

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารคลอไพริฟอสตกค้างในพริกแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค  
สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Development of a Rapid Method for Chlorpyrifos Residue Determination in Chili using Near Infrared  
Spectroscopy

พรเทพ ดวงสุวรรณ<sup>1</sup> เอลียาห์ เลิศกุล<sup>1</sup> นิโบล โกมลสิงห์<sup>1</sup> ปราโมทย์ คูวิจิตรจารู<sup>1</sup> บุศรากรณ์ มหาโยธี<sup>1</sup>  
Pontalate Duangsuwan<sup>1</sup>, Aleeya Lerdkuson<sup>1</sup>, Nilobon Komonsing<sup>1</sup>, Pramote Khuwijitjaru, Busarakorn Mahayothee<sup>1</sup>

Abstract

This research was aimed to study the feasibility of near infrared spectroscopy (NIRs) technique for determination of chlorpyrifos residue in chili. A total of 102 organic chili samples cv. Chinda were prepared by homogenizing and then adding standard chlorpyrifos at the concentration range of 0.02-250 ppm. Determination of chlorpyrifos residue in sample was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Spectral acquisition were measured from chili paste with reflectance mode, acetonitrile extracted solution with transmittance mode and dry extract system for near infrared (DESIR) technique of extracted solution with transmittance mode, in the wavelength of 800-2500 nm. It was found that the calibration model built from acetonitrile extracted solution gave the best performance with  $R^2 = 0.9476$ , RMSECV = 12.8 ppm, RPD = 4.37 and bias = -0.434, while the calibration model built from chili paste spectra gave  $R^2 = 0.9439$ , RMSECV = 13.1 ppm, RPD = 4.22 and the calibration model of DESIR gave the worst performance with  $R^2 = 0.7240$ , RMSECV = 21.9 ppm, RPD = 1.9. When consider from  $R^2$  and RPD, NIRs was able to determine the chlorpyrifos residue in chili by measuring spectra from paste and acetonitrile extracted solution samples. However, it was found that the percentage error of the predicted values compared to the true values was very high especially for the samples with chlorpyrifos concentration less than 100 ppm. Therefore, more samples should be taken to build the new model.

**Keywords:** insecticide residue, rapid analysis, chili

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรวจสอบสารคลอไพริฟอสตกค้างในพริกแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near infrared spectroscopy, NIRs) โดยศึกษาในตัวอย่างพริกอินทรีย์พันธุ์จินดา จำนวน 102 ตัวอย่าง โดยเติมสารคลอไพริฟอสลงในตัวอย่างปั่นละเอียดให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02-250 ppm วิเคราะห์ปริมาณคลอไพริฟอสในตัวอย่างด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค NIRs ที่สร้างสมการที่วัดสเปกตรัมจากตัวอย่างปั่นละเอียดวัดในรูปแบบสะท้อนกลับ สารสกัดที่ได้จากการสกัดพริกปั่นละเอียดด้วยอะซิโตนไทรโวลต์ในรูปแบบส่องผ่านแล้วสะท้อนกลับ และการใช้เทคนิค dry extract system for near infrared (DESIR) กับสารสกัดดังกล่าววัดในรูปแบบส่องผ่าน ใช้ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าการสร้างสมการจากสเปกตรัมที่วัดจากสารสกัดให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) สูงที่สุดที่ 0.9476 RMSECV 12.8 ppm RPD 4.37 และค่าความเอนเอียง(bias) -0.434 ในขณะที่สมการที่สร้างจากพริกปั่นละเอียดจะให้  $R^2$  0.9439 RMSECV 13.1 ppm และ RPD 4.22 สมการที่สร้างจากสเปกตรัมของเทคนิค DESIR ของสารสกัดจะให้  $R^2$  0.7240 RMSECV 21.9 ppm และ RPD 1.9 เมื่อพิจารณาจากค่า  $R^2$  และ RPD พบว่าเทคนิค NIRs มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการวิเคราะห์สารคลอไพริฟอสตกค้างในพริกโดยวัดสเปกตรัมจากตัวอย่างพริกปั่นละเอียดและตัวอย่างปั่นสารที่สกัดด้วยอะซิโตนไทรโวลต์ อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่าร้อยละของความผิดพลาดของค่าที่ได้จากการทำนายด้วย NIRs กับค่าจริง พบว่ามีความผิดพลาดสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆเพื่อใช้ในการสร้างสมการทำนาย

**คำสำคัญ:** ยาฆ่าแมลงตกค้าง การวิเคราะห์แบบรวดเร็ว พริก

<sup>1</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

<sup>1</sup>Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000

**คำนำ**

จากผลการสุ่มตรวจยาฆ่าแมลงตกค้างในผักของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืชพบว่าตัวอย่างพริกที่สุ่มมาทั้งหมดมีการปนเปื้อนสารพิษตกค้าง โดยมีการตกค้างของยาฆ่าแมลงเกินที่กฎหมายกำหนดถึงร้อยละ 12.5 โดยสารคลอไพริฟอสเป็นหนึ่งในสารที่พบการตกค้างมากในพริกสด (Thai-PAN, 2558)

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบยาฆ่าแมลงตกค้างในพริกในปัจจุบันมีข้อจำกัดคือ มีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และทำลายตัวอย่างจึงไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ 100% เทคนิค NIRs จึงมีความน่าสนใจในการนำมาวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในพริกเพราะเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและไม่ทำลายตัวอย่างหรือมีการเตรียมตัวอย่างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIRs ในการติดตามปริมาณคลอไพริฟอสตกค้างในพริกจินดา

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**1 ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง**

พริกอินทรี ( *Capsicum frutescens* Linn.) พันธุ์จินดา เลือกซื้อจากห้างสรรพสินค้าจำนวน 79 ตัวอย่าง และซื้อพริกที่คาดว่ามีการตกค้างของยาฆ่าแมลงที่ตลาดปฐมมงคล จังหวัดนครปฐมจำนวน 23 ตัวอย่าง เลือกใช้เฉพาะพริกที่มีสีเขียวและไม่มีตำหนิ นำตัวอย่างมาปั่นละเอียดแล้วชั่งตัวอย่าง 15 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 ml จากนั้นเติมสารมาตรฐานคลอไพริฟอสลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้นต่างๆตามที่ต้องการ (0.02-250 ppm) เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที ตัวอย่างที่ผสมกับสารมาตรฐานคลอไพริฟอสเรียบร้อยแล้ว เรียกว่า “paste” จากนั้น “paste” จะถูกนำไปสกัดโดยใช้วิธี QuEChERS ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lehotay (2007) เติมอะซิโตนไทรโอล 15 ml เติม MgSO<sub>4</sub> anh. 6±0.3 g และ NaOAc 2.5±0.2 g แล้วเขย่าให้เข้ากัน 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลายใช้เวลา 1 นาที ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ได้สารสกัดสีเขียวใสลอยอยู่ด้านบน สารสกัดนี้เรียกว่า “สารสกัด ชั้นที่ 2” ดูดสารสกัดส่วนนี้มา 5 ml ใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงขนาด 15 ml เพื่อทำให้บริสุทธิ์โดยเติม MgSO<sub>4</sub> anh. 0.75±0.15 g, PSA 2.5±0.05 g และ GCB 0.1±0.02 g เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลายเป็นเวลา 1 นาที ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ดูดสารสกัดส่วนใสมา 3.5 ml ใส่ลงในหลอดปรับปริมาตร เติมโทลูอีนลงไป 0.5 ml จากนั้นเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อระเหยอะซิโตนไทรโอลออก เป่าระเหยจนเหลือปริมาตรสารสกัด 0.5 ml จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 3.5 ml ด้วยโทลูอีน ได้สารสกัดสุดท้าย เรียกสารสกัดส่วนนี้ว่า “สารสกัด ชั้นที่ 3” สารสกัด 1 ml จะถูกนำไปกรองผ่าน 0.45 µm ของไนลอนฟิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ค่าทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี สารสกัดที่เหลืออยู่ของทั้งสองขั้นตอนจะถูกแบ่งมาเตรียมการวัดในระบบ NIRs ด้วยเทคนิค DESIR โดยนำสารสกัด 1 ml ของในแต่ละขั้นตอนมาหยดลงบนกระดาษกรองไมโครไฟเบอร์ชนิดใยแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 37 mm แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้หมด ได้เป็น “DESIR ชั้นที่ 2” และ “DESIR ชั้นที่ 3”

**2 การวัดในระบบของสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้**

นำตัวอย่าง “paste” “สารสกัดชั้นที่ 2” “สารสกัดชั้นที่ 3” “DESIR ชั้นที่ 2” และ “DESIR ชั้นที่ 3” มาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ FT-NIR รุ่น MPA (บริษัท Bruker Hong Kong Limited) ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 nm ระบบการวัดในรูปแบบต่างๆแสดงใน Figure 1 จากนั้นเส้นสเปกตรัมและค่าทางเคมีจะถูกนำไปสร้างสมการทำนายและทวนสอบสมการด้วย cross validation โดยใช้โปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2.139.1294

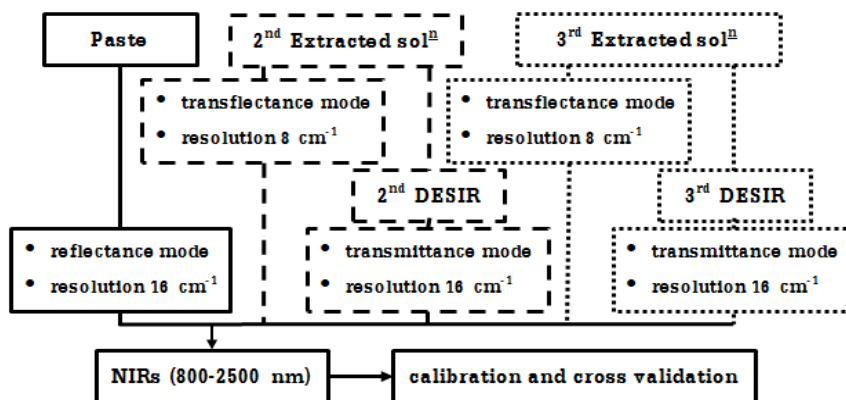


Figure 1 Flowchart of NIRs measurement.

#### 4 ระบบการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

วัดปริมาณคลอไพริฟอสตกค้างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี Shimadzu GCMS-QP2010Ultra, Ionization method of EI ใช้คอลัมน์ Agilent DB-5ms ขนาด 0.25 mm x 30 m ปริมาตรฉีด 2  $\mu$ L ในรูปแบบฉีดเข้าทั้งหมด อุณหภูมิฉีดเข้า 250°C ระบบการตั้งค่าอุณหภูมิของตู้คอลัมน์เป็น 100°C เป็นเวลา 1.865 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 30°C ต่อนาทีเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 175°C จึงเพิ่มอัตราเป็น 6.5°C ต่อนาที จนอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 210°C แล้วคงที่ไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 20°C ต่อนาทีจนอุณหภูมิสูงถึง 280°C คงที่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ตั้งอุณหภูมิของแมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ 230°C เวลาในการกำจัดตัวทำลาย 2.8 นาที

#### ผล

เส้นสเปกตรัมที่วัดจาก paste และสารสกัดขั้นที่ 2 แสดงใน Figure 2 ซึ่งสังเกตได้ว่าในภาพ 2A สเปกตรัมมีลักษณะที่คึกกว้างและมีการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมตามแนวแกน y (baseline shift) และยังมีลักษณะของเส้นสเปกตรัมปากแตร (tangent) แต่สเปกตรัมของสารสกัดขั้นที่ 2 (Figure 2B) นั้นไม่พบพิกัดที่ตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำและพีคปากแตร จากการสร้างสมการทำนายที่ได้จากเส้นสเปกตรัมที่วัดจากการเตรียมตัวอย่างทั้ง 5 แบบ แสดงค่าทางสถิติใน Table 1 พบว่าสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบที่ให้ค่า R<sup>2</sup> และ RPD สูงที่สุดได้แก่สมการที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่วัดสารสกัดขั้นที่ 2 และรองลงมาจะเป็นสมการที่สร้างจาก paste สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทวนสอบของสารสกัดขั้นที่ 2 ซึ่งให้สมการทำนายที่ดีที่สุดแสดงใน Figure 3 จะเห็นว่าช่วงความเข้มข้นต่ำมีการกระจายออกจากเส้น target มาก

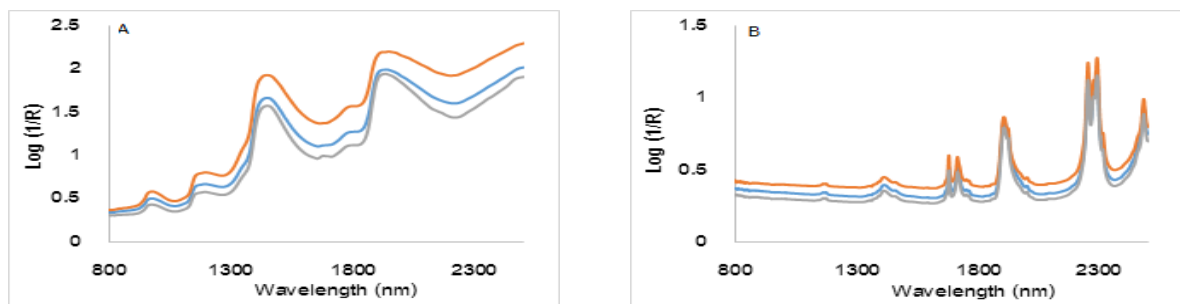


Figure 2 NIR spectra of chili paste (A) and acetonitrile extracted solution (B)

Table 1 Statistic values of calibration and validation models that were built from different modes of spectral acquisition

sample	N	Pretreatment	Calibration		Validation			
			R <sup>2</sup>	RMSEE	R <sup>2</sup>	RMSECV	RPD	Bias
paste	93	No	0.9567	11.6	0.9439	13.1	4.22	-0.084
2 <sup>nd</sup> extracted sol <sup>l</sup>	89	MSC	0.9704	10.2	0.9476	12.8	4.37	-0.434
2 <sup>nd</sup> DESIR	92	1 <sup>st</sup> +MSC	0.8032	18.8	0.7240	21.9	1.9	0.245
3 <sup>rd</sup> extracted sol <sup>l</sup>	91	MSC	0.8918	15.8	0.5431	30.8	1.48	0.003
3 <sup>rd</sup> DESIR	93	SNV	0.8858	13.8	0.7834	18.6	2.15	0.604

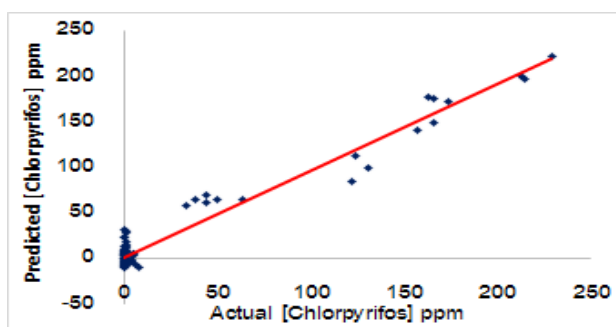


Figure 3 Scattering plot of validation model of acetonitrile extracted solution

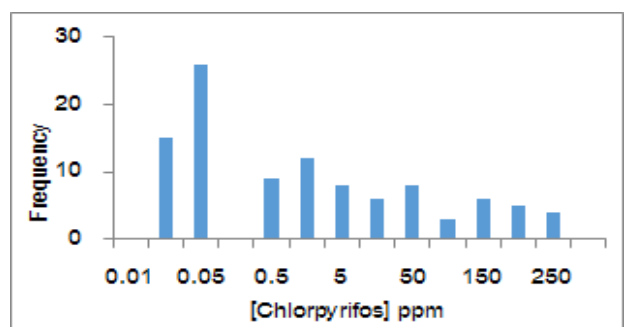


Figure 4 Histogram of chlorpyrifos concentrations that were used in this study

### วิจารณ์ผล

จาก Figure 2 ตัวอย่าง paste เป็นตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ซึ่งน้ำเป็นโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง NIR ได้ดีมากจึงทำให้เส้นสเปกตรัมมีลักษณะพีคกว้างที่ตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำและเนื่องจากขนาดอนุภาคที่ไม่เท่ากันจึงทำให้เกิดลักษณะของพีคปากแตร เส้นสเปกตรัมของสารสกัดขั้นที่ 2 ซึ่งมีการกำจัดน้ำออกจากสารละลายจึงไม่พบพีคของน้ำในเส้นสเปกตรัมและเนื่องจากตัวอย่างเป็นของเหลวใสจึงมีผลจากการกระเจิงแสงน้อยส่งผลให้ลักษณะของพีคปากแตรลดลง (Osborne *et al.*, 1993) ถึงแม้ว่าผลทางสถิติจาก Table 1 ของสมการทำนายจากสารสกัดขั้นที่ 2 และ paste จะให้ค่า R<sup>2</sup> และ RPD สูง แต่เมื่อพิจารณาจากค่า RMSECV ของสมการข้างต้นพบว่าเทคนิค NIRs ยังไม่มีความสามารถในการทำนายปริมาณคลอไพริฟอสตกค้างในพริกได้ เนื่องจากมีค่าความคลาดเคลื่อนที่สูง โดยเฉพาะในช่วงที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจาก Figure 3 จะพบว่าในช่วงที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ค่าที่ทำนายได้กับค่าจริงมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาใน Figure 4 พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ใช้สร้างสมการมีความเข้มข้นของคลอไพริฟอสต่ำมากไปจนถึงสูงมาก ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำมาสร้างสมการรวมกัน จึงทำให้การทำนายปริมาณคลอไพริฟอสเกิดความคลาด หากมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในแต่ละช่วงของความเข้มข้นให้มากขึ้นและสร้างสมการโดยใช้ข้อมูลที่แบ่งช่วงความเข้มข้นออกเป็นช่วงๆ อาจทำให้สามารถสร้างสมการที่ใช้ทำนายปริมาณคลอไพริฟอสที่มีความเข้มข้นในแต่ละช่วงได้แม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะในช่วงที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 ppm

### สรุป

การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการสำหรับตรวจสอบคลอไพริฟอสในพริกที่ให้ค่า R<sup>2</sup> และ RPD สูงที่สุดนั้นได้จากเส้นสเปกตรัมจากสารสกัดขั้นที่ 2 และรองลงมาจะเป็นสมการที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมของ paste อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความผิดพลาดของค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค NIRs กับค่าจริงที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ของตัวอย่างที่ศึกษา(%error) พบว่าสมการที่ได้ยังไม่มีความเป็นไปได้ในการทำนายคลอไพริฟอสโดยเฉพาะในช่วงที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm เนื่องจากให้ความผิดพลาดที่สูง ในขณะที่ช่วงความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ให้ค่าความผิดพลาดร้อยละ 8.9 ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการสร้างสมการและสร้างสมการแยกในช่วงความเข้มข้นที่แคบลง

### คำขอบคุณ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้: กรณีศึกษาถั่วฝักยาวและพริก” ภายใต้ชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์การเกษตร และผลิตภัณฑ์อาหารอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้” ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555 และ 2556 ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ขอขอบคุณ Professor Dr. Shuji Adachi และ Assist. Professor Dr. Takashi Kobayashi จาก Laboratory of Bioengineering, Division of Food Science and Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku Kyoto, Japan สำหรับการสนับสนุนการใช้เครื่อง GC-MS

### เอกสารอ้างอิง

- เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Thai-PAN). 2558. ผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักประจำปี 2558. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.thaipan.org/sites/default/files/conference2558/veg%202558%20final.pdf>. (17 พฤษภาคม 2558).
- Lehotay, S. J. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. *Journal of AOAC International* 90(2): 485-520.
- Osborne, B. G., T. Fearn and P.H. Hindle. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Application in Food and Beverage Analysis*. 2 nd ed. New York. John Wiley & Sons.