase:	A: สารละลาย 5 mM $HCOONH_4$ และ 0.1% HCOOH ในน้ำ
	B: acetonitrile
Flow rate:	0.4 mL/min
Column oven control temperature:	40ºC
Injection volume:	2 µL

Gradient program:	Time	A (%)	B (%)
	0.0	80	20
	1.0	80	20
	2.0	50	50
	3.0	35	65
	6.0	35	65
	7.0	50	50
	8.0	80	20
	9.0	80	20

Mass spectrometer

Ionization mode:	electrospray ionization in positive mode
Gas temperature:	325°C
Gas flow:	10 L/min
Nebulizer:	45 psi
Sheath Gas Heater:	400°C
Sheath Gas Flow:	10
Capillary:	3,500 V
MS/MS scan parameter:	multi reaction monitoring (MRM)

	Precursor ion	Product ion	Frag (V)	CE (V)
Difenoconazole	406.1	291	80	40
	406.1	251	80	40
	406.1	188	80	60

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน difenoconazole ด้วย matrix blank ที่ 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน difenoconazole (แกน x) กับ peak area (แกน y) ซึ่งมีค่า correlation ของ linear regression (r) ไม่น้อยกว่า 0.995

2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้ม ทดสอบโดย spiked samples ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.1, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ระยะเวลา

ตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2564

สถานที่ทำการทดลอง

พื้นที่เพาะปลูกส้มเขียวหวานในจังหวัดปทุมธานี ปราจีนบุรี และสุโขทัย และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวาน แบ่งผลการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ ผลการทดลองในแปลงทดลองและในห้องปฏิบัติการ มีรายละเอียด ดังนี้

1. แปลงทดลอง

การพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole ในแปลงทดลองทั้ง 5 แปลง แปลงละ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการพ่นสาร ซึ่งเป็นการประเมินปริมาณวัตถุมีพิษ difenoconazole ที่ลงแปลงทดลองด้วยอัตราการใช้ difenoconazole 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ในอัตราการใช้น้ำ 5 ลิตรต่อต้น คิดเป็นร้อยละ 100 ในการพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole ทั้ง 5 แปลงทดลองนั้น พบว่า ประสิทธิภาพของการพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole อยู่ในช่วงร้อยละ 99-102 ของปริมาณวัตถุมีพิษ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Efficiency of the difenoconazole treatment in mandarin fields

Field trial number	Treatment efficiency (%)		
	1	2	3
1	102	101	100
2	100	100	100
3	100	100	99
4	101	101	101
5	100	100	100

2. ห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole ด้วยเครื่อง LC/MS-MS

การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole ด้วยเครื่อง LC/MS-MS แสดงโทเทิลไอออนโครมาโตแกรม (total ion chromatogram หรือ TIC) ดัง Figure 3

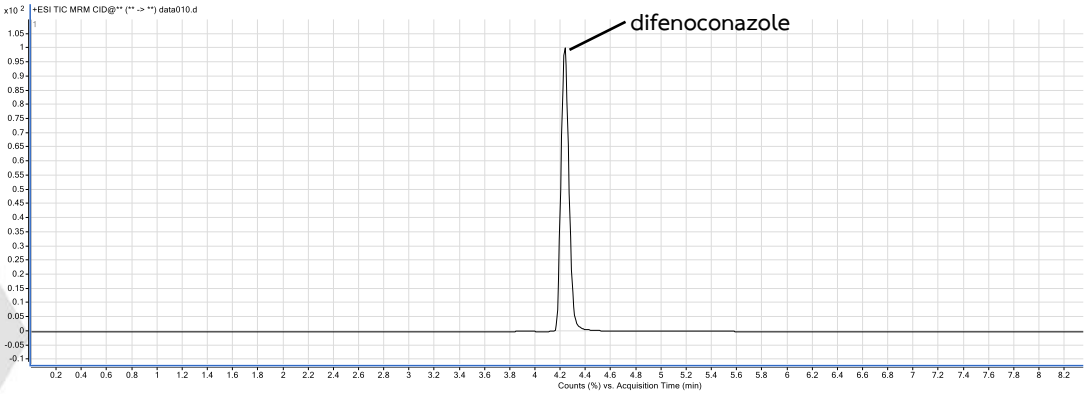

Figure 3 Total ion chromatogram (TIC) of difenoconazole residue

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้ม

ก่อนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในตัวอย่างส้มจากแปลงทดลอง ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation หรือ MV) โดยทำที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.1, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ร้อยละการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 74-115 และค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วงร้อยละ 4-16 ดังแสดงใน Table 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 และ ร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 20 (European commission directorate general for health and food safety, 2017) การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มนี้ มีขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limited of quantification หรือ LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ในการสกัดตัวอย่างจากแปลงทดลอง มีการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ในชุดของการทดสอบตัวอย่าง (concurrent recovery หรือ QC) พบว่า ร้อยละการกลับคืนในการสกัดตัวอย่างจากแปลงทดลองอยู่ในช่วงร้อยละ 71-105 และค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 8-11

Table 2 Method validation and concurrent recovery results of difenoconazole residue in mandarin determination

Experiment	Fortified concentration ($mg \cdot kg^{-1}$)	Recovery (%)	Average of recovery (%)	RSD (%)
MV	0.01	105, 81, 74, 76, 110, 113, 115, 103, 91, 85	95	16
	0.1	96, 95, 95, 88, 84, 99	93	6
	1.0	103, 100, 97, 89, 89, 88	94	7
	2.0	102, 96, 101, 94, 92, 96	97	4
QC	0.01	104, 99, 93, 96, 78, 96, 98, 89, 103, 105	96	8
	0.1	83, 80, 90, 92, 96, 96, 80, 83, 73, 81	85	9
	1.0	86, 86, 99, 97, 99, 99, 82, 93, 89, 89	92	7
	2.0	99, 98, 71, 81, 96, 97, 91, 90	90	11

2.3 การศึกษาปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในตัวอย่างส้มจากแปลงทดลอง

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในตัวอย่างส้มจากแปลงทดลอง พบว่าทุกตัวอย่างจากแปลงควบคุมหรือแปลงทดลองที่ไม่ใช้วัตถุมีพิษ difenoconazole พบปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของวิธีทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง และตัวอย่างจากแปลงทดลองที่ใช้วัตถุมีพิษ difenoconazole ตามอัตราแนะนำในส้ม พบปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 0, 3, 5, 7, 10, 14, และ 21 วัน ในแปลงที่ 1, 2 และ 3 ที่ 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 และ 30 วัน ในแปลงที่ 4 และ 5 ดังแสดงใน Table 3 ที่ 0 วัน พบสารตกค้างเฉลี่ยจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากแปลงทดลอง 2 ซ้ำต่อวัน อยู่ในช่วง 0.76 ถึง 1.23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีแนวโน้มลดลง โดยที่ 21 วัน พบสารตกค้างอยู่ในช่วง 0.21 ถึง 1.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และที่ 30 วัน ในแปลงที่ 4 และ 5 พบสารตกค้าง อยู่ในช่วง 0.21 ถึง 0.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงสังเกตได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้ม กับจำนวนวันหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายเป็นความสัมพันธ์แบบ non-linear ดังแสดงใน Figure 4 ซึ่งเกิดจากสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้ และนอกจากนี้ พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นและอัตราการสลายของ difenoconazole ในแต่ละแปลงทดลองแตกต่างกัน อาจเป็นผลจากสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น การได้รับแสง ความร้อน ลม และความชื้น เป็นต้น (Min, *et al.*, 2016)

Table 3 Amount of difenoconazole residue in treated mandarin sample from the field trails

Days after last application (days)	Amount of difenoconazole residue (mg•kg^{-1})				
	Trial 1	Trial 2	Trial 3	Trial 4	Trial 5
0	0.96	1.23	1.24	0.71	0.76
3	0.44	1.15	1.18	0.59	0.73
5	0.50	0.78	1.36	0.64	0.67
7	0.42	0.60	1.45	0.48	0.60
10	0.42	0.39	1.07	0.46	0.67
14	0.25	0.34	1.11	0.44	0.48
21	0.21	0.23	1.11	0.41	0.41
30	-	-	-	0.21	0.32

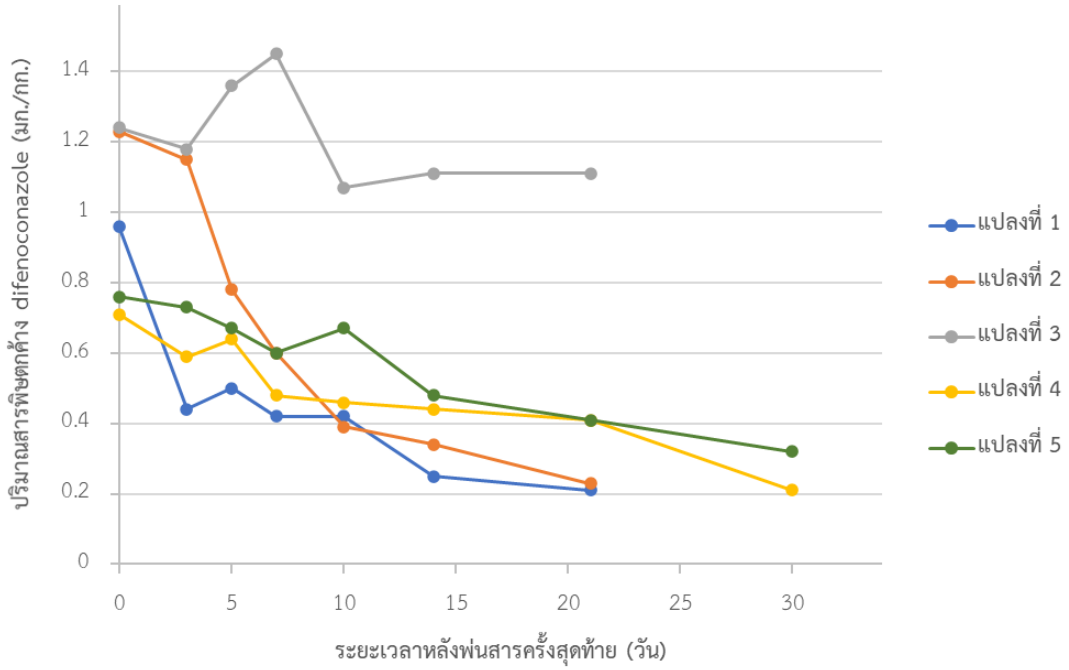

Figure 4 Degradation behavior of difenoconazole residue in mandarin from field trail 1, 2, 3, 4 and 5

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวานกับจำนวนวันหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายใน Figure 4 พบว่าการสลายตัวของ difenoconazole ในแปลงที่ 3 นั้น ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ที่ 21 วันหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายไม่ลดลง ดังนั้น ในการกำหนดระยะเวลาที่ปลอดภัยในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังการใช้สารครั้งสุดท้าย (pre harvest interval หรือ PHI) จึงนำข้อมูลจากการทดลองในแปลงที่ 1, 2, 4 และ 5 มาพิจารณาเป็นหลัก โดยสร้างเส้นแนวโน้มในนำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวานกับจำนวนวันหลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ดัง Figure 5 พบว่ามีการสลายตัวแบบ exponential โดยการสลายตัวเริ่มต้นเป็นไปอย่างรวดเร็วและค่อยๆช้าลงเมื่อระยะเวลานานขึ้น มีค่า coefficient of determination (R^2) และสมการความสัมพันธ์ ดัง Table 4 นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่า MRL ของประเทศต่างๆ พบว่าประเทศจีนและฮ่องกงมีการกำหนดค่า MRL ของ difenoconazole ใน mandarin อยู่ที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จึงลากเส้นกราฟขนานที่ปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่า MRL ของ difenoconazole ใน mandarin ของประเทศจีนและฮ่องกง กับแกน x พบว่าจะตรงกับระยะเวลาหลังพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ มากกว่า 30 วัน ซึ่งจากการทดลองมีการสุ่มเก็บตัวอย่างหลังพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 30 วัน จึงนำปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole หลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 30 วันของทั้ง 2 แปลงไปประเมินความเสี่ยงจากการบริโภค (risk assessment for dietary intake) โดยการพิจารณาปริมาณสารที่ได้รับระยะยาวและระยะสั้น (long-term dietary intake และ short-term dietary intake) พบว่า มีความปลอดภัยในการบริโภคทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) และแบบเรื้อรัง (chronic) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016) ดังนั้น จึงขอเสนอ PHI ของ difenoconazole ในส้มเขียวหวานที่ 30 วัน

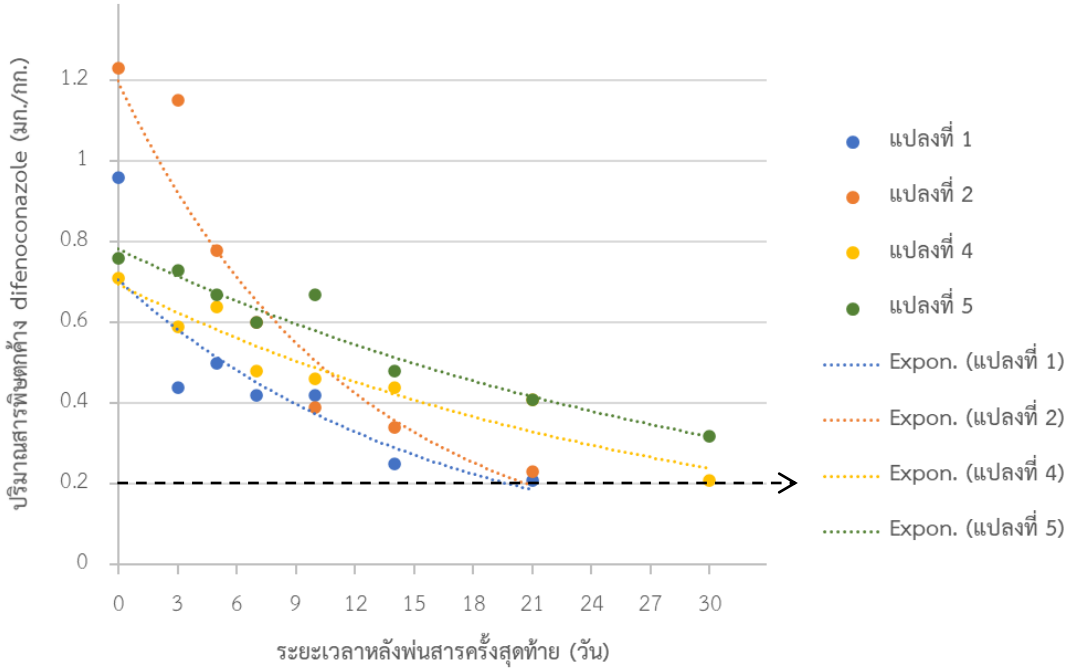

Figure 5 Trend of difenoconazole residue degradation in mandarin from field trail 1, 2, 4 and 5

Table 4 coefficient of determination (R^2) and equation of trendline from studying difenoconazole residue degradation in mandarin from field trail 1, 2, 4 and 5

แปลงที่	coefficient of determination (R^2)	equation of trendline
1	0.7787	$y = 0.7067e^{-0.063x}$
2	0.9385	$y = 1.1981e^{-0.086x}$
4	0.9010	$y = 0.6956e^{-0.036x}$
5	0.9367	$y = 0.782e^{-0.03x}$

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

การพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole ในแปลงทดลองทั้งสองสามารถประเมินปริมาณวัตถุมีพิษ difenoconazole ที่ลงแปลงทดลองได้เท่ากับร้อยละ 99 - 102

การวิจัยปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวาน โดยพ่นวัตถุมีพิษ difenoconazole ตามอัตราแนะนำ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้ม กับจำนวนวันหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายเป็นความสัมพันธ์แบบ non-linear โดยการสลายตัวเริ่มต้นเป็นไปอย่างรวดเร็วและค่อยๆช้าลงเมื่อระยะเวลานานขึ้น สารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวานจากแปลงทดลองที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.25 ถึง 0.96, 0.34 ถึง 1.23, 1.07 ถึง 1.11, 0.21 ถึง 0.71 และ 0.32 ถึง 0.76 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวานจากแปลงทดลอง มีร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 73 – 105

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการมีวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง difenoconazole ในส้มเขียวหวานที่ถูกต้องและแม่นยำ
2. การกำหนดระยะเวลาที่ปลอดภัยในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังการใช้ครั้งสุดท้าย (pre harvest interval หรือ PHI) สร้างความมั่นใจถึงความปลอดภัยในการบริโภคให้แก่ประชาชน
3. การส่งข้อมูลสารพิษตกค้าง เพื่อเสนอขอกำหนดค่า MRL สำหรับประเทศไทย อาเซียน และ codex

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2553. *คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืชปี 2553*. เอกสารวิชาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 303 หน้า

สวนเกษตรผสมผสาน นครปฐม. *โรคเมลาโนส*. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.kasetkawna.com/article/154/โรคเมลาโนส (14 เมษายน 2563).

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2554. *คู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed. *FAO Plant Production and Protection Paper 225*. 3rd ed. 286 pages

Tomlin, C. D.S. (Eds.). 2006. *The pesticide manual: A World Compendium*. 14th ed. Hampshire, UK: British Crop Production Council.

Elin M. U., Candice N. M., Michael R. G., William T. F. 2012. Chiral pesticides: identification, description, and environmental implications. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 217, 1-74.

European commission directorate general for health and food safety. (2017) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. *Sante*, 11813, 1-42.

Min H., Chunhong J., Ercheng Z., Li C., Pingzhong Y. Junjie J., Yongquan Z. 2016. Concentrations and dissipation of difenoconazole and fluxapyroxad residues in apples and soil, determined by ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*. 23, 5618–5626

QuEChERS EN 15662. 2008. *Food of Plant Origin-Determination of Pesticide Residue Using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE-QuEChERS method*.