

วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของอิมามะกัติน เบนโซเอท ในพริก
เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง

Residue trial of Emamectin benzoate in Chili
to Establish Maximum Residue Limit

ปิยะศักดิ์ อรรถบุตร
Piyasak Akcaboot

ชนิตา ทองแซม
Chanita Thongsam

วีระสิงห์ แสงวรรณ
Weerasing Saengwan

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The study on the emamectin benzoate in chilli after the use of pesticide according to Good Agricultural Practice (GAP) was conducted through 2 supervised field trials in accordance with the FAO Plant Production and Protection Guideline. The first supervised field trial conducted April-May, 2021 in Saraburi province the second supervised field trial conducted June-August, 2021 in Kanchanaburi province. Emamectin benzoate 1.92 % w/v EC with concentration of 20 ml/20 liter of water was sprayed weekly for 2 times. Later, random samples of whole plants were taken from plot for analysis at 0, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days after the final application of pesticide. For this study, all samples were analyzed by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The Limit of Quantitation (LOQ) of emamectin benzoate in chilli was 0.01 mg/kg. The residues for the field trial no. 2 were 0.01 mg/kg at 0 day and undetected at 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days and the field trial no. 3 were 0.01 mg/kg at 0 day and undetected at 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days.

Keywords : Pesticide Residue, Emamectin benzoate, Chilli

บทคัดย่อ

ศึกษาปริมาณของสารพิษตกค้างอิมามะกัติน เบนโซเอท (emamectin benzoate) ในพริกพันธุ์จินดา หลังการใช้วัตถุอันตรายอย่างถูกต้องตามหลักปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice: GAP) โดยทำแปลงทดลองแบบ supervised trial (FAO, 2016) จำนวน 2 การทดลอง การทดลองครั้งที่ 2 อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัด สระบุรี ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม 2564 การทดลองครั้งที่ 3 อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในช่วง เดือนกรกฎาคมถึงเดือนสิงหาคม 2564 ทำการทดลองโดยวิธีการพ่นวัตถุอันตราย emamectin benzoate 1.92% W/V EC ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้ น้ำ 80 ลิตรต่อไร่ ตามอัตราแนะนำ ทุก 7 วัน รวม 2 ครั้ง และสุ่มเก็บตัวอย่างพริกเพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้าง emamectin benzoate ที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 10 และ 14 วันหลังจากพ่นสารครั้งสุดท้าย ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในพริกโดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) มีค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการวิจัยพบว่า ในการทดลองครั้งที่ 2 พบปริมาณ emamectin benzoate ตกค้างในพริกมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากการพ่นสารที่ 0 วัน และตรวจไม่พบสารที่ 1 3 5 7 10 และ 14 วันการทดลองครั้งที่ 3 พบปริมาณ emamectin benzoate ตกค้างในพริกมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากการพ่นสารที่ 0 วัน และตรวจไม่พบสารที่ 1 3 5 7 10 และ 14 วัน

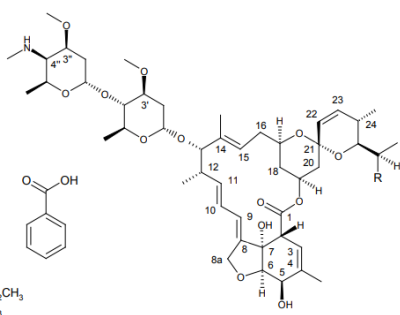
คำหลัก : สารพิษตกค้าง อิมามะกัตินเบนโซเอท พริก

คำนำ

ในปี 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพริกทั้งหมด 167,443 ไร่ พื้นที่เก็บเกี่ยว 343,566 ไร่ ผลผลิต 283,515 ตัน พริกที่ปลูกมากที่สุด คือ พริกชี้หนูผลใหญ่ มีพื้นที่เก็บเกี่ยว 145,929 ไร่ ผลผลิตรวม 127,295 ตัน คิดเป็นมูลค่า 5,036.72 ล้านบาท รองลงมาคือ พริกชี้หนูผลเล็ก มีพื้นที่เก็บเกี่ยว 177,447 ไร่ ผลผลิตรวม 142,986 ตัน คิดเป็นมูลค่า 6,966.28 ล้านบาท และพริกใหญ่ ได้แก่ พริกหนุ่ม พริก บางช้าง พริกมัน พริกเหลือง และพริกใหญ่ ลูกผสมพันธุ์ต่างๆ มีพื้นที่เก็บเกี่ยว 17,491 ไร่ ผลผลิต 26,368 ตัน คิดเป็นมูลค่า 773.90 ล้านบาท นอกจากนั้นเป็นพริกหยวก และพริกหวาน มีพื้นที่เก็บเกี่ยว 2,151 ไร่ คิดเป็นมูลค่า 56.60 ล้านบาท (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2020) เกษตรกรของประเทศไทย จึงจำเป็นต้องใช้วัตถุมีพิษทางการเกษตรหลากหลายชนิดเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากพบปัญหาโรคพืชและศัตรูพืชที่ส่งผลต่อผลผลิต จึงก่อให้เกิดผลกระทบที่ตามมาคือ การตกค้างของสารพิษในผลิตผลทางการเกษตร และส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ถ้าหากมีปริมาณที่สูงและเกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนด อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อส่งออกสินค้าทางการเกษตรไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ เมื่อประเทศผู้นำเข้าซึ่งมีระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างที่เข้มงวด หากตรวจพบสารพิษตกค้างในปริมาณที่เกินค่ากำหนดสากล ผลผลิตทางการเกษตรต่างๆ ดังกล่าวจึงถูกปฏิเสธการนำเข้าบ่อยครั้ง ทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศ

emamectin benzoate ใช้ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ หนอนเจาะลำต้น หนอนเจาะดอก หนอนเจาะผล หนอนเจาะฝัก หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยไฟ การออกฤทธิ์เป็นสารประเภทดูดซึม ออกฤทธิ์แบบกินตาย ถูกตัวตาย และสามารถดูดซึมเข้าไปสู่ใบพืชได้เร็ว ออกฤทธิ์ทันทีหลังจากฉีดพ่นลงบนพืช ทำลายระบบประสาทและการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้แมลงหยุดกินทันทีที่สัมผัส จึงถูกนำมาใช้กับการกำจัดแมลงในพริก ข้อมูลด้านพิษวิทยาของ emamectin benzoate ที่ละลายใน carboxymethylcellulose มีค่า LD₅₀ คือ 53–237 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม bw ในหนู (rat) 2 ตัว มีค่า LD₅₀ สำหรับ emamectin benzoate hydrate ที่ละลายใน carboxymethylcellulose คือ 58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม bw ค่า LD₅₀ สำหรับ emamectin hydrochloride ในตัวพาน้ำ คือ 67–88 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม bw ในหนู (rat) 2 ตัว ค่า LD₅₀ สำหรับการสัมผัส 500–2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม bw ในหนู (rats) และที่ 4 ชั่วโมงการสูดดมค่า LC₅₀ คือ 0.663 mg/L ในหนูตัวเมีย (female rats) และ 1.049 mg/L ในหนูตัวผู้ (male rats) และพบว่ามีภาวะคายเคืองต่อตาและผิวหนังของกระต่าย (rabbits) และไม่พบภาวะแพ้ในการทดสอบในตอมุน้ำเหลืองของหนู (mice) (FAO, 2005)

emamectin benzoate (MK-0244) ชื่อสามัญคือ 4"-deoxy-4"-epi-methylamino avermectin B1 (MAB1) โดยเป็นสารผสมของ 4"-deoxy-4"-epi-methylamino-avermectin B1a benzoate (MAB1a หรือ emamectin B1a benzoate) และ 4"-deoxy-4"-epi-methylamino-avermectin B1b benzoate (MAB1b หรือ emamectin B1b benzoate) โดย avermectins ใน emamectin benzoate มีสัดส่วนของสาร MAB1a:MAB1b=90:10 (w/w) ซึ่งต่างกันตรงที่หมู่ methylene ที่ C26 alkyl substituent: -CH₂CH₃ สำหรับ MAB1a และ -CH₃ สำหรับ MAB1b. (FAO, 2005) ดังภาพที่ 1.



R = CH₂CH₃ for emamectin B1a benzoate; R = CH₃ for emamectin B1b benzoate

Metabolites referred to in the appraisal by codes:

ภาพที่ 1. Structure formula of emamectin benzoate.

การศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate ในพริก เป็นการศึกษาเพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการประกอบการพิจารณาการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างในพืช (MRLs) จากการใช้วัตถุมีพิษอย่างถูกต้อง และปลอดภัย ตามมาตรฐานของ Codex ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้พิจารณากำหนดค่ามาตรฐานอ้างอิงด้านสารพิษตกค้างของประเทศ เพื่อใช้ในการรับรองและรักษาผลประโยชน์ในการค้าขายสินค้าเกษตรระหว่างประเทศสำหรับการส่งออก เพื่อความเป็นธรรมของแต่ละประเทศ โดยที่กรมวิชาการเกษตรได้ทำการศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate ในพริก เพื่อนำไปเสนอพิจารณาค่า Thai-MRL, Asian MRL และ Codex MRL ต่อไป

วิธีดำเนินการ

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 เครื่องพ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตรแบบเครื่องยนต์สะพายหลัง (Motorized Knapsack sprayer) รุ่น MS0735W ยี่ห้อ MARUYAMA ขนาดถังบรรจุ 25 ลิตร
- 1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง เช่น เครื่องวัดความเร็วลม เครื่องจับเวลา เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น เครื่องบันทึกอุณหภูมิ (Temperature Data Logger) และกระดาษวัดค่า ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ
- 1.3 หลอดทดลอง (screw-capped polypropylene centrifuge tubes) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.4 หลอดทดลองขนาดเล็ก (micro centrifuge tubes) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 1.5 ขวดบรรจุสาร (auto sampler vials) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 1.6 อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลาย (auto pipette) ขนาด 2-20, 10-100, 20-200, 100-1,000, 500-5,000 ไมโครลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร
- 1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balances) ชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
- 1.8 เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor)
- 1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมด้วย adapter สำหรับหลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.10 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder
- 1.11 เข็มที่มีกระดาษกรอง (syringe with membrane filter) ขนาด 0.20 ไมโครเมตร
- 1.12 เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างชนิด Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) LC รุ่น Agilent G6460A Series triple quadrupole

2. สารเคมี

- 2.1 สารมาตรฐานของ emamectin benzoate 96.49% จากบริษัทผู้ผลิต Dr. Ehrenstorfer
- 2.2 วัตถุอันตรายทางการเกษตรใช้ในแปลงทดลอง คือ emamectin benzoate 1.92% W/V EC ของบริษัท ทีแอนด์เอ็นเคมีเกษตร
- 2.3 Acetonitrile (CH_3CN) ชนิด LC-MS grade
- 2.4 Formic acid (CH_2O_2) ชนิด analytical grade
- 2.5 Anhydrous magnesium sulfate (MgSO_4) เผาที่ 500°C นาน 5 ชั่วโมง
- 2.6 Sodium citrate tribasic dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ชนิด analytical grade
- 2.7 Disodium hydrogen citrate sesquihydrate ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$) ชนิด analytical grade
- 2.8 Sodium chloride (NaCl) ชนิด analytical grade
- 2.9 Ammonium formate ชนิด analytical grade
- 2.10 PSA ชนิด analytical grade
- 2.11 น้ำกลั่น (distilled water)
- 2.12 C18 ชนิด analytical grade

วิธีการ

1. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

1.1 การเตรียมตัวอย่างพริก

ตัวอย่างพริกที่นำมาทดลอง หั่นและบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เป็นเนื้อเดียวกันโดย food processer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารพิษตกค้างในตัวอย่าง ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง

1.2 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง

สกัดตัวอย่างพริกด้วยวิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) สุ่มซั่งตัวอย่างพริก 10 กรัมใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร สกัดด้วย acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติม MgSO_4 4 กรัม NaCl 1 กรัม $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม และ $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี MgSO_4 จำนวน 750 มิลลิกรัม PSA จำนวน 125 มิลลิกรัม และ C18 จำนวน 50 มิลลิกรัม เขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วกรองสารละลายที่ได้จากนั้นกรองตัวอย่างผ่าน PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS

1.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate โดยมีสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ดังแสดงใน ตารางที่ 1 ตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ emamectin Benzoate ในตัวอย่างพริก

LC Parameter	Condition
Injection Volume (μL)	5
Column type	Kinetex 2.6 μm XB-C18, 100A, 100x2.1 mm
Column Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	40
Mobile phase A	0.01% formic acid in 5 mM ammonium formate in water
Mobile phase B	Acetonitrile
Mobile phase flow (mL/min)	0.3
Total run time (min)	12.0
QQQ Source Parameter	Value (+)
Drying Gas ($^{\circ}\text{C}$)	120
HSID Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	200
Nebulizer gas1	350
ElectroSpray V1Pos	5000
Source 1 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	340

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ของ MS/MS: Multi Reaction Monitoring (MRM)

Compound name	Precursor ion	Product ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
emamectin B1a	886.5	158	100	150	40	7
emamectin B1a	886.5	302	100	180	27	7
emamectin B1b	872.5	158	100	180	40	7
emamectin B1b	872.5	302	100	180	27	7

ตารางที่ 3 แสดงระยะเวลาและอัตราที่ใช้ของ mobile phase

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.0	80	20
8.0	10	90
10.0	80	20
12.0	80	20

1.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน primary มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ และนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมต่อไป โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1.4.1. การเตรียม stock standard solution โดยชั่งสารมาตรฐาน emamectin benzoate ให้ได้น้ำหนักประมาณ 10 mg ใน volumetric flask ขนาด 10 ml และนำค่า %purity มาคำนวณกลับเป็นน้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานประมาณ 1,000 µg/ml โดยใช้ acetonitrile (HPLC grade) เป็นตัวทำละลาย ในการเตรียม stock standard solution ของสารละลายมาตรฐานสามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (µg/ml)} = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง (mg)} \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร (\%)} \times 10^3}{\text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times 100}$$

1.4.2 การเตรียม intermediate standard solution เจือจางสารละลายจาก stock standard solution ในตัวทำละลาย acetonitrile ให้มีความเข้มข้น 100 µg/ml และ 10 µg/ml ใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (µg/ml)

N_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม (µg/ml)

V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูตมา (ml)

V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (ml)

1.4.3 การเตรียม working standard solution ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ในตัวทำละลาย acetonitrile หรือในสารละลายตัวอย่าง blank ของพริก ที่สกัดด้วยวิธี EN QuEChERS (EN15662: 2008) ในการเตรียมใช้สูตรการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 1.4.2

1.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ emamectin benzoate ในพริก

เมื่อได้วิธีการสกัดตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสม จึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตาม parameter ต่างๆ ดังนี้

1.5.1 ช่วงการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Working range/linearity)

การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยการ Spike สารละลายมาตรฐาน emamectin benzoate ลงใน ตัวอย่าง พริก 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้น ทำการทดสอบ 6 ซ้ำ สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN15662: 2008) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคที่ได้ จากการสกัดตัวอย่าง (แกน y) และความเข้มข้นของสาร emamectin benzoate ที่ spike (แกน X) โดยค่า coefficient of determination (R^2) ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ($R^2 \geq 0.990$) ซึ่งทุกความเข้มข้นที่ศึกษา มีความแม่นยำ (accuracy) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

1.5.2 ความแม่นยำ (accuracy)

1.5.2.1 %Recovery โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืนของสารพิษตกค้างที่ เติมลงในตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นดังกล่าวสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\%Recovery = (Cf/Ca) \times 100$$

เมื่อ Cf = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ (มีการ spike)

Ca = ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารที่เติมลงในตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับของ %recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของห้องปฏิบัติการในสหภาพยุโรป (SANCO, 2013) คือ 70-120 ค่าที่วิเคราะห์ได้ทุกๆความเข้มข้นจะต้องผ่านเกณฑ์ดังกล่าว

1.5.2.2 Precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยนำผลการวิเคราะห์ % recovery มาหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation) หรือ %RSD สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\% RSD = \frac{SD}{C_{mean}} \times 100$$

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

C_{mean} = ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

เกณฑ์การยอมรับของ precision คือ มี %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (SANCO, 2013)

1.5.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการสกัด (Limit of detection, LOD)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้โดยไม่จำเป็นต้องมีปริมาณที่แน่นอน (ไม่จำเป็นต้องมี accuracy) หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบ 6 ซ้ำ ประเมินค่า LOD เท่ากับ 3SD (Eurachem, 2014) และได้ทำการพิสูจน์ค่า LOD โดยการ Spike สารละลายมาตรฐาน emamectin benzoate ที่ความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณ ลงในตัวอย่างพริก 6 ซ้ำ

1.5.4 ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยมีความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ศึกษาโดยการ spike สารละลาย มาตรฐาน emamectin benzoate ลงในตัวอย่างพริก ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ พิสูจน์ accuracy และ precision ได้) ทำการทดสอบ 6 ซ้ำ คำนวณ %recovery และ %RSD ค่าที่ได้ต้องอยู่ใน เกณฑ์ที่ ยอมรับ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ เท่ากับ 10SD (Eurachem, 2014)

2. การศึกษาการสลายตัวของสารตกค้าง emamectin benzoate จากแปลงทดลองพริก

2.1 ทำการสำรวจและเลือกพื้นที่แปลงทดลองพริกจำนวน 3 แปลง แต่ละแปลงห่างกันไม่น้อยกว่า 30 กิโลเมตร ในพื้นที่ภาคกลาง และภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัด นครปฐม สระบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี

2.2 แต่ละแปลงทดลองแบ่งออกเป็น 2 แปลงทดลองย่อย คือ แปลงควบคุม (Control plot) เป็น แปลงที่ไม่ได้พ่น emamectin benzoate และแปลงที่พ่น emamectin benzoate 1.92 % W/V EC (treated plot) ในอัตราแนะนำ คือ 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 80 ลิตรต่อไร่ตามคำแนะนำของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2557)

2.3 ทำการ (calibrate) เครื่องพ่นก่อนการพ่น emamectin benzoate เพื่อหาอัตราการไหล ของเครื่อง (flow rate) คำนวณหาปริมาณน้ำปริมาณ emamectin benzoate ที่ใช้พ่น คำนวณเวลาที่ใช้ในการพ่น (target time) และปรับเวลาการเดินของผู้พ่น เพื่อควบคุมการพ่นให้มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งแปลง

2.4 การพ่นวัตถุอันตราย emamectin benzoate ในแต่ละแปลงทดลอง (treated plot) โดยพ่น emamectin benzoate 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน ช่วงเวลาในการพ่น ได้แก่

แปลงทดลองที่ 1 วันที่ 3 กรกฎาคม และ 10 กรกฎาคม 2563

แปลงทดลองที่ 2 วันที่ 16 และ 25 เมษายน 2564

แปลงทดลองที่ 3 วันที่ 9 และ 16 กรกฎาคม 2564

2.5 สุ่มเก็บตัวอย่างพริกจากแปลงควบคุม และแปลงทดลอง ตามมาตรฐานการทำแปลง Supervised residue trials ให้ได้น้ำหนักอย่างน้อย 1 กิโลกรัม โดยสุ่มตัวอย่างแปลงละ 2 ซ้ำ ที่ระยะเวลา 0 (หลังฉีดพ่น 2 ชั่วโมง) 1 3 5 7 10 และ 14 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้าง emamectin benzoate นำตัวอย่างพริกบรรจุสุญญากาศพร้อมเขียนป้าย เก็บถุงตัวอย่างในกล่องโฟมที่มีการบรรจุน้ำแข็ง เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง และมีการควบคุมบันทึกอุณหภูมิของตัวอย่างด้วย Temperature Data Logger ตลอดการขนส่งมายัง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยมีช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง ดังนี้

แปลงทดลองที่ 1 วันที่ 10 11 14 16 18 21 และ 25 กรกฎาคม 2563

แปลงทดลองที่ 2 วันที่ 25 26 28 30 เมษายน, และ 2 5 9 พฤษภาคม 2564

แปลงทดลองที่ 3 วันที่ 16 17 19 21 23 26 และ 30 กรกฎาคม 2564

ระยะเวลา

ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

สถานที่ดำเนินการ

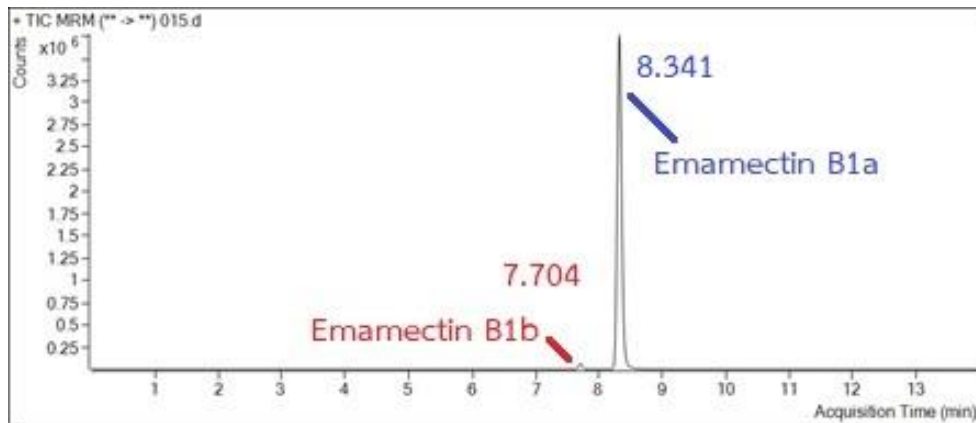
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

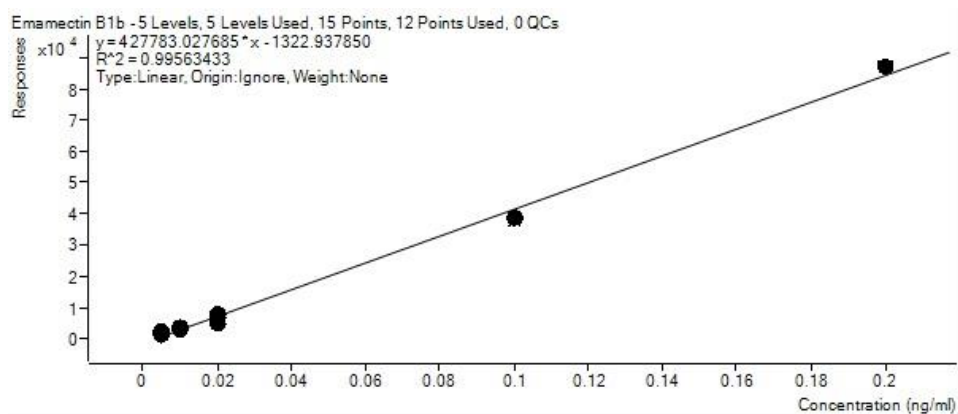
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์ emamectin benzoate

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยการ เตรียมสารละลายมาตรฐาน emamectin benzoate ในตัวทำละลาย Acetonitrile ที่ความเข้มข้น 0.10 ug/ml พบว่า ภายใต้ สภาวะที่เหมาะสมสาร emamectin benzoate โดยมีเมตาบอไลต์คือ emamectin B1a มีค่า retention time ที่ 7.704 นาที และ emamectin B1b มีค่า retention time 8.341 นาที แสดงลักษณะโครมาโทแกรม ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะโครมาโทแกรมของ emamectin benzoate และเมตาบอไลต์ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS



ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของสาร emamectin benzoate ในตัวทำละลาย matrix ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า emamectin benzoate ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 0.005-0.20 ug/ml มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of determination; R^2) = 0.99563

2. การศึกษาประสิทธิภาพการวิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ emamectin benzoate ในพริก ด้วยวิธี QuEChERS (EN15662: 2008)

การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ emamectin benzoate ในพริก สามารถพิสูจน์ความแม่นยำ (accuracy) ประเมินค่าจาก % recovery โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน emamectin benzoate ลงในตัวอย่างพริกให้มีความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง) ได้แก่ 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ความเข้มข้น ละ 6 ซ้ำ) การสกัด emamectin benzoate ในพริก ด้วยวิธี EN QuEChERS (EN 15662: 2008) โดยการเตรียม Working Standard solution ในสารละลายตัวอย่าง blank ที่สกัดโดยวิธีการเดียวกัน

จากการทดลอง พบว่า ให้ %recovery เฉลี่ย เท่ากับ 76, 86 และ 95 ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (70-120) ของ SANCO (SANCO, 2013) (ข้อมูลในตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 %recovery ของการตรวจวิเคราะห์ emamectin benzoate ลงในตัวอย่างในพริก ที่ระดับความเข้มข้นต่าง

spiked level mg/kg	%recovery								
	1	2	3	4	5	6	average	SD	%RSD
0.01	80	75	74	78	81	72	77	5	6
0.1	92	84	89	84	76	88	86	6	7
0.5	95	99	94	96	92	93	95	2	3

จากผลการทดสอบ LOQ โดยการ spike ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำ 6 ซ้ำหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOQ เท่ากับ $10 \times SD$ ได้ค่า LOQ จากการคำนวณที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ข้อมูลในตารางที่ 5)

จากข้อมูลตารางที่ 5 เมื่อคำนวณค่า LOD พบว่า emamectin benzoate มี LOD เท่ากับ 0.0011 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำมากจึงทำการพิสูจน์โดยการฉีดแต่เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการวิเคราะห์หาว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ emamectin benzoate ได้ ในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น LOD (ข้อมูลในตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 LOD และ LOQ ของ emamectin benzoate ในพริกที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS (EN15662: 2008)

No.of repeat	concentration of emamectin benzoate (mg/kg)
1	0.0080
2	0.0075
3	0.0074
4	0.0078
5	0.0081
6	0.0072
mean	0.0077
SD	0.0004
3SD (LOD)	0.0011
10SD (LOQ)	0.0107

ตารางที่ 6 การพิสูจน์ค่า LOD ที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

No.of repeat	concentration of emamectin benzoate (mg/kg)
1	0.0030
2	0.0038
3	0.0032
4	0.0031
5	0.0032
6	0.0039
mean	0.0034

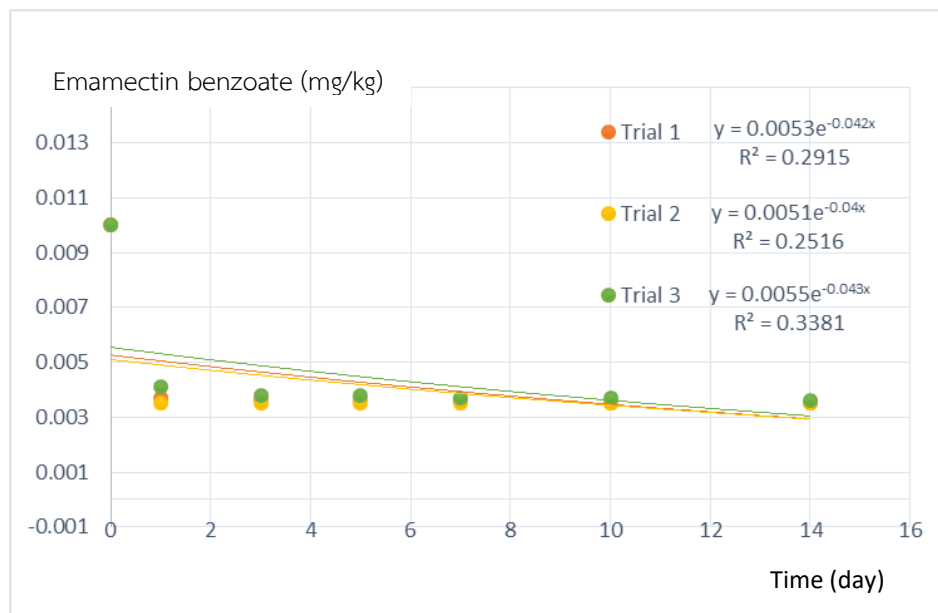
3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างในตัวอย่างพริกจากแปลงทดลอง

การศึกษาปริมาณสารตกค้าง emamectin benzoate ในพริกพันธุ์จินดาทั้งหมด 3 แปลงทดลอง พบว่า ภายหลังจากพ่นสารครั้งสุดท้าย ผลการศึกษาตรวจไม่พบสารตกค้างในทุกตัวอย่างจากแปลงควบคุม สำหรับแปลงทดลองที่มีการพ่นสาร emamectin benzoate พบสารตกค้างเฉลี่ย แปลงที่ 1 เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แปลงที่ 2 พบ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแปลงที่ 3 พบ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0 วัน และพบว่า ทั้ง 3 แปลง ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างตั้งแต่ 1 วัน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ปริมาณสารตกค้าง emamectin benzoate ในพริก ทั้ง 3 แปลงทดลอง

Time (day)	emamectin benzoate (mg/kg)		
	Trial 1	Trial 2	Trial 3
0	0.01	0.01	0.01
1	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND

<LOD รายงาน ND= not detected (LOD=0.005 mg/kg)



ภาพที่ 4 กราฟแนวโน้มการสลายตัวของ emamectin benzoate ในพริก ทั้ง 3 แปลงทดลอง

จากการศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในพริก ทั้ง 3 แปลง พบเส้นแนวโน้มการสลายตัวแบบ exponential คือ มีการลดลงอย่างรวดเร็วในระยะแรกและจะช้าลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีการสลายตัวและมีปริมาณลดลง เมื่อถึงระยะเก็บตัวอย่างนานขึ้น (ภาพที่ 4) สอดคล้องกับการทดลอง ใน Report JMPR ปี 2005 ผลการศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในพืชกลุ่ม Fruiting vegetables, other than Cucurbits ได้แก่ มะเขือเทศและพริกหวาน ในประเทศ อิตาลี ฮังการี และสเปน ได้รายงานการทำแปลงทดลองพบว่า เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวนานขึ้นสารพิษตกค้าง emamectin benzoate มีปริมาณลดลง และมีการกำหนดค่า PHI เท่ากับ 3 วัน (FAO, 2005)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ emamectin benzoate ในตัวอย่างพริก สกัดตัวอย่างโดยใช้วิธี EN QuEChERS (EN 15662, 2008) พบว่าวิธีดังกล่าวให้ %recovery อยู่ในช่วง 72-99 มีค่าร้อยละส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพันธ์ (%RSD) เท่ากับ 3-7 โดยมีช่วงการวิเคราะห์ของวิธีทดสอบที่ 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า R^2 เท่ากับ 0.99563 มีขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงคุณภาพ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้น วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้สามารถนำมาสกัดตัวอย่างพริกจากแปลงทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. การศึกษาการสลายตัวของสารตกค้าง emamectin benzoate ในพริก ทั้ง 3 แปลง พบว่ามีการลดลงอย่างรวดเร็วในระยะแรกและจะช้าลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีการสลายตัวมากขึ้นเมื่อถึง ระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยวมากขึ้น โดยสารตกค้าง emamectin benzoate สามารถกำหนดค่า PHI สำหรับ emamectin benzoate ในพริกที่ 3 วัน เมื่อนำข้อมูลอ้างอิงกับรายงานผลการประชุมของ JMPR

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อนำข้อมูลเสนอผ่าน สำนักงานมาตรฐานเกษตรและอาหารแห่งชาติ ไปประกอบการพิจารณา กำหนดค่ามาตรฐานสารพิษตกค้างสำหรับประเทศไทย, Asean และ Codex MRL
2. เพื่อกำหนดระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตพริกที่ปลอดภัย (PHI) ภายหลังการพ่น emamectin benzoate ครั้งสุดท้าย
3. เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาปรับปรุงคำแนะนำการใช้ emamectin benzoate กับพริก

เอกสารอ้างอิง

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2020. เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์พริก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<https://www.doa.go.th/hort/?p=18784> (15 ตุลาคม 2563)

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2557. ศัตรูพริก: กลุ่มบริหารศัตรูพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

EN 15662. 2008. Foods of plant origin- Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partition and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method.

Eurachem. 2014 The Fitness for purpos of Analytical Method : A Laboratory Guide to Method ralidation and Related Topics.

FAO. 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations.List of Pesticides evaluated by JMPR and JMPS. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา:

[https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/](https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Emamectin.pdf)

[Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Emamectin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Emamectin.pdf) (27 มกราคม 2565)

FAO. 2016. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of Maximum Residue Levels in food and feed. Pesticide Residues. 3rd Edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Plant Production and Protection Paper. 225, 298 pp.

SANCO. 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.