วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของลูเฟนนูรอน (lufenuron) ในกะเพรา เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง

Pesticide Residue Trial of Lufenuron in Holy Basil to Establish Maximum Residue Limit

วิชุตา ควรหัตร์ *วาเลนไทน์ เจือสกุล* *ชนิตา ทองแซม*

Wichuta Kuanhut *Valentine Juasakul* *Chanita Thongsam*

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The study on the fate of lufenuron residues in holy basil using of the pesticide according to Good Agricultural Practices (GAP) was conducted through supervised field trials completed in accordance with FAO Plant Production and Protection Paper 225. The three field trials of lufenuron in holy basil including the 1st trial conducted during January – February, 2020 in Mueang Nakhon Pathom District, Nakhon Pathom Province, the 2nd trial conducted during March – April, 2021 in Tha Muang District, Kanchanaburi Province and the 3rd trial conducted during June – July, 2021 in Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province. Holy basil of the treated plot was sprayed with lufenuron 5% W/V EC at recommended dose (10 mL/water 20 L) and 120 L/rai of water to compare with an untreated plot (not sprayed). Each of field trial was done 2 applications of spraying in every 7 days. Two samples of fresh holy basil were collected from each of the untreated plot and treated plot after last application to analyze lufenuron residues using LC-MS/MS. The results showed that the untreated samples were not found lufenuron residue at all but the treated samples were found it all field trials. The field trial no. 1 was found lufenuron residues in holy basil amount 1.25, 1.21, 0.66, 0.40, 0.29, 0.20, 0.07 mg/kg at 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 days after last application, respectively. In the same way, the field trial no. 2 was found 2.27, 1.58, 0.95, 0.37, 0.21, 0.10, 0.02 mg/kg at 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 days after last application, respectively and not found it at 21 days after last application. Finally, the residues for the field trial no. 3 were 3.22, 2.85, 2.02, 1.75, 0.80, 0.29, 0.22, 0.04 mg/kg at 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 days after last application, respectively.

Keywords : lufenuron, holy basil, residue

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของลูเฟนนูรอน (lufenuron) ในกะเพรา ใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรตามหลักวิธีปฏิบัติทางเกษตรที่ดีและเหมาะสม (Good Agricultural Practice; GAP) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 แปลงทดลอง ได้แก่ แปลงทดลองที่ 1 อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม ระหว่างเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ 2563 แปลงทดลองที่ 2 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน 2564 และแปลงทดลองที่ 3 อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม 2564 ในการทดลองแต่ละครั้ง วางแผนการทดลองแบบ Supervised Residue Trial ตามหลักเกณฑ์ FAO Plant Production and Protection Paper 225 ประกอบด้วย 2 แปลงย่อย คือ แปลงที่ไม่มีการพ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตร (untreated plot) ใช้เป็นแปลงควบคุม และแปลงที่พ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ทดลอง (treated plot) ตามอัตราแนะนำ โดยการพ่น lufenuron 5% W/V EC ในอัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่น 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน อัตราการใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่าง (replication) ภายหลังจากการพ่นสารครั้งสุดท้าย เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS พบว่าแปลงที่ไม่มีการพ่น lufenuron (untreated plot) ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างในทุกตัวอย่างของแปลงทดลอง ส่วนแปลงที่พ่น lufenuron (treated plot) ตามอัตราแนะนำ สำหรับแปลงทดลองที่ 1 มีปริมาณสารพิษตกค้าง lufenuron ในกะเพราเท่ากับ 1.25, 1.21, 0.66, 0.40, 0.29, 0.20 และ 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ตามลำดับ แปลงทดลองที่ 2 เท่ากับ 2.27, 1.58, 0.95, 0.37, 0.21, 0.10, 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ตามลำดับ แต่ที่ระยะเวลา 21 วัน ไม่พบ lufenuron ตกค้าง และแปลงทดลองที่ 3 เท่ากับ 3.22, 2.85, 2.02, 1.75, 0.80, 0.29, 0.22 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ตามลำดับ

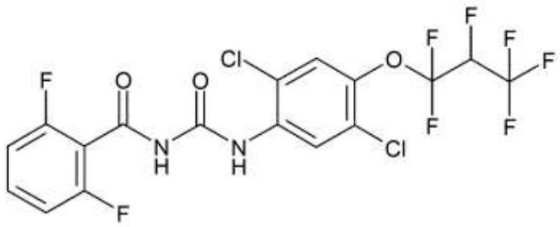
คำหลัก : ลูเฟนนูรอน กะเพรา สารพิษตกค้าง

คำนำ

กะเพรา (holy basil) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum tenuiflorum* L. จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae เป็นไม้ล้มลุก มีลักษณะทรงพุ่มคล้ายๆ กับแมงลักและโหระพา ใบมีลักษณะเป็นรูปใบไข่ ปลายแหลมหรือมน ขอบใบหยักหรือคลื่น ช่อดอกเป็นแบบช่อฉัตร มักแยกแขนง โคนช่อย่อย มีใบประดับขนาดเล็ก รูปไข่ ก้านดอกยาว 2-4 มิลลิเมตร มีขนสำหรับผล เป็นแบบผลแห้งไม่แตก มีกลีบเลี้ยงติดทนและขยายใหญ่โอบรอบผล เมล็ด มีลักษณะรูปรี ยาว 1-1.5 มิลลิเมตร พอง และเป็นเมือกเมื่อถูกน้ำ กะเพรามี 2 พันธุ์ คือ กะเพราขาว มีลำต้นและใบสีเขียว กลีบดอกสีขาว และกะเพราแดง มีลำต้น และใบสีม่วงแดง ดอกสีขาวหรือสีขาวปนสีม่วงแดง ตามตำรายาไทยกล่าวว่า กะเพราแดงมีรสเผ็ดร้อนแรงกว่ากะเพราขาว ส่วนองค์ประกอบหลักในใบกะเพรา เป็นน้ำมันระเหยง่าย (volatile oil) พบได้ถึงร้อยละ 2 น้ำมันระเหยง่ายนี้ประกอบด้วยกลุ่มสารเทอร์ฟินอยด์ (terpenoids) ที่สำคัญ เช่น ยูจีนอล (eugenol), เมทิลยูจินอล (methyl eugenol), แอลฟา-แคริโอฟิลลีน (α-careyophyllene) และบีตา-แคริโอฟิลลีน (β-caryophyllene) เป็นต้น ซึ่งชนิดของสารและปริมาณขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มแทนนิน (tannins) และเมทิลชาวิคอล (methyl chavicol) เป็นต้น กะเพรามีเขตการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนทั่วโลก พบได้ตามพื้นที่ราบต่ำไปจนถึงที่สูง 1,200 เมตร และในประเทศไทยพบได้ทั่วทุกภาค (สำนักงานจัดการกัญชาและกระท่อมทางการแพทย์แผนไทย, 2562) กะเพราเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย นำเงินตราเข้าประเทศปีละหลายสิบล้านบาท ส่งออกไปยังสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ทั้งในรูปของผักสดและอบแห้ง สร้างรายได้ให้กับผู้ส่งออกของไทย ถึงแม้ว่ากะเพราของไทยจะมีมูลค่าการส่งออกมากในแต่ละปี แต่เรื่องการส่งออกมักประสบปัญหาด้านแมลงศัตรูพืช และปัญหาสารพิษตกค้าง ซึ่งประเทศผู้นำเข้าเข้มงวดในการนำเข้าผักสดเป็นอย่างมาก โดยเน้นตรวจแมลงศัตรูพืชที่อาจติดมากับผักสด เพื่อป้องกันการแพร่ขยายพันธุ์ในประเทศ และตรวจสอบปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชหรือสารพิษตกค้างในผักสด เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่ละประเทศจึงมีมาตรการกำหนดระดับสารปนเปื้อนของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชหรือกำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRLs – Maximum Residue Limits) ไว้ในพืชสำหรับใช้เป็นเกณฑ์ในการนำเข้าผักสด

(สิรินาฏ, 2554) และสำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2556) ดังนั้นการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช และการศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างในกะเพรา เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง จึงมีความสำคัญ แมลงศัตรูพืชที่สำคัญในกะเพรา ได้แก่ เพลี้ยไฟโหระพา (thrips) แมลงหวี่ขาวยาสูบ (tobacco whitefly) หนอนชอนใบ (leafminer) เพลี้ยอ่อนฝ้าย (cotton aphid) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm) เป็นต้น (กลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2560)

ลูเฟนนูรอน (lufenuron) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1 เป็นสารป้องกันกำจัดแมลงประเภทดูดซึมที่สามารถกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ในวงกว้าง โดยออกฤทธิ์ต่อตัวอ่อนของแมลง ซึ่ง lufenuron จะยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินผ่านการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ เพื่อไม่ให้ตัวอ่อนสามารถลอกคราบได้ ทำให้ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวแก่ต่อไปได้ ส่วนความเป็นพิษของ lufenuron นั้น มีความเป็นพิษต่ำ เมื่อทดสอบทั้งทางปาก ผิวหนัง และการหายใจกับหนู และทำให้เกิดระคายเคืองต่อตาและผิวหนังของกระต่ายน้อยมาก สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในตัวอย่างกะเพรา เพื่อกำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) และระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัย (Pre Harvest Interval; PHI) จะพิจารณาตามคำจำกัดความสารพิษตกค้างของโคเด็กซ์ (Codex residue definition) คือ For compliance with MRL and for estimation of dietary intake for plant and animal commodities: lufenuron หมายความว่า จะวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างและรายงานผลในรูปของ lufenuron นั่นเอง (JMPR, 2015)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของลูเฟนนูรอน (lufenuron)
ที่มา: JMPR, 2015

lufenuron เป็นสารที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญในกะเพรา นั่นคือ หนอนเจาะสมอฝ้าย ซึ่งสามารถกัดกินได้ทุกส่วนของต้นพืช ทั้งใบและดอก ทำให้เกิดความเสียหายมากกว่า 50% และหนอนขนาดใหญ่มีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงสูงอีกด้วย (กลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2560) ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาการสลายตัวของ lufenuron ในกะเพรา จะได้มีข้อมูลสารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา สำหรับพิจารณากำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในกะเพราของประเทศไทย (Thai MRL) และกำหนดระยะเวลาที่ปลอดภัยในการเก็บเกี่ยว (Pre Harvest Interval; PHI) เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องพ่นวัตถุมีพิษทางการเกษตรด้วยมอเตอร์แบบเครื่องยนต์สะพายหลัง (motorized knapsack sprayer) และอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (Personal Protective Equipment; PPE)

2. อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในแปลงทดลอง ได้แก่ ป้ายปักแปลง เชือกฟาง หมุดหัวน็อต นาฬิกาจับเวลา เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้นแบบดิจิตอล เครื่องวัดความเร็วลม เครื่องบันทึกอุณหภูมิ (data logger) กระดาษวัดค่า pH (universal test paper) กระบอกตวงพลาสติกขนาด 1-2 ลิตร ถังน้ำ จอบ ถุงเก็บตัวอย่าง และกลองโฟม

3. เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง เครื่องบดตัวอย่าง (food processor) เครื่องผสมตัวอย่าง (vortex mixer) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ตู้แช่แข็ง (deep freezer) และเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างชนิด Liquid Chromatography equipped with Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) ยี่ห้อ Agilent Technologies, LC รุ่น 1290 infinity, MS/MS รุ่น 6460 Triple Quad และคอลัมน์ Kinetex 2.6 µm XB-C18 100 Å, size 100 x 2.1 mm

4. อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ บีกเกอร์ (beaker) ขวดปริมาตร (volumetric flask) หลอดปั่น (centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ตัวกรองสำหรับกระบอกฉีดยา (syringe filter) ชนิด PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร กระบอกฉีดยา (syringe) อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลายระดับไมโครลิตร (micropipette) ชุดกรองสารละลาย (filtration assembly) และautosampler vial

5. วัตถุมีพิษทางการเกษตรที่ใช้พ่น คือ lufenuron 5% W/V EC (ชื่อการค้า แมทช์)

6. สารมาตรฐาน lufenuron ความบริสุทธิ์ 98.97% และ98.56% (Dr. Ehrenstorfer)

7. สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ acetonitrile (ACN), LC-MS water, magnesium sulphate anhydrous ($MgSO_4$), sodium chloride (NaCl), tri-sodium citrate dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), di-sodium hydrogencitrate sesquihydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$), primary secondary amine (PSA), carbon SPE bulk sorbent (GCB), ammonium formate (NH_4HCO_2) formic acid (HCO_2H) และไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

วิธีการ

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง

1.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างในตัวอย่างกะเพราจากแปลงทดลอง ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา ตัวที่บ่งชี้ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) นั่นคือ การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (%recovery) โดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างกะเพรา (fortified sample) ที่ไม่มีสารพิษตกค้างของ lufenuron ซึ่งศึกษา %recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LOD) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของสารวิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ ซึ่งมีความถูกต้องและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (Limit of Quantitation; LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และที่ระดับความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 2.00 และ4.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ หาช่วงของวิธีทดสอบ (working range) โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนแกน y และความเข้มข้นของ fortified sample บนแกน x โดยค่า coefficient of determination (R^2) ไม่น้อยกว่า 0.990

1.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง โดยวิธีวิเคราะห์ QuEChERS Method (EN 15662, 2008)

1) ชั่งตัวอย่างกะเพราปั่นละเอียด ตัวอย่างละ 10±0.10 กรัม ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร (เติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่าง) เติมน้ำ 3.00 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) ทิ้งไว้ 10 นาที นำตัวอย่างออกจากตู้แช่แข็ง เติม acetonitrile จำนวน 10 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer 1 นาที

2) เติม magnesium sulphate anhydrous 4.00 กรัม sodium chloride 1.00 กรัม tri-sodium citrate dihydrate 1.00 กรัม และdi-sodium hydrogencitrate sesquihydrate 0.50 กรัม ลงในตัวอย่าง ปิดฝาแล้วเขย่าทันทีด้วย vortex mixer 1 นาที

3) นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 5 นาที

4) กำจัดสิ่งปนเปื้อน (dispersive-SPE clean up) โดยใช้ micropipette ดูดสารละลายส่วนใส (ส่วนบน) ของตัวอย่างจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม primary secondary amine 0.125 กรัม anhydrous magnesium sulfate 0.750 กรัม และcarbon SPE bulk sorbent 0.038 กรัม ปิดฝาแล้วเขย่าทันทีด้วย vortex mixer 1 นาที

5) นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 5 นาที

6) กรองสารละลายส่วนใส (ส่วนบน) ผ่าน syringe ที่ต่อกับ PTFE syringe filter ขนาด 0.20 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวด auto sampler vial แล้วจึงนำไปตรวจเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง lufenuron ในตัวอย่างกะเพราด้วยเครื่อง LC-MS/MS

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 และ 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยสารละลายจากการสกัดตัวอย่างกะเพรา (matrix) ซึ่งใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการเตรียม

V_1 = ปริมาตรของสารละลายตั้งต้น V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการเตรียม

1.4 ปรับสภาวะการทำงานในส่วนต่างๆ ของเครื่อง LC-MS/MS มีรายละเอียด ดังตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 สภาวะสำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน lufenuron ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

LC Parameter	**Condition**
Injection volume (µL)	5.00
Column type	Kinetex 2.6 µm XB-C18 100 Å, size 100 x 2.1 mm
Column temperature (°C)	40
Mobile phase A	5 mM ammonium formate in water + 0.01% formic acid
Mobile phase B	acetonitrile (ACN)
Mobile phase flow rate (mL/min)	0.45
Total run time (min)	8.00
Post time (min)	2.00
MS QQQ Parameter	**Value**
Ion source	ESI, positive mode
Gas temperature (°C)	300
Gas flow rate (L/min)	11
Nebulizer (psi)	35
Capillary (V)	4,000
Dalta EMV	400

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของ mobile phase ที่ใช้

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	50	50
3	2	98
4	2	98
5	50	50
6	50	50

ตารางที่ 3 รายละเอียดการตั้งค่า MS/MS

Compound name	Precursor ion	Product ion	Dwell time	Fragmentor (V)	Collision energy (V)	Cell accelerator voltage (V)
lufenuron	510.9	158	120	138	20	2
	510.9	141	120	138	45	2

2. การทำแปลงทดลอง

2.1 สำรวจแปลงเกษตร และเลือกพื้นที่ทำแปลงทดลอง จำนวน 3 แปลง โดยแต่ละแปลงทดลองดำเนินการในพื้นที่และเวลาที่ต่างกันดังนี้

แปลงทดลองที่ 1 ต.หนองปากโลง อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม เดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ 2563

แปลงทดลองที่ 2 ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี เดือนมีนาคมถึงเมษายน 2564

แปลงทดลองที่ 3 ต.ทุ่งบัว อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม เดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม 2564

แต่ละแปลงทดลองมีระยะทางห่างกันไม่น้อยกว่า 30 กิโลเมตร พื้นที่ของแปลงย่อยที่ทำการทดลองต่างกัน ให้ผลผลิตเพียงพอต่อการเก็บเกี่ยวครั้งสุดท้าย

2.2 วางแผนการศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างในแปลงทดลองแบบ Supervised Residue Trial ตามหลักเกณฑ์ FAO Plant Production and Protection Paper 225 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016) ซึ่งประกอบด้วย 2 แปลงย่อย คือ แปลงที่ไม่มีการพ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตร (untreated plot) ใช้เป็นแปลงควบคุม และแปลงที่พ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ทดลอง (treated plot) ตามอัตราแนะนำ โดยการพ่น lufenuron 5% W/V EC ในอัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่น 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน (กลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2560) และอัตราการใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ (กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2553) ซึ่งคิดเป็น 3 กรัมของสารออกฤทธิ์ต่อไร่

2.3 ปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

1) ตรวจสอบอัตราการไหลของเครื่องพ่น (calibrated discharge rate) ก่อนทำการทดลองเพื่อนำไปคำนวณเวลาที่ใช้ในการพ่น (target time) และทดสอบจังหวะการเดินของผู้พ่น (speed calibration) ได้แก่ เดินขณะไม่มีอุปกรณ์พ่นสาร เดินพร้อมอุปกรณ์พ่นสาร และเดินพ่นน้ำ จนได้เวลาตามที่กำหนด เพื่อควบคุมการพ่นให้มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งแปลง

2) ตรวจสอบสภาพภูมิอากาศ ได้แก่ อุณหภูมิและค่า pH ของน้ำ อุณหภูมิและความชื้นของอากาศ อุณหภูมิดิน เก็บดินเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ และวัดความเร็วลม

3) พ่น lufenuron 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน โดยใช้เครื่องพ่นวัตถุมีพิษทางการเกษตรด้วยมอเตอร์แบบเครื่องยนต์สะพายหลัง (motorized knapsack sprayer) ซึ่งแต่ละแปลงทดลองใช้วิธีการพ่นทางใบ (foliar application) โดยมีระยะเวลาในการพ่นสาร ดังนี้

แปลงทดลองที่ 1 พ่นสารในวันที่ 14 และ 21 มกราคม พ.ศ. 2563

แปลงทดลองที่ 2 พ่นสารในวันที่ 11 และ 18 มีนาคม พ.ศ. 2564

แปลงทดลองที่ 3 พ่นสารในวันที่ 15 และ 22 มิถุนายน พ.ศ. 2564

4) สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่าง จากแปลงทดลองทั้ง untreated plot และtreated plot ภายหลังจากการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ระยะเวลา 0 (หลังการพ่นสารอย่างน้อย 2 ชั่วโมง) 1, 3, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน (สำหรับ 21 วัน เก็บตัวอย่างเพิ่มสำหรับแปลงทดลองที่ 2 และ3 เท่านั้น) ตามลำดับ แต่ละตัวอย่างสุ่มเก็บน้ำหนักอย่างน้อย 1 กิโลกรัม โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ บรรจุตัวอย่างในถุงพลาสติกและใช้ยางรัดให้แน่น แช่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่าง และใส่ data logger ลงไปในถังน้ำแข็ง สำหรับบันทึกอุณหภูมิ แล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับทำการสกัดสารพิษตกค้างในตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างกะเพราปั่นกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (food processor) ตักตัวอย่างที่บดละเอียดใส่ถุงพลาสติกและมัดปากถุงให้แน่น แล้วจึงนำถุงตัวอย่างที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) ซึ่งมีอุณหภูมิ -20±5 ºC เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพราต่อไป

3. ทดสอบความคงตัวของสาร (storage stability)

ได้ทดสอบความคงตัว (storage stability) ของสารพิษตกค้าง โดยการเติมสารมาตรฐาน lufenuron ลงในตัวอย่างกะเพราที่ไม่มีสารพิษตกค้าง (fortified sample) ที่ระดับ 10 เท่าของระดับ LOQ (LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) คือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่างครอบคลุมช่วงของการวิเคราะห์ทั้งหมด 360 วัน

วิธีการบันทึกข้อมูล บันทึกข้อมูลในการทำแปลงทดลองลงในแบบฟอร์ม Field Data Book และบันทึกขั้นตอนการดำเนินงานต่างๆ ในการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างลงในแบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

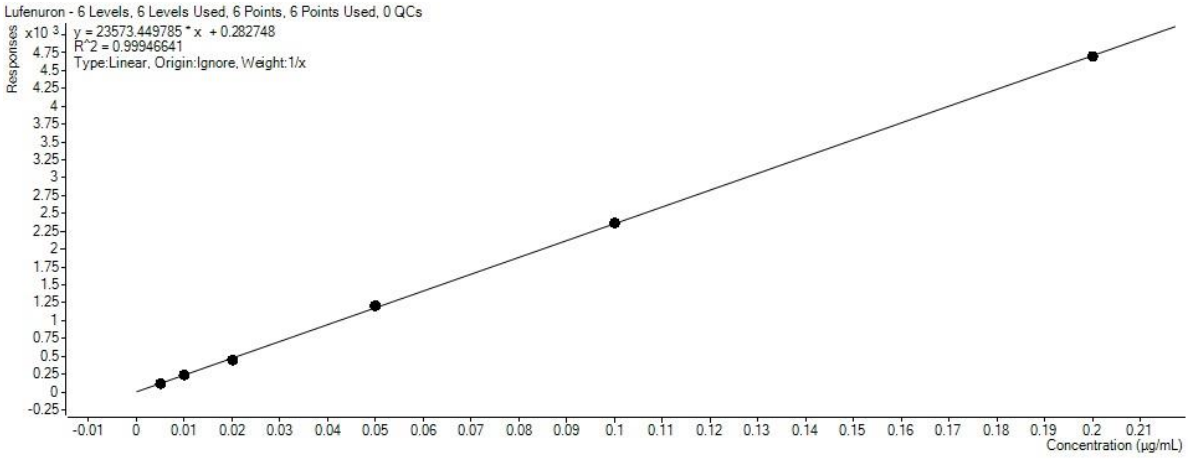
สถานที่ทำการทดลอง

1. แปลงทดลองของเกษตรกรจังหวัดนครปฐม และกาญจนบุรี
2. ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

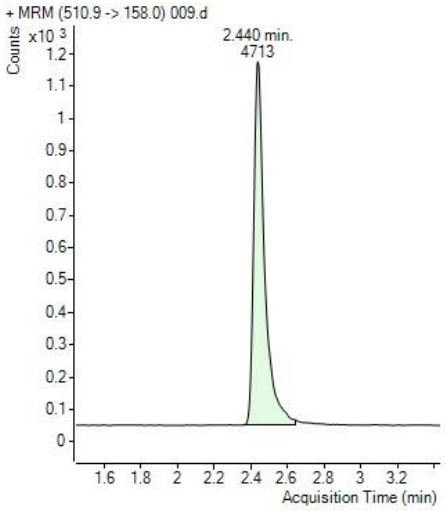
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

จากผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น สามารถนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วงการใช้งานบนแกน x กับสัญญาณจากเครื่องมือ (responses) บนแกน y ซึ่งคำนวณจากพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสาร โดยค่า coefficient of determination (R^2) ไม่น้อยกว่า 0.990 ดังแสดงในภาพที่ 2 สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน ซึ่ง lufenuron มี retention time เท่ากับ 2.44 นาที โดยมีลักษณะโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของ lufenuron ใน matrix กะเพรา

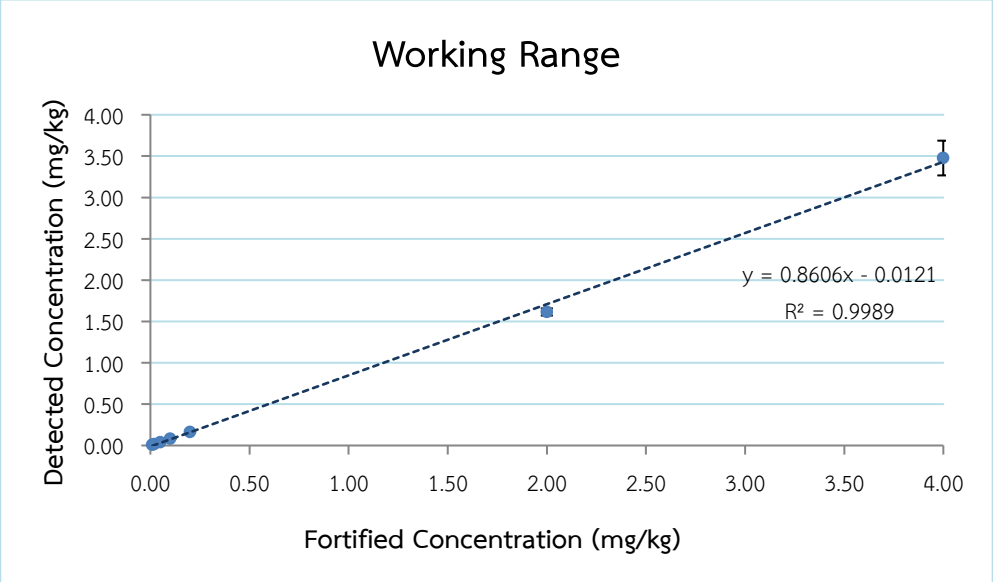


ภาพที่ 3 ลักษณะโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน lufenuron

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา (ตารางที่ 4) พบว่า %recovery ทั้งหมดอยู่ในช่วง 74 - 100% ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 70 - 120% และตัวบ่งชี้ความเที่ยง (precision) คือ การหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation; %RSD) ที่ได้จากการทำซ้ำ พบว่า %RSD อยู่ในช่วง 2.80 - 9.98 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การการยอมรับที่ ≤20% (SANTE/12682/2019, 2020) โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LOD) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นต่ำสุดของสารวิเคราะห์ที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ ซึ่งมีความถูกต้องและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (Limit of Quantitation; LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และช่วงของวิธีทดสอบ (working range) ในช่วง 0.01 - 4.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9989 ดังแสดงในภาพที่ 4 จึงสามารถยืนยันผลการทดสอบได้ว่า วิธีวิเคราะห์นี้ มีความถูกต้อง มีความเที่ยงตรง และมีความน่าเชื่อถือในแต่ละครั้งที่ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในตัวอย่างกะเพรา

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา

Fortification level (mg/kg)	Recovery (%)	%Average recovery	%RSD
0.005	74, 80, 84, 88, 89, 97, 97, 98, 99, 100	91	9.98
0.01	83, 85, 86, 87, 87, 89, 89, 90, 92, 95	88	3.96
0.02	76, 77, 79, 82, 82, 82, 87	81	4.62
0.05	77, 78, 79, 79, 81, 85, 86	81	4.33
0.10	74, 79, 81, 81, 87, 89, 91	83	7.30
0.20	77, 79, 80, 80, 84, 89, 89	83	5.89
2.00	78, 79, 80, 81, 81, 82, 85	81	2.80
4.00	78, 83, 85, 86, 90, 92, 93	87	6.16



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และความเข้มข้นของ fortified sample สำหรับช่วงของวิธีทดสอบ (working range)

2. ปริมาณสารพิษตกค้างจากแปลงทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา พบว่า ตัวอย่างจาก untreated plot ของทั้ง 3 แปลงทดลอง ตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง ส่วนตัวอย่างจาก treated plot ที่พ่นวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ทดลองตามอัตราแนะนำ สำหรับแปลงทดลองที่ 1 ตรวจพบปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา เท่ากับ 1.25, 1.21, 0.66, 0.40, 0.29, 0.20 และ 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ตามลำดับ แปลงทดลองที่ 2 เท่ากับ 2.27, 1.58, 0.95, 0.37, 0.21, 0.10, 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ตามลำดับ แต่ที่ระยะเวลา 21 วัน ไม่พบ lufenuron ตกค้าง และแปลงทดลองที่ 3 เท่ากับ 3.22, 2.85, 2.02, 1.75, 0.80, 0.29, 0.22 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และในแต่ละแปลงทดลองที่ทำการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างกะเพรา มีการประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ (Quality Assurance; QA) ด้วยการทำ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับ 0.01 (LOQ), 0.05, 0.20 และระดับเดียวกันกับปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่ตรวจพบในตัวอย่างกะเพรา ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ เพื่อคำนวณหา %concurrent recovery ซึ่งผล %concurrent recovery พบว่า อยู่ในช่วง 71 - 111 (ตารางที่ 6) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ 70 – 120

ตารางที่ 5 ปริมาณสารพิษตกค้าง lufenuron ในกะเพราจาก treated plot ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายของแปลงทดลองที่ 1-3

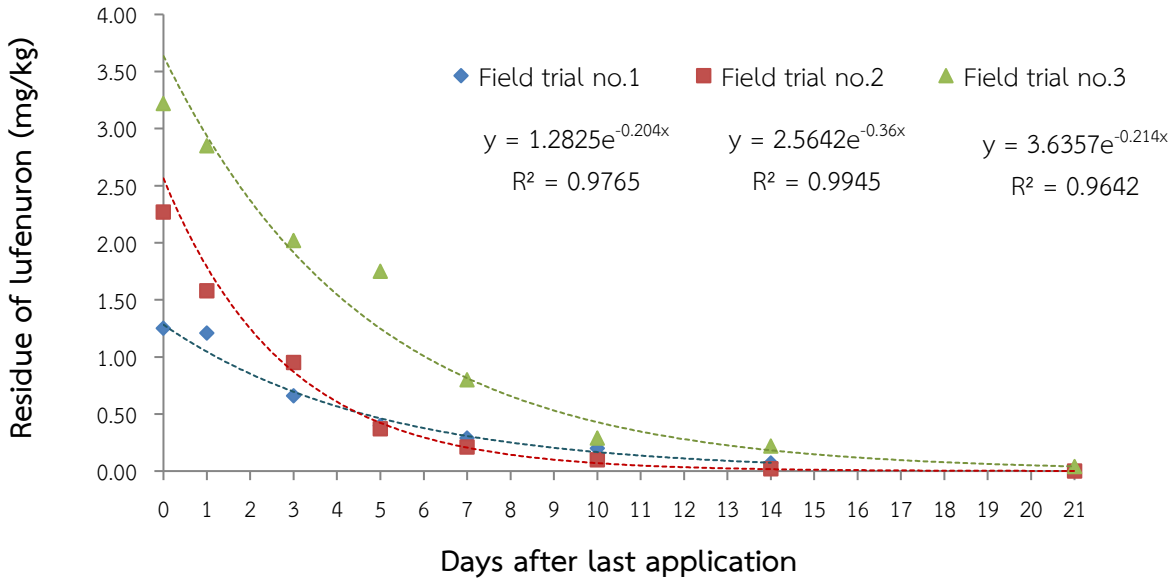
Days after last application	Residue of lufenuron (mg/kg)								
	Field trial no.1			Field trial no.2			Field trial no.3		
	Rep.1	Rep.2	Average	Rep.1	Rep.2	Average	Rep.1	Rep.2	Average
0	1.22	1.28	1.25	2.20	2.35	2.27	3.18	3.27	3.22
1	1.03	1.40	1.21	1.51	1.66	1.58	3.02	2.69	2.85
3	0.68	0.64	0.66	0.97	0.92	0.95	2.11	1.93	2.02
5	0.39	0.40	0.40	0.38	0.36	0.37	1.58	1.91	1.75
7	0.30	0.29	0.29	0.24	0.17	0.21	0.92	0.68	0.80
10	0.20	0.20	0.20	0.09	0.10	0.10	0.29	0.29	0.29
14	0.05	0.08	0.07	0.02	0.03	0.02	0.22	0.22	0.22
21	-	-	-	ND	ND	ND	0.03	0.04	0.04

หมายเหตุ ND = Not detected
LOD = 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และLOQ=0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
Rep. = Replication ของการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 6 %Concurrent recovery ในการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง lufenuron ในกะเพราของแปลงทดลองที่ 1-3

Fortification level (mg/kg)	Concurrent recovery (%)		
	Field trial no.1	Field trial no.2	Field trial no.3
0.01	85, 97	71, 74	86, 106
0.05	82, 106	71, 87	86, 90
0.20	86, 94	92, 96	98, 98
1.50	101, 111	-	-
2.00	-	80, 85	-
4.00	-	-	85, 92

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้นี้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron กับระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่างๆ หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย ดังแสดงในภาพที่ 5 จากกราฟ จะเห็นว่า ความชันของกราฟน้อย ปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในตัวอย่างกะเพราของทั้ง 3 แปลงทดลอง มีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ เมื่อระยะเวลาเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น การที่อัตราการสลายตัวของ lufenuron ในกะเพราค่อนข้างช้า เนื่องจากกะเพรามีขนสามารถกักเก็บวัตถุอันตรายที่พ่นไว้ ทำให้อัตราการสลายตัวของ lufenuron ค่อนข้างช้า



ภาพที่ 5 กราฟแสดงการสลายตัวของปริมาณสารพิษตกค้าง lufenuron ในกะเพราที่ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่างๆ หลังการพ่นการสารครั้งสุดท้ายของแปลงทดลองที่ 1-3

เมื่อพิจารณาค่า Codex MRL ของ lufenuron ในกะเพรา MRL ยังไม่มีการกำหนด รวมทั้งประเทศอื่นๆ มีเพียงแต่ทางคณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ได้กำหนดค่า MRL ของ lufenuron (any ratio of constituent isomers) ในตระกูลกะเพราและดอกไม้ที่กินได้ (Basil and edible flowers) เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ ที่เรียกว่า lower limit of analytical determination ใช้เป็นค่าอ้างอิง MRL ของทางคณะกรรมาธิการยุโรปเท่านั้น (European commission, 2020) และได้ทำการประเมินความเสี่ยงในการบริโภคเบื้องต้น เพื่อประเมินค่า PHI โดยนำค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Highest Residue : HR) และค่ามัธยฐานปริมาณสารพิษตกค้าง (Supervised Trial Median Residue : STMR) ของแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายมาประเมินความเสี่ยงจากการบริโภคแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังว่าปลอดภัยหรือไม่ โดยเทียบกับค่าอ้างอิงใน JMPR ของ lufenuron ซึ่งระบุว่า Acute Reference Dose (ARfD) ไม่มีความจำเป็น (unnecessary) และ Acceptable Daily Intake (ADI) เท่ากับ 0-0.02 mg/kg bw (JMPR, 2015) เมื่อทำการประเมินแล้วจะอยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์ หากมีค่าน้อยกว่า 100% หมายถึงปริมาณสารพิษตกค้างในตัวอย่างปลอดภัยต่อผู้บริโภค จากผลการประเมิน พบว่า หลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 3 วัน ได้ %ADI ประมาณ 2% และ%ARfD เท่ากับ 0% ทุกช่วงวัย ดังนั้นหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 3 วัน จึงเป็นระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัย แต่อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดค่า MRL ของ lufenuron ในกะเพรา และค่า PHI (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2559) ดังนั้นกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง จะได้นำข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้างที่ได้จากการทดลองนี้เสนอต่อคณะกรรมการวิชาการพิจารณาสินค้าเกษตร สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อพิจารณากำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) ของประเทศไทย และระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัย (PHI) ต่อไป

3. ผลการทดสอบความคงตัวของสาร

ผลการทดสอบความคงตัวของ lufenuron ในกะเพรา ซึ่งมีระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่างครอบคลุมช่วงของการวิเคราะห์ทั้งหมด 360 วัน ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า lufenuron ยังมีความคงตัวของสารตลอดระยะเวลา 360 วัน หรือ 1 ปี โดยมีเปอร์เซ็นต์ของสารพิษตกค้างที่ยังคงเหลืออยู่ในกะเพรา (%residue remained) เท่ากับ 81, 102, 80, 95, 104, 108 และ 93 ที่ระยะเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 180 และ 360 วัน นับจากวันที่เติมสารลงในกะเพรา ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับ 70-120

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความคงตัว (storage stability) ของ lufenuron ในกะเพรา

Fortification level (mg/kg)	Storage interval (days)	Concurrent recovery (%)	Residue in stored fortified sample (mg/kg)	Average uncorrected residue remained (%)
0.10	0	88, 73	0.0802, 0.0816	81
	30	99, 112	0.1014, 0.1027	102
	60	91, 81	0.0842, 0.0765	80
	90	90, 94	0.0960, 0.0946	95
	120	70, 83	0.1058, 0.1031	104
	180	70, 99	0.1088, 0.1067	108
	360	98, 104	0.0924, 0.0927	93

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

ในการศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของลูเฟนนูรอน (lufenuron) ในกะเพรา เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง ทำให้ได้ข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้างในกะเพราทั้งหมด 3 แปลง ตัวอย่างจาก untreated plot ทั้งหมดตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง ส่วนตัวอย่างจาก treated plot มีปริมาณสารพิษตกค้างของ lufenuron ในกะเพรา ค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ และได้ทำการประเมินความเสี่ยงในการบริโภคเบื้องต้นของแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายมาประเมินความเสี่ยงจากการบริโภคแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังว่าปลอดภัยหรือไม่ โดยเทียบกับค่าอ้างอิง Acute Reference Dose (ARfD) และAcceptable Daily Intake (ADI) ใน JMPR พบว่า หลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 3 วัน ได้ %ADI ประมาณ 2% และ%ARfD เท่ากับ 0% ทุกช่วงวัย ดังนั้นหลังการพ่นสารครั้งสุดท้ายที่ 3 วัน จึงเป็นระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัย อย่างไรก็ตามข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้างที่ได้จากการทดลองนี้ จะนำเสนอเพื่อพิจารณากำหนดเป็นค่า MRL ของประเทศไทย และระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัย (PHI) เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงในการส่งออกสินค้าและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลไปกำหนดระยะเวลาเก็บเกี่ยวกะเพราที่ปลอดภัย (Pre Harvest Interval; PHI) ตามอัตราการใช้ที่แนะนำ ซึ่งสามารถใช้เป็นคำแนะนำในการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตรและเป็นคำแนะนำในฉลากวัตถุอันตรายทางการเกษตร
2. เสนอข้อมูลไปพิจารณากำหนดค่า Thai MRL, ASEAN MRL และCodex MRL

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรกรมวิชาการเกษตร. 2553. ***คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช ปี 2553.*** พิมพ์ครั้งที่ 17. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2560. ***คู่มือป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชสำหรับการผลิตผักเพื่อการส่งออกสหภาพยุโรป (ฉบับปรับปรุงแก้ไขเพิ่มเติม).*** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

สิรินาฏ พรศิริประทาน. 2554. “การส่งออกผักและผลไม้สดไทยไปสหภาพยุโรป.” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://thaifranchisedownload.com/dl/group12720130102143938.pdf (14 ตุลาคม 2564).

สำนักงานจัดการกัญชาและกระท่อมทางการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2562. ***สมุนไพรในตำรับยาแผนไทยที่ประกาศกำหนดให้เป็นตำรับยาเสพติดให้โทษประเภท ๕ ที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่ที่อนุญาตให้เสพเพื่อรักษาโรคหรือการศึกษาวิจัยได้ ตามแนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดตำรับยาเสพติดให้โทษประเภท ๕ ที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่ ที่ให้เสพเพื่อรักษาโรคหรือการศึกษาวิจัยได้ พ.ศ. ๒๕๖๒.*** นนทบุรี : กระทรวงสาธารณสุข.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2559. ***มาตรฐานสินค้าเกษตร สารพิษตกค้าง : ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (มกษ. 9002 – 2559).*** กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. 2556. “ปัญหาการนำเข้าสินค้าผักสดจากไทยมายังสหราชอาณาจักรและสหภาพยุโรป.” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.ditp.go.th/contents_attach/74293/74293.pdf (14 ตุลาคม 2564).

EN 15662. 2008. ***Foods of plant origin-determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method.*** UK : British Standards Institution.

European commission. 2020. “EU Pesticides Database.” [Online]. Available : https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides- database/mrls/?event=search.pr (2022, January 15).

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. Rome : FAO.

JMPR. 2015. Lufenuron. Pesticide Residues in Food 2015. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Report, 2015. ***FAO Plant Production and Protection Paper.*** 223 : 271-287.

SANTE/12682/2019. 2020. ***Analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.*** Health&Consumer Protection Directorate-General, European Commission.