

วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของอีมาเมกติน เบนโซเอต (emamectin benzoate)
ในผักชีฝรั่ง เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง
Residue trials of emamectin benzoate in stink weed to establish
maximum residue limit (MRL)

วาเลนไทน์ เจือสกุล วิชุต้า ควรวัทธ์ วีระสิงห์ แสงวรรณ ชนิตา ทองแซม ปิยะศักดิ์ อรรถบุตร
Valentine Juasakul Wichuta Kuanhut Weerasing Saengwan Chanita TongSam Piyasak
Akcaboot

กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The study of supervised residue trial on emamectin benzoate in stink weed for establish Maximum Residue Limit (MRL) was conducted 3 trials at Nakhon Pathom province and Kanchanaburi province, central of Thailand from 2020 to 2021. The application was performed with 10 ml of emamectin benzoate per 20 liters of water (120 liters of water per rai). The supervised residue trial consisted of untreated plot (control section) and treated plot (application section). The formulation of 1.92% EC emamectin benzoate was applied twice at 7 days interval on treated plot. After the last application, samples were collected at 0, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days for residue analysis following QuEChERS method (EN15662, 2008) by using LC-MS/MS instrument. The limit of quantification (LOQ) was 0.01 mg/kg. The results shown that all untreated samples, the residue were not detected or lower than 0.01 mg/kg while treated samples were found the residue contained between lower than 0.01 to 0.05 mg/kg. The storage stability on emamectin benzoate in stink weed was study and the result shown that emamectin benzoate is stable in stink weed for a year following stored under frozen condition (-20±5 °C) without degradation of the residue.

Keywords : emamectin benzoate, stink weed, MRL, supervised residue trial, QuEChERS, LC-MS/MS

บทคัดย่อ

ศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างอีมาเมกติน เบนโซเอต (emamectin benzoate) ในผักชีฝรั่ง เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง ทดลองในแปลงผักชีฝรั่งของเกษตรกรทั้งหมด 3 แปลง ระหว่างปี 2563 ถึง 2564 ที่จังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรี วางแผนการทดลองแบบ supervised residue trial โดยแต่ละแปลงทดลอง แบ่งเป็น 2 แปลงทดลองย่อย คือแปลงทดลองที่ไม่พ่น emamectin benzoate เป็นแปลงควบคุม (untreated plot) และแปลงทดลองที่พ่น emamectin benzoate เป็นแปลงทดลอง (treated plot) พ่น emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ พ่นสารทุก 7 วัน ติดต่อกัน 2 ครั้ง ภายหลังพ่นสารครั้งสุดท้ายสุ่มเก็บตัวอย่างผักชีฝรั่งที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 10 และ 14 วัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง emamectin benzoate โดยสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS) ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างจากแปลงควบคุม (untreated) ทั้ง 3 แปลง

มีปริมาณสารพิษตกค้างน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ตัวอย่างจากแปลงทดลอง (treated) พบปริมาณสารพิษตกค้างอยู่ระหว่างน้อยกว่า 0.01 ถึง 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และจากการทดสอบความคงตัว (storage stability) ของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักซีฝรั่งที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C พบว่ามีความคงตัวนาน 360 วัน โดยไม่มีการสลายตัวของสารพิษตกค้าง

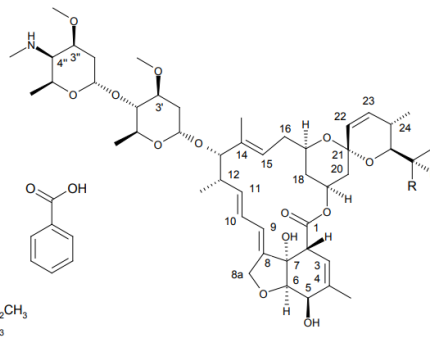
คำหลัก : อีมาเมกตินเบนโซเอต ผักซีฝรั่ง ปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง

คำนำ

ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Maximum Residue Limit; MRL) หมายถึงปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่มีได้ในสินค้าเกษตร มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสารพิษตกค้างต่อกิโลกรัมสินค้าเกษตร ซึ่งพิจารณา กำหนดโดยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรของประเทศไทย ส่วนการกำหนดค่า MRL ของ Codex Alimentarius (Codex MRL) เป็นการพิจารณา ร่วมกันของคณะกรรมการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ โดยพิจารณาจากข้อมูลผลการทดลองของประเทศสมาชิกภายใต้แนวทางการดำเนินงานตามหลักเกณฑ์การทำแปลงทดลองสารพิษตกค้างของ Codex Guideline และหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (Good Agricultural Practice) ในการกำหนดค่า MRL จะพิจารณาตามชนิดของวัตถุดิบพืชและชนิดของพืช โดยส่วนใหญ่คณะกรรมการจะพิจารณาพืชและวัตถุดิบพืชที่ใช้กันมากในสหภาพยุโรปและประเทศในซีกโลกตะวันตก สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในแถบเอเชีย และมีการส่งออกผักและผลไม้เมืองร้อน จึงมีความจำเป็นต้องทำการทดลองในพืชเมืองร้อนเพื่อให้มีการกำหนดค่า MRL ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการต่อรองทางการค้าและป้องกันการกีดกันทางการค้าสำหรับพืชและวัตถุดิบพืชที่ Codex ไม่มีการกำหนดค่า MRL ไว้ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2559)

ผักซีฝรั่ง (culantro, stink weed, stinking) จัดอยู่ในวงศ์ผักชี (Apiaceae) เป็นผักที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีใบสีเขียวอ่อนและเข้ม ขอบใบมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย เป็นพืชที่ปลูกง่าย โตเร็ว และให้ผลตอบแทนสูง สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติได้จัดผักซีฝรั่งอยู่ในกลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศ (herbs and spices) กลุ่มย่อยไม้ล้มลุก ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับกะเพรา โหระพา และใบแมงลัก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2559) ผักซีฝรั่งนิยมบริโภคใบสดและนำมาปรุงแต่งรสอาหาร แม้ว่าผักซีฝรั่งจะเป็นพืชที่ปลูกง่ายและปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย แต่จากข้อมูลของกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (กลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2560) พบแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่ แมลงหวี่ขาว หนอน และเพลี้ยไฟ เป็นต้น ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาผลผลิตที่ลดลงหรือผลผลิตคุณภาพต่ำ จึงจำเป็นต้องใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ ตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร ดังนั้นผู้บริโภคจึงต้องระวังสารเคมีตกค้างอยู่ที่ใบก่อนที่จะนำไปรับประทาน

emamectin benzoate เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร จัดอยู่ในกลุ่ม avermectin เป็นสารป้องกันแมลงศัตรูพืชประเภทดูดซึม (systemic pesticide) ออกฤทธิ์แบบกินตาย ถูกตัวตาย สามารถดูดซึมเข้าไปสู่ใบพืชได้อย่างรวดเร็ว ออกฤทธิ์ทันทีหลังจากพ่นสารลงบนพืช ทำลายระบบประสาทและการทำงานของกล้ามเนื้อทำให้แมลงหยุดกินใบพืชทันทีที่สัมผัส (JMPR, 2005) ใช้ป้องกันกำจัดหนอนขอนใบ (leafminer) เพลี้ยไฟ (thrips) หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm) ในพืชตระกูลกะหล่ำ กะเพรา โหระพา แมงลัก และผักชี อัตราแนะนำที่ใช้กำจัดเพลี้ยไฟในกลุ่มพืชสมุนไพร คือ emamectin benzoate 1.92% EC ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (กลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2560) และในการกำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRL) ของ emamectin benzoate ตามชนิดสารพิษตกค้างที่กำหนดให้ตรวจ (definition of residues) กำหนดให้ใช้ค่าปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin B1a benzoate เท่านั้น (FAO/WHO, 2021)



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

Figure 1 Structural formula of emamectin benzoate (JMPR, 2005)

แม้ว่า emamectin benzoate จะมีฤทธิ์ป้องกันแมลงศัตรูพืชในกลุ่มพืชสมุนไพร แต่ประเทศไทยและ Codex ยังไม่มีข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRL) และระยะหยุดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว (Pre harvest interval: PHI) สำหรับพืชตระกูลนี้ ดังนั้นการศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate ในผักซีฝรั่งแบบ supervised trials โดยแปลงทดลองต้องมีหลักการปลูกแบบ GAP (Good Agricultural Practice) มีการบันทึกและการทำงานตามหลัก GLP (Good Laboratory Practice) จะทำให้ได้ข้อมูลเพื่อนำไปประกอบการพิจารณากำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRL) ของประเทศไทย ASEAN และ Codex เพื่อใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงในการผลิตและตรวจสอบผักซีฝรั่งที่ผลิตนำเข้า และส่งออก อีกทั้งยังสามารถกำหนดระยะเวลาปลอดภัยของการพ่นสารครั้งสุดท้ายจนถึงวันเก็บเกี่ยวหรือระยะหยุดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว (PHI) เพื่อให้เกษตรกรใช้ emamectin benzoate กับพืชอย่างถูกต้องและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. การทำแปลงทดลอง ได้แก่ เครื่องพ่นแบบติดเครื่องยนต์สะพายหลังขนาดถังบรรจุ 25 ลิตร (Motorized knapsack sprayer) ชุดสวมใส่ป้องกันสารเคมี แวนและหมวกป้องกันสารเคมี หน้ากากอนามัย ถุงมือ นาฬิกาจับเวลา เครื่องวัดความเร็วลม เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (Temperature Hygrometer) เครื่องบันทึกอุณหภูมิ (Temperature Data Logger) ตลับเมตร เชือกฟาง แผ่นป้ายชื่อวัตถุที่มีพิษ ไม้ปักแปลง หมุดหัวน็อต กระจกบอกลง ปีกเกอร์ (Beaker) ปิเปตต์ (Pipette) และวัตถุอันตรายอีมาเมกตินเบนโซเอต (emamectin benzoate) 1.92% EC ชื่อการค้า โปรเคลม

2. ห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สารมาตรฐาน emamectin benzoate ความบริสุทธิ์ 96.87% เครื่องชั่งตวงถนียม 2 และ 5 ตำแหน่ง เครื่องปั่นตัวอย่าง (ยี่ห้อ Retsch รุ่น GM300) ตู้แช่แข็ง (Freezer) เครื่องแก้ว ได้แก่ กระจกบอกลง ปีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขวดใส่สารละลาย (lab bottle) autosampler vial และแท่งแก้วคนสาร micropipette ขนาด 10-20 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร syringe filter PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เครื่อง vortex mixer เครื่อง centrifuge สารเคมี ได้แก่ acetonitrile, magnesium sulfate anhydrous, primary-secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB), sodium chloride, trisodium citrate dihydrate, di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate, ammonium formate, formic acid และไนโตรเจนเหลว เครื่องตรวจวิเคราะห์ Liquid chromatography tandem mass spectrometer (LC-MS/MS)

วิธีการ

1. การทำแปลงทดลอง

1.1) สำรองและเลือกแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ supervised trial แต่ละแปลงทดลองต้องห่างกันไม่น้อยกว่า 30 กิโลเมตร ภายใต้การทำแปลงทดลองในปีเดียวกัน ซึ่งสถานที่ทำแปลงทดลอง มีดังนี้

แปลงที่ 1 ตำบลดอนข่อย อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ทำการทดลองระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม 2563

แปลงที่ 2 ตำบลตะคร้ำเอน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดกาญจนบุรี ทำการทดลองระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน 2564

แปลงที่ 3 ตำบลดอนข่อย อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ทำการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม 2564

1.2) แบ่งแปลงทดลองออกเป็น 2 แปลงทดลองย่อย คือแปลงควบคุม (untreated plot) เป็นแปลงทดลองที่ไม่พ่นวัตภูมิพิช emamectin benzoate และแปลงทดลองที่พ่นวัตภูมิพิช emamectin benzoate 1.92% EC (treated plot) ตามอัตราแนะนำคือ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ (กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2553)

1.3) calibrate เครื่องพ่น Motorized knapsack sprayer ก่อนทำการทดลอง เพื่อหาอัตราการใช้น้ำ (flow rate) และเวลา (target time) ในการเดินพ่นวัตภูมิพิชต่อพื้นที่แปลงทดลอง และทดสอบผู้พ่นวัตภูมิพิชให้เดินตรงกับเวลาที่ได้จากการ calibrate เพื่อควบคุมการพ่นวัตภูมิพิชให้มีความสม่ำเสมอและถูกต้องแม่นยำ

1.4) พ่นวัตภูมิพิช emamectin benzoate 1.92% EC ในแปลงทดลองย่อย treated plot โดยพ่นสารทุก 7 วัน 2 ครั้งติดต่อกัน หลังการพ่นวัตภูมิพิชครั้งสุดท้าย สุ่มเก็บตัวอย่างผักชีฝรั่งที่ระยะ 0 1 3 5 7 10 และ 14 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate โดยน้ำหนักตัวอย่างที่สุ่มเก็บต้องไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม แต่ละแปลงทดลองย่อยจะสุ่มเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงควบคุม (untreated plot) ก่อน จากนั้นจึงสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงที่พ่นวัตภูมิพิช (treated plot)

1.5) ชนส่งตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากแปลงทดลองมาที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัย วัตภูมิพิชการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร โดยบรรจุตัวอย่างใส่ถุงเก็บตัวอย่าง แต่ละถุงมีป้ายชื่อตัวอย่างและชื่อวัตภูมิพิชระบุชัดเจน บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง อุณหภูมิ และเวลาที่สุ่มเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำถุงตัวอย่างใส่ในกล่องโฟมที่มีถุงใส่น้ำแข็งบรรจุอยู่เพื่อรักษาสภาพตัวอย่างระหว่างการขนส่ง วางเครื่องบันทึกอุณหภูมิ (Temperature Data Logger) ไว้ในกล่องโฟมกับถุงใสตัวอย่างเพื่อตรวจสอบอุณหภูมิระหว่างการขนส่ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการให้เก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C

2. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง

2.1) ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

2.1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution ของ emamectin benzoate ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานที่เป็น primary standard ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักเนื้อสาร 10 มิลลิกรัมโดยประมาณ ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลาย acetonitrile ลงใน volumetric flask ที่ละน้อย เขย่าจน primary standard ละลายหมด จากนั้นจึงเติม acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำทำละลายมาตรฐานลงในขวดใสสารละลาย (lab bottle) ติดฉลาก ระบุชื่อสาร ความเข้มข้น ชื่อผู้เตรียม สารละลายที่ใช้ และวันที่เตรียมให้ชัดเจน เก็บสารมาตรฐานที่เตรียมในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C โดยความเข้มข้นของสารมาตรฐานสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง (มิลลิกรัม)} \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร (\%)} \times 1000}{\text{ปริมาตรที่เตรียม (มิลลิลิตร)} \times 100}$$

2.1.2) เตรียม intermediate standard solution ของ emamectin benzoate ที่ความเข้มข้น 100 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตรการคำนวณ ดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
 N_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
 V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูตามา (มิลลิลิตร)
 V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (มิลลิลิตร)

ใช้ micropipette ดูด stock standard solution ในปริมาตรที่คำนวณไว้ ลงใน volumetric flask เติม acetonitrile ลงใน volumetric flask จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทสารละลายมาตรฐานลงขวดใส่สารละลาย (lab bottle) ติดฉลาก ระบุชื่อสาร ความเข้มข้น ชื่อผู้เตรียม สารละลายที่ใช้ และวันที่เตรียมให้ชัดเจน เก็บสารมาตรฐานที่เตรียมในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C

2.1.3) ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักซีฝรั่งโดยการสกัดด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ พิสูจน์ความแม่นยำ (accuracy) จากร้อยละการกลับคืน (%recovery) และพิสูจน์ความเที่ยง (precision) จากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

2.2) วิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักซีฝรั่งด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008)

2.2.1) เตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างผักซีฝรั่งที่แช่แข็งไปปั่นกับไนโตรเจนเหลวด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ปั่นแล้วในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C

2.2.2) ชั่งตัวอย่างผักซีฝรั่ง 10 กรัม ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) โดยเติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที เติมนีมาเนียมซัลเฟต anhydrous 4 กรัม sodium chloride 1 กรัม trisodium citrate dihydrate 1 กรัม และ di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม เขย่าอีก 1 นาที นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที อีก 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบน 5 มิลลิลิตร ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี magnesium sulfate anhydrous 750 มิลลิกรัม PSA 125 มิลลิกรัม และ GCB 38 มิลลิกรัม เขย่าโดยใช้เครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที อีก 5 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter ขนาด 2 ไมโครเมตร ใส่ขวดแก้ว (lab bottle) ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายที่กรองแล้วด้วย micropipette ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ autosampler vial และเติม 10% formic acid 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS

2.2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐานของ emamectin benzoate ในสารละลายที่สกัดจาก sample blank ตามวิธีสกัดตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.01 0.05 0.1 0.2 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (working standard solution) เพื่อสร้าง calibration curve ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน emamectin benzoate (แกน x) กับ peak area (แกน y) ซึ่งต้องมีค่า correlation ของ linear regression (r) ไม่น้อยกว่า 0.995

2.3) ศึกษาความคงตัว (storage stability) ของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักซีฝรั่ง

ทดสอบสถานะการสลายตัวระหว่างการเก็บรักษาของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักซีฝรั่ง ที่ระยะเวลา 0 14 30 60 90 120 180 และ 360 วัน โดย spiked สารมาตรฐาน emamectin benzoate ลงในตัวอย่างผักซีฝรั่ง จำนวน 16 ขวด ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ LOQ (FAO, 2016) จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ spiked แล้วในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C เมื่อถึงระยะเวลาที่ศึกษานำตัวอย่างมาสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างจากแปลงทดลอง และในการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้งจะทำการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ในชุดของการทดสอบตัวอย่าง (procedural recovery) เพื่อเปรียบเทียบตัวอย่าง storage stability และ procedural recovery ที่สกัดภายในวันเดียวกัน ซึ่งเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

2.4) สภาพะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง

Column: Phenomenex 2.6 μ m XB C18 100A, 100 mm \times 2.1 mm

Temperature : 40 $^{\circ}$ C

Ion mode : ESI (positive)

Source parameters : Gas Temp ($^{\circ}$ C) 300
 Gas Flow (L/min) 5
 Nebulizer (psi) 45
 Capiilary (V) 3500

Injection volume : 5 μ L

Mass parameters :

	Precursor ion	Product ion	Dwell	CE (V)
Emamectin B1a	886.5	302.2	100	27
	886.5	270.0	100	32
	886.5	158.0	100	40
Emamectin B1b	872.5	302.2	100	27
	872.5	158.2	100	40

Mobile phase : 5 mM ammonium formate in water (A), acetonitrile (B)

Run time : 8 min

Time	Flow rate	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	0.4	80	20
0.5	0.4	80	20
3.0	0.4	5	95
5.0	0.4	5	95
7.0	0.4	80	20
8.0	0.4	80	20

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ดำเนินการทดลอง ปี 2563 จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม
 ปี 2564 จังหวัดกาญจนบุรีและนครปฐม ระหว่างเดือนมีนาคม-กรกฎาคม
 ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
 กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. แปลงทดลอง

พ่นวัตถุมีพิษ emamectin benzoate 1.92% EC ในแปลงทดลองย่อย treated plot ตามอัตราแนะนำคือ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ พ่นทุก 7 วัน จำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน ปริมาณวัตถุมีพิษที่ลงในแปลงทดลองสามารถหาได้จากประสิทธิภาพการพ่นสาร ซึ่งจะคำนวณจากเวลาในการพ่นสารเทียบกับ target time โดยทั้ง 3 แปลงทดลองมีประสิทธิภาพการพ่นสารอยู่ในเกณฑ์การยอมรับระหว่าง 97-101% (Table 1)

Table 1 Efficiency of test substance apply per plot.

Trial	Efficiency of test substance (%)	
	1 st application	2 nd application
1	100	101
2	97	100
3	101	101

2. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

วิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามี %recovery อยู่ในช่วง 81-105% และ %RSD อยู่ในช่วง 6-11% (Table 2) ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (SANTE, 2017) และความเข้มข้นต่ำสุดของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง ที่สามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Limited of quantification; LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Table 2 Result of method validation of emamectin benzoate in stink weed.

Concentration (mg/kg)	%recovery	average of %recovery	%RSD
0.01*	94, 90, 85, 87, 96, 105, 94, 98	94	7
0.1	91, 84, 86, 85, 88, 100, 96, 92	90	6
0.5	81, 82, 99, 104, 99, 101, 81, 84	91	11

* Limited of quantification; LOQ

3. ปริมาณสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งจากแปลงทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งจากแปลงทดลองที่พ่นสารตามอัตราแนะนำ พบว่าหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ระยะเก็บเกี่ยว 0 ถึง 14 วัน มีปริมาณสารพิษตกค้างลดลงตามระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นแนวโน้มเดียวกันทั้ง 3 แปลงทดลอง โดยจะเห็นว่าปริมาณสารพิษตกค้างที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ 0 และ 1 วัน การสลายตัวของสารพิษตกค้างเกิดขึ้นค่อนข้างรวดเร็ว ในขณะที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ 3 ถึง 14 วัน การสลายตัวของสารพิษตกค้างจะคงที่โดยมีปริมาณสารพิษตกค้างน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นการสลายตัวแบบ exponential (Figure 2) โดยแปลงทดลองที่ 1 พบว่าสารพิษตกค้างมีปริมาณน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตั้งแต่ระยะเก็บเกี่ยวที่ 1 วัน ส่วนแปลงทดลองที่ 2 และ 3 มีปริมาณสารพิษตกค้างน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเก็บเกี่ยว 3 วัน (Table 3) และตัวอย่างจากแปลงควบคุม (untreated plot) ทั้ง 3 แปลง มีปริมาณสารพิษตกค้าง emamectin benzoate น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่ามีการสลายตัวของ emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งเมื่อจำนวนวันหลังการเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามประเทศไทย และ Codex ยังไม่มีการกำหนดค่า MRL ของ emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งหรือในกลุ่มพืชสมุนไพร (FAO/WHO, 2021) แต่สหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่นได้กำหนดค่า EU MRL (EU, 2022) และ Japan MRL (JFCRF, 2021) ของ emamectin

benzoate ในกลุ่มพืชสมุนไพร เท่ากับ 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่า MRL ของสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่นที่ใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงชั่วคราว จะเห็นว่าที่ระยะเก็บเกี่ยว 1 วัน ปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งทั้ง 3 แปลง มีค่าน้อยกว่า 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยกว่า MRL ของทั้งสองประเทศ แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณากำหนดค่า MRL นั้น จะต้องนำปริมาณสารพิษตกค้างที่ได้ไปประเมินความเสี่ยงจากการบริโภค (Risk assessment for dietary intake) ทั้งแบบเฉียบพลัน (Acute) และแบบเรื้อรัง (Chronic) ก่อนที่จะนำมาพิจารณากำหนดค่า PHI โดยจะต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากที่สุด

Table 3 Total residue of emamectin benzoate in stink weed.

Day after last application (DALA)	Total residue of emamectin benzoate (mg/kg)		
	Trial 1	Trial 2	Trial 3
0	0.04	0.05	0.03
1	<0.01	0.01	0.01
3	<0.01	<0.01	<0.01
5	<0.01	<0.01	<0.01
7	<0.01	<0.01	<0.01
10	<0.01	<0.01	<0.01
14	<0.01	<0.01	<0.01

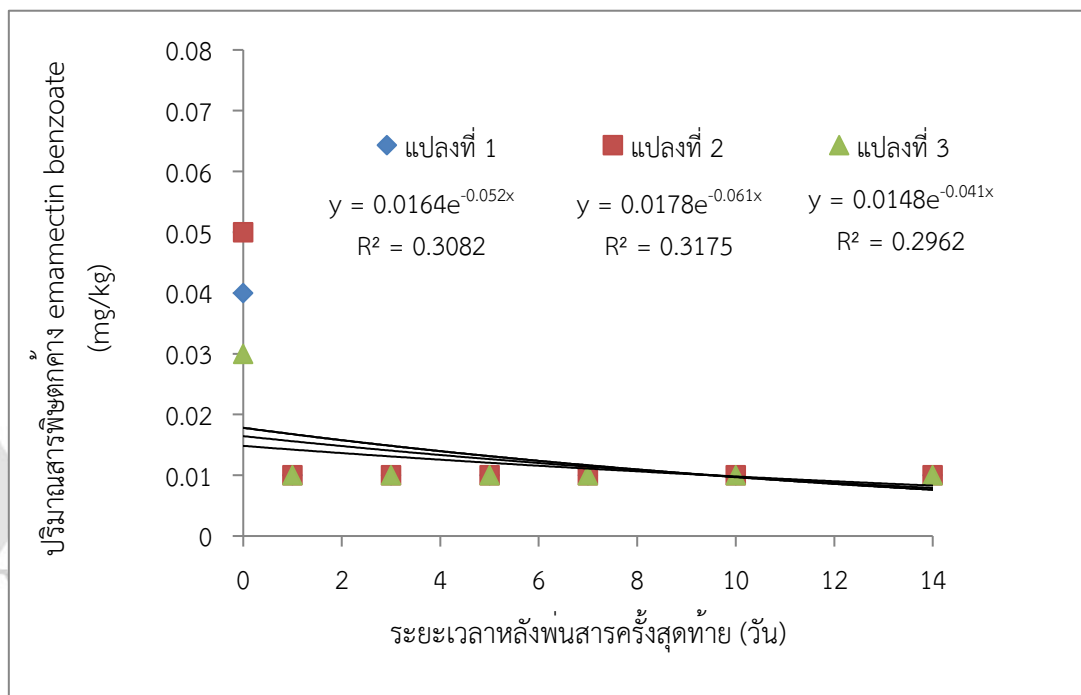


Figure 2 Trend line of decline study on emamectin benzoate in stink weed.

4. ความคงตัว (storage stability) ของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง

จากการทดสอบสภาวะการสลายตัวหรือความคงตัวระหว่างการเก็บรักษา (storage stability) ของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง ที่ระยะเวลา 0 ถึง 360 วัน โดย spiked สารมาตรฐาน emamectin benzoate ลงในตัวอย่างผักชีฝรั่งที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็ง (Freezer) ที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C เมื่อถึงระยะเวลาที่ศึกษานำตัวอย่างมาสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) และควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ในชุดของการทดสอบตัวอย่าง (procedural recovery) เปรียบเทียบ %recovery ของตัวอย่าง storage stability กับ procedural recovery ที่สกัดภายในวันเดียวกัน เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละสารพิษตกค้างที่เหลืออยู่ของ emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งที่เก็บไว้ตั้งแต่ 0 ถึง 360 วัน อยู่ในช่วง 83-91% (Table 4) กล่าวคือสารพิษตกค้างต้องไม่สลายตัวไปเกินกว่า 30% ของความเข้มข้นที่ศึกษาหรือค่าเฉลี่ยร้อยละสารพิษตกค้างที่เหลืออยู่ต้องมากกว่า 70% (FAO, 2016) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถเก็บตัวอย่างผักชีฝรั่งที่มีสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate ไว้ได้นาน 360 วัน ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C โดยไม่มีการสลายตัวของสารพิษตกค้าง

Table 4 Result of storage stability study on emamectin benzoate in stink weed.

Storage interval (Day)	Procedural recovery (%)		Residues in stored spiked samples (mg/kg)		Average uncorrected residues remained (%)
	Replicate	Replicate	Replicate	Replicate	
	1	2	1	2	
0	88	90	0.091	0.086	89
14	86	92	0.087	0.085	86
30	89	89	0.087	0.088	88
60	97	99	0.090	0.091	91
90	92	93	0.083	0.090	87
120	88	85	0.091	0.084	88
180	99	89	0.085	0.083	84
360	102	103	0.081	0.085	83

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ


จากการทำแปลงทดลองและศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างหรือ MRL โดยทำการทดลองแบบ supervised residue trials ทั้งหมด 3 แปลงทดลอง ระหว่างปี 2562 ถึง 2564 มีหลักการปลูกพืชแบบ GAP (Good Agricultural Practice) มีหลักการบันทึก และการทำงานในห้องปฏิบัติการแบบ GLP (Good Laboratory Practice) พ่นวัตถุมีพิษตามอัตราแนะนำ คือ emamectin benzoate 1.92% EC ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ พ่นวัตถุมีพิษห่างกัน 7 วัน จำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย สุ่มเก็บตัวอย่างผักชีฝรั่งที่ระยะ 0 1 3 5 7 10 และ 14 วัน นำตัวอย่างจากแปลงควบคุม (untreated plot) และแปลงทดลอง (treated plot) มาสกัดด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2018) และวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ (LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งมีการสลายตัวเมื่อจำนวนวันหลังการเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น โดยตัวอย่างจากแปลงทดลองทั้ง 3 แปลง มีปริมาณสารพิษตกค้างอยู่ระหว่างน้อยกว่า 0.01 ถึง 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ตัวอย่างจากแปลงควบคุมมีปริมาณสารพิษตกค้างน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำปริมาณสารพิษตกค้างของแต่ละวันมาพิจารณาเทียบกับค่า MRL ของสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่นที่ใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงชั่วคราว พบว่าที่ระยะเก็บเกี่ยว 1 วัน ปริมาณสารพิษตกค้างของ emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งทั้ง 3 แปลง มีค่าน้อยกว่า 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยกว่า MRL ของทั้งสองประเทศ และจากการศึกษาความคงตัวของสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง พบว่ามีความคงตัวนานถึง 360 วัน ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ± 5 °C โดยไม่เกิดการสลายตัวของสารพิษตกค้าง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในผักชีฝรั่งที่ได้จากการทำแปลงทดลองนี้ สามารถนำไปประกอบการพิจารณากำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด ไม่ว่าจะเป็ค่า MRL ของประเทศไทย ASEAN MRL และ Codex MRL เพื่อใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงในการผลิต การค้า และการควบคุมตรวจสอบผักชีฝรั่งที่ผลิต นำเข้า และส่งออก
2. จากการศึกษาการสลายตัวของ emamectin benzoate ในผักชีฝรั่ง ทำให้ทราบอัตราแนะนำที่ใช้กับพืชและระยะเวลาการเก็บเกี่ยว (PHI) ซึ่งสามารถนำข้อมูลไประบุนบนฉลากหรือคำแนะนำการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตร เพื่อให้เกษตรกรนำสารนี้ไปใช้ได้อย่างถูกต้องและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2553. *คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูศัตรูพืช ปี 2553*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 303 หน้า
- กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2560. *คู่มือการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 53 หน้า
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2559. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9045-2016. *การจัดกลุ่มสินค้าเกษตร: พืช CLASSIFICATION OF AGRICULTURAL COMMODITIES: CROP*. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 117 หน้า
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2559. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9045-2016. *สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด PESTICIDE RESIDUES: MAXIMUM RESIDUE LIMITS*. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 55 หน้า

- 
- EN15662. 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.*
- European Commission. 2022. Eu Pesticides Database. *Pesticide residue(s) and maximum residue levels (mg/kg).* [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=details&pest_res_ids=2931&product_ids=&v=1&e=search.pr (25 มกราคม 2565).
- FAO. 2016. *Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed.* 3rded. FAO Plant Production and Protection Paper 225. 286p
- FAO/WHO. 2021. *Codex Alimentarius International Food Standard.* [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=247 (25 มกราคม 2565).
- JMPR. 2005. *Joint FAO/JMPR Meeting on Pesticide Residues.* [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/RepoRe11/Emamectin.pdf (15 มกราคม 2565).
- SANTE. 2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.*
- The Japan Food Chemical Research Foundation. 2021. *Residue Limits of Agricultural Chemicals.* [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา https://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=11900 (25 มกราคม 2565).