วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของเมทอกซีฟีโนไซด์ (methoxyfenozide) ในกะเพรา เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง

Pesticide Residue Trial of Methoxyfenozide in Holy basil to Establish Maximum Residue Limit [MRL]

ชนิตา ทองแซม *ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร* *วีระสิงห์ แสงวรรณ*

Chanita Thongsam *Piyasak Akcaboot* *Weerasing Sangwan*

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The study on the methoxyfenozide in Holy basil after the use of pesticide according to Good Agricultural Practice (GAP) was conducted through 3 supervised field trials in accordance with the FAO Plant Production and Protection Paper 225. The first supervised field trial conducted January-March 2020 in Nakhon Pathom province the second supervised field trial conducted March-May 2021 in Kanchanaburi province and the third supervised field trial conducted June-August, 2021 in Nakhon Pathom province. Methoxyfenozide 15% w/v EC with concentration of 10 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, 14 and 21 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 methoxyfenozide in Holy basil was 0.01 mg/kg and the set of result showed that were found of methoxyfenozide residue 11.16 10.01, 3.35, 2.52, 1.36 and 0.13 mg/kg at 0, 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days in Nakhon Pathom province, 8.51, 5.50, 2.34, 0.51,0.18, 0.093, 0.015 and <LOQ at 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days in Kanchanaburi province and 6.51, 5.40, 4.18, 3.85, 2.02, 1.77, 0.15 and 0.061 mg/kg at 0, 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days in Nakhon Pathom province

Keywords: methoxyfenozide**,** Holy basil

บทคัดย่อ

ศึกษาปริมาณของสารพิษตกค้างเมทอกซีฟีโนไซด์ (methoxyfenozide) ในกะเพรา หลังการใช้วัตถุมีพิษทางการเกษตรอย่างถูกต้องตามหลักปฏิบัติทางการเกษตรดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice: GAP) โดยทำแปลงทดลองแบบ supervised trial ตาม FAO Plant Production and Protection Paper 225 จำนวน 3 การทดลอง การทดลองครั้งที่ 1 ตำบลหนองปากโลง อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม ในช่วงเดือนมกราคมเดือนเมษายน 2563 การทดลองครั้งที่ 2 ตำบลทุ่งทอง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม 2564 การทดลองครั้งที่ 3 ตำบลทุ่งบัว อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม 2564 ทำการทดลองโดยวิธีการพ่นวัตถุอันตราย methoxyfenozide 24% W/V SC ในอัตราแนะนำ ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ ทุก 7 วัน รวม 2 ครั้ง และสุ่มเก็บตัวอย่างกะเพราเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างที่ 0 1 3 5 7 10 14 และ 21 วัน หลังจากพ่นสารครั้งสุดท้าย โดยสุ่มตัวอย่าง 2 ซ้ำต่อวัน ตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งวิธีวิเคราะห์มีค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการตรวจวิเคราะห์ methoxyfenozide ในตัวอย่างกะเพราจากแปลงทดลอง พบว่า การทดลองครั้งที่ 1 พบปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 11.16 10.01 3.35 2.52 1.36 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ 0 1 3 5 7 10 และ 14 วัน ตามลำดับ การทดลองครั้งที่ 2 พบปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 8.51 5.50 2.34 0.51 0.18 0.093 0.015 และ น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ 0 1 3 5 7 10 14 และ 21 วัน ตามลำดับ และการทดลองครั้งที่ 3 พบปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 6.51 5.40 4.18 3.85 2.02 1.77 0.15 และ 0.061 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ 0 1 3 5 7 10 14 และ 21 วัน ตามลำดับ

คำหลัก: เมทอกซีฟีโนไซด์ กะเพรา

คำนำ

กะเพราเป็นพืชผักสวนครัวที่ในอดีตปลูกเพื่อการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น แต่ปัจจุบันมีการส่งออกจำหน่ายยังประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก เช่น ในประเทศญี่ปุ่นที่มีการนำเข้าพืชผักสวนครัวจากประเทศไทยมากกว่า 200 ตันต่อปี นอกจากนี้ยังส่งไปจำหน่ายยังประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป(European Union: EU) โดย EU เป็นตลาดส่งออกของผักและผลไม้ที่สำคัญของไทย พืชผักที่ส่งออก เช่น กะเพรา โหระพา แมงลัก ผักชีฝรั่ง พริก โดยสินค้าเหล่านี้ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ใน กิจการร้านอาหารไทยในต่างประเทศ เป็นการสนับสนุนนโยบาย “ครัวไทยสู่ครัวโลก” ซึ่งทางสหภาพยุโรปได้มีกฎระเบียบของสหภาพยุโรป Commission Regulation (EC) No. 669/2009 ประกาศควบคุมอย่างเข้มงวดในการนำเข้าสินค้าอาหาร และอาหารสัตว์ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชที่จัดว่าเป็นสินค้าที่มีความเสี่ยงสูงจากประเทศนอกสหภาพยุโรปบางประเทศ โดยการนำเข้าสินค้าผักสดจากไทยที่เข้าข่ายต้องถูกตรวจสอบตามกฎระเบียบดังกล่าวถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มสินค้าผักสดที่มีปัญหาการตกค้างของยาฆ่าแมลง คือ พริกสด ผักชี โหระพา ถั่วฝักยาว มะเขือ และกะหล่ำ และกลุ่มสินค้าผักสดที่มีปัญหาปนเปื้อนเชื้อ Salmonella คือ ผักชี ใบโหระพา และใบสะหระแหน่ โดยสินค้าผักดังกล่าวจะถูกกักเพื่อสุ่มตรวจการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชว่าสูงกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) ดังนั้นการลดปริมาณเพลี้ยไฟ หนอนชอนใบ และแมลงหวี่ขาว ให้มีปริมาณน้อยที่สุด และไม่มีปัญหาสารพิษตกค้างต่าง ๆ ก่อนนำผลผลิตเข้าไปในโรงคัดบรรจุ เป็นการพัฒนาระบบการผลิตกะเพราให้เป็นไปตามมาตรฐานของสหภาพยุโรปกำหนด จากการสำรวจแมลงศัตรูพืชกะเพรา โหระพา แมกลัก ผักชี พบแมลงศัตรูสำคัญ ได้แก่ เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว หนอนแมลงวันชอนใบ เพลี้ยอ่อน หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนม้วนใบ (สัญญาณี, 2559)

หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Helicoverpa armigera* (Hubner) ชื่อสามัญอื่นๆ ได้แก่ หนอนเจาะสมออเมริกัน และหนอนเจาะผล เป็นศัตรูสำคัญของพืชผัก พืชไร่และไม้ผลหลายชนิด กัดกินใบ ดอก หรือเจาะฝัก หนอนกัดกินทุกส่วนของต้นพืชทำให้เกิดความเสียหายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หนอนขนาดใหญ่ (วัย 4-5) มีความต้านทานต่อสาฆ่าแมลงสูง พืชอาหาร ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือ ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด ยาสูบ ฝ้าย ปอกระเจา พริก กระเจี๊ยบเขียว หน่อไม้ฝรั่ง กะเพรา ส้มเขียวหวาน มะม่วงหิมพานต์ สตรอเบอรี่

กุหลาบ เบญจมาศ คาร์เนชั่น และเยอบีร่า การป้องกันและกำจัด ถ้าพบหนอนมากกว่า 0.5 ตัวต่อต้น ให้ใช้ lambdacyhalothrin (Karate Zeon 2.5% CS) อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ gammacyhalothrin (Proaxis 1.5% CS) อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ methoxyfenozide (Prodigy 24 % SC) อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ methoxyfenozide (Proclaim1.92% EC) อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ fipronil (Ascend 5 % SC) อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ lufenuron (Math 5%EC) อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ Bacillus thuringiensis (Bactospene FC) อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นติดต่อกัน 2 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน (มานิตา, ม.ป.ป.)

เมทอกซีฟีโนไซด์ (methoxyfenozide) จัดอยู่ในกลุ่ม 18 ตามการแบ่งกลุ่มสารฆ่าแมลงและไรตามกลไกลสารออกฤทธิ์ เป็นสารกลุ่มที่ทำให้ตัวรับฮอร์โมนเอคไดโซนทำงาน มีกลไกลทำงานออกฤทธิ์ต่อระบบการเจริญเติบโต สารกลุ่มนี้ ได้แก่ สารกลุ่มไดเอซิลไฮดราซีน (diacylhydrazines) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของไฮดราซีน (H_2N-NH_2) สารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญเติบโตของแมลง โดยจะไปเหนี่ยวนำให้แมลงเกิดการลอกคราบก่อนเวลาที่สมควร กลไกการออกฤทธิ์ของสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้คือการเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอ็คไดโซน (ecdysone) ที่ทำหน้าที่ในการลอกคราบ โดยโมเลกุลของสารฆ่าแมลงจะไปจับกับตัวรับฮอร์โมนเอ็คไดโซน (ecdysone receptors) ทำให้ตัวรับฮอร์โมนเอ็คไดโซนเกิดการกระตุ้นและทำงานโดยส่งสัญญาณให้ยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบทำงาน (gene expression) ในช่วงจังหวะเวลาที่ไม่เหมาะสม ผลที่ได้คือแมลงมีการสร้างผนังลำตัวใหม่ที่ผิดปกติ ไม่สมบูรณ์แมลงไม่สามารถลอกคราบเก่าออกจากลำตัวได้ ทำให้การลอกคราบผิดปกติและแมลงจะตายในที่สุด สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์กับหนอนผีเสื้อและหนอนด้วง (คณะนักวิจัยกลุ่มบริหารศัตรูพืชและกลุ่มกีฏวะและสัตววิทยา, 2564)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องพ่นวัตถุมีพิษแบบสูบโยกสะพายหลัง
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
4. เครื่อง vortex mixer
5. เครื่องผสมอาหาร (food processer)
6. เครื่อง centrifuge
7. เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ cylinder, beaker และ volumetric flask เป็นต้น
8. เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง Liquid Chromatography - Mass Spectrometer/ Mass-Spectrometer (LC-MS/MS)Triple Quadrupole, Agilent: 7890, MSD: 5973N
9. ใช้ column: Kinetex™ 2.6 µm XB-C18 100 Å, LC Column 100 x 2.1 mm

สารเคมี

1. ผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษ methoxyfenozide 24 % SC (ชื่อการค้า โปรดิจี้ 240 เอสซี)
2. สารมาตรฐาน methoxyfenozide purity 99.0 %
3. sodium citrate dihydrate
4. di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate
5. sodium chloride anhydrous (NaCl)
6. magnesium sulfate (MgSO4)
7. primary secondary amine (PSA)
8. graphite carbon black (GCB)
9. acetonitrile HPLC Grade

10. acetonitrile LC-MS/MS Grade
11. deionized water

วิธีการ

1. ทำแปลงทดลอง

1.1. ทำแปลงทดลองแบบ supevised trial แบ่งแปลงทดลองออกเป็น 2 แปลง ได้แก่ แปลงเปรียบเทียบ (untreated) คือ แปลงที่ไม่พ่นสาร methoxyfenozide และแปลงทดลอง (treated) คือแปลงที่พ่นสาร imethoxyfenozide ซึ่งทั้ง 2 แปลงต้องมีระยะห่างหรือแนวป้องกัน (guard raw) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารจากแปลงทดลองไปสู่แปลงเปรียบเทียบ

1.2. พ่นสาร methoxyfenozide 24% W/V SC อัตราการใช้สารแนะนำ (Recommended dose) 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 10 ลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 120 ลิตรต่อไร่ (กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2553) โดยฉีดพ่นทุกๆ 7 วัน จำนวน 2 ครั้ง ในแปลงทดลอง (treated)

1.3. สุ่มเก็บตัวอย่างทั่วแปลง โดยเว้นห่างจากขอบแปลงระยะ 0.5 เมตร ทั้งสี่ด้าน เก็บจำนวนแปลงละ 2 ตัวอย่าง (replication) น้ำหนักไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม สุ่มตัวอย่าง 2 ซ้ำต่อวัน ที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 10 14 และ 21 วัน ภายหลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากแปลงเปรียบเทียบและแปลงทดลอง ตามลำดับ นำกลับห้องปฏิบัติการเก็บในตู้แช่ตัวอย่างอุณหภูมิ -20°C

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างกะเพราปั่นร่วมกับไนโตรเจนเหลวด้วยเครื่องผสมอาหาร (Food Processor) ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง

3.1. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ methoxyfenozide ในกะเพรา (Method Validation) ปรับจากวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, et al., 2003) ตามคุณลักษณะเฉพาะของวิธี (method performance characteristic) ดังนี้

3.1.1. Working range / Linearity
3.1.2. Accuracy
3.1.3. Precision
3.1.4. Limit of Quantitation (LOQ)
3.1.5. Matrix effect (ME)

3.2. การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide ปรับจากวิธีการ QuEChERS (Anastassiades, et al., 2003) มีขั้นตอนดังนี้

ชั่งตัวอย่างกะเพรา 5 กรัมใส่ใน centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ 10 นาที เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ vortex mixer นาน 1 นาที เติม magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 4 กรัม sodium chloride 1 กรัม sodium citrate dihydrate1 กรัม และ di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัมแล้วเขย่าโดย vortex mixer นาน 1 นาที นำสารละลายที่สกัดได้ไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารละลายส่วนใส 6 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tubes ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี $MgSO_4$ 900 มิลลิกรัม PSA 150 มิลลิกรัม และ GCB 50 มิลลิกรัม เขย่าด้วย vortex mixer นาน 30 วินาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอนใส่ใน vial นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.3. การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS (Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS ชนิด Electrospray Ionization) โดยปรับสภาวะของเครื่อง ให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ความสามารถในการตรวจได้สูงสุด (Optimized condition) ดังนี้

3.3.1. สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC

Column:	KinetexTX 2.6 µm XB-C18 100 A°, 100 x 2.1 mm
Flow rate:	0.4 mL/min
Column Temperature:	40°C
Injection volume:	2.00 µL
Mobile Phase:	A, 5 mM Ammonium formate + 0.1% Formic acid
	B, Acetonitrile
Run time:	11 min

3.3.2. สภาวะการทำงานของเครื่อง MS

Positive mode	
Gas temp:	300°C
Gas flow:	7 L/min
Nebulizer:	45 Psi
Capillary:	4000 v
Precursor ion:	369
Product ion:	313 149 และ 133

ระยะเวลา ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง แปลงกะเพราเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี และ จังหวัดนครปฐม และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

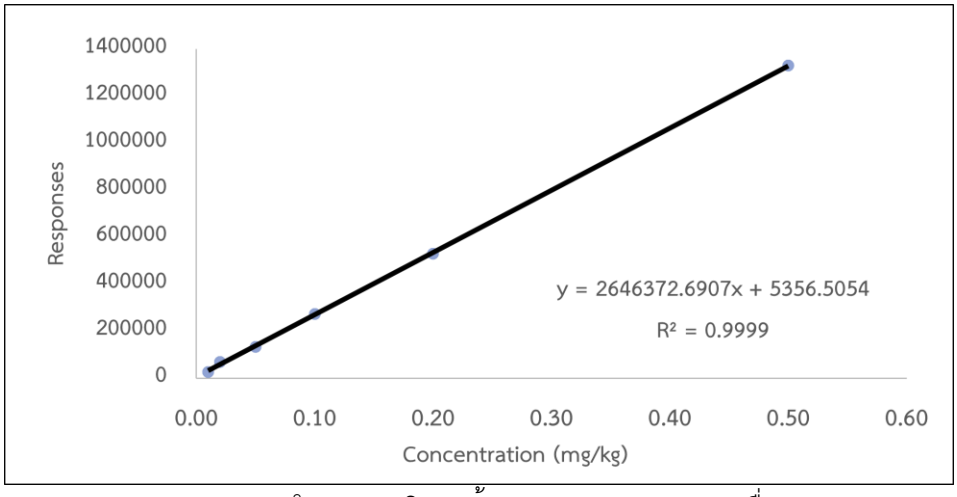
1. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ methoxyfenozide ในกะเพรา (Method Validation) ตามคุณลักษณะเฉพาะของวิธี (method performance characteristic) สรุปได้ดังนี้

1.1 Working range / Linearity

ผลการตรวจสอบ working range จากการ spike สารมาตรฐาน methoxyfenozide ในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ดังตารางที่ 1 นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้น แสดงดังภาพที่ 2 มีค่า Coefficient of Determination (R^2) = 0.9999 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (Eurachem, 2014)

ตารางที่ 1 พื้นที่ใต้พีคของ 6 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง

Fortified (mg/kg)	Responses
0.01	26948
0.02	68321
0.05	133011
0.10	272546
0.20	530123
0.50	1329998

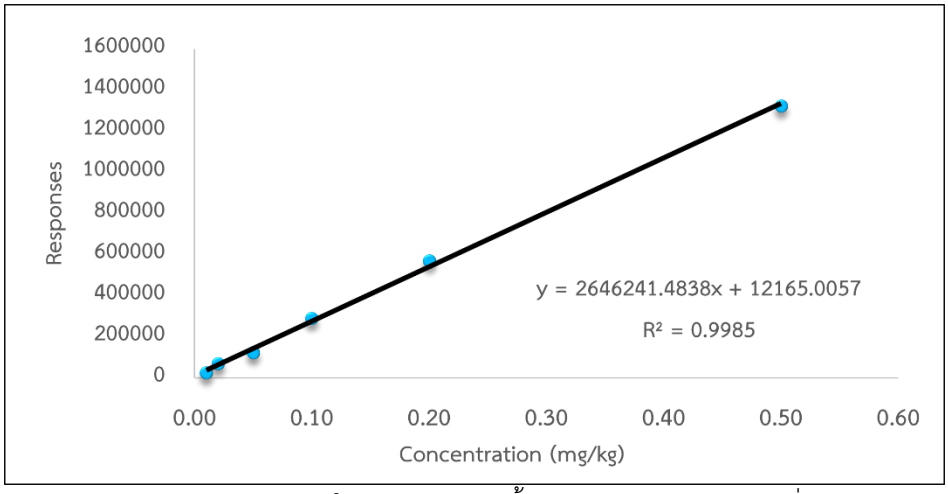


ภาพที่ 1 Coefficient of Determination (R^2) ของสารพิษตกค้าง methoxyfenozide เพื่อตรวจสอบ working range

ผลการตรวจสอบ Linearity จากการ spike สารมาตรฐาน methoxyfenozide ในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แสดงดังตารางที่ 2 นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้น แสดงดังภาพที่ 2 มีค่า Coefficient of Determination (R^2) = 0.9985 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (Eurachem, 2014)

ตารางที่ 2 พื้นที่ใต้พีคของ 6 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง

Fortified	Responses			
(mg/kg)	Replication 1	Replication 2	Replication 3	Average
0.01	26948	26801	25706	26485
0.02	68321	69602	68987	68970
0.05	133011	119005	115259	122425
0.10	272546	299010	297995	289850
0.20	530123	546020	635959	570701
0.50	1329998	1330050	1309706	1323251



ภาพที่ 2 Coefficient of Determination (R^2) ของสารพิษตกค้าง methoxyfenozide เพื่อตรวจสอบ linearity

1.2 Accuracy

ผลการตรวจสอบ Accuracy จากการ spike สารมาตรฐาน methoxyfenozide ในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และคำนวณหา %recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 %recovery อยู่ในช่วง 76-119 ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 %recovery อยู่ในช่วง 88-110 และที่ระดับความเข้มข้น 0.50 %recovery อยู่ในช่วง 89-109 ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งเกณฑ์ %Recovery ที่กำหนดคือ ความเข้มข้น ≥ 1 ถึง < 10 µg/kg เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 60-120 ความเข้มข้น ≥ 10 ถึง < 100 µg/kg เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 70-110 และความเข้มข้น ≥100 µg/kg เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 80-110 (AOAC, 2002) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 %Recovery ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา ความเข้มข้น 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (10 ซ้ำ)

Fortified	%Recovery											
(mg/kg)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Min	Max
0.01	119	83	76	82	83	83	82	88	88	76	76	119
0.10	97	93	89	90	110	108	92	92	88	91	88	110
0.50	89	95	96	1077	107	93	105	109	92	103	89	109

1.3 Precision

ผลการตรวจสอบ precision จากการ spike สารมาตรฐาน methoxyfenozide ในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมิน precision โดยการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (SD) นำมาคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย %RSD ระดับความเข้มข้น 0.01 %RSD เท่ากับ 14.2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 %%RSD เท่ากับ 8.2 และที่ระดับความเข้มข้น 0.50 %RSD เท่ากับ 7.5 ซึ่งผลที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับ คือ มีค่า %RSD น้อยกว่า 20 (European Commission, 2017) ทุกความเข้มข้น

ตารางที่ 4 %RSD ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา ความเข้มข้น 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (10 ซ้ำ)

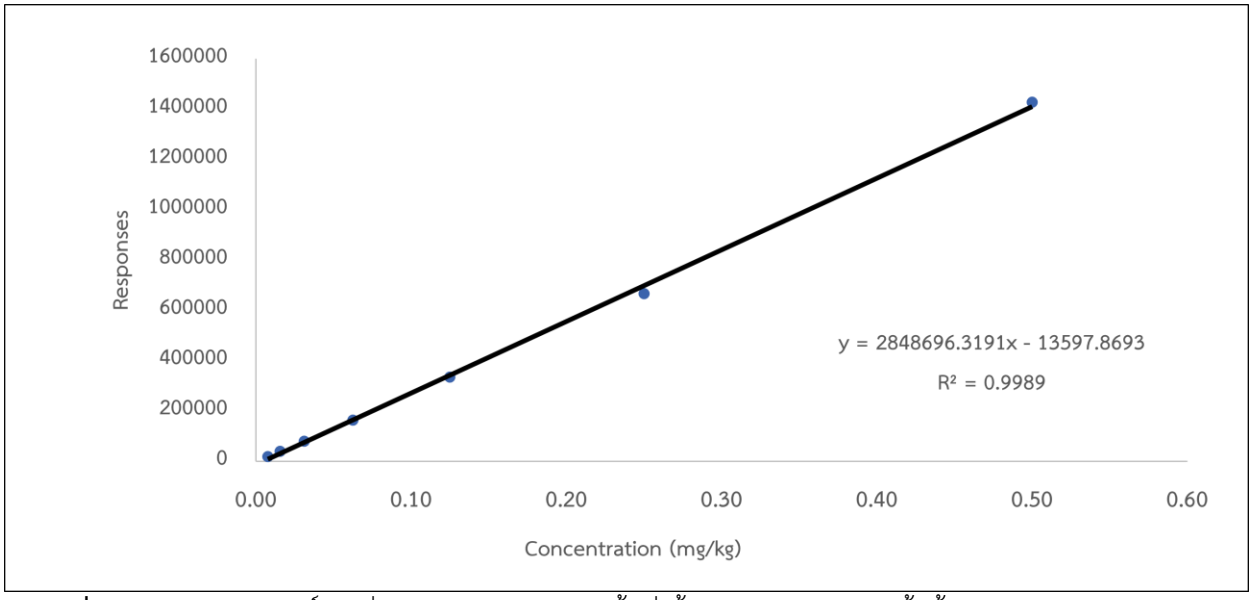
Replication	Concentration (mg/kg)		
	0.01	**0.10**	**0.50**
1	0.012	0.097	0.44
2	0.0083	0.093	0.47
3	0.0076	0.089	0.48
4	0.0082	0.090	0.53
5	0.0083	0.11	0.54
6	0.0083	0.11	0.47
7	0.0082	0.092	0.52
8	0.0088	0.092	0.55
9	0.0088	0.088	0.46
10	0.0076	0.091	0.51
Average	0.0086	0.095	0.50
SD	0.0012	0.0077	0.037
%RSD	14.2	8.2	7.5

1.4 Limit of Quantitation (LOQ)

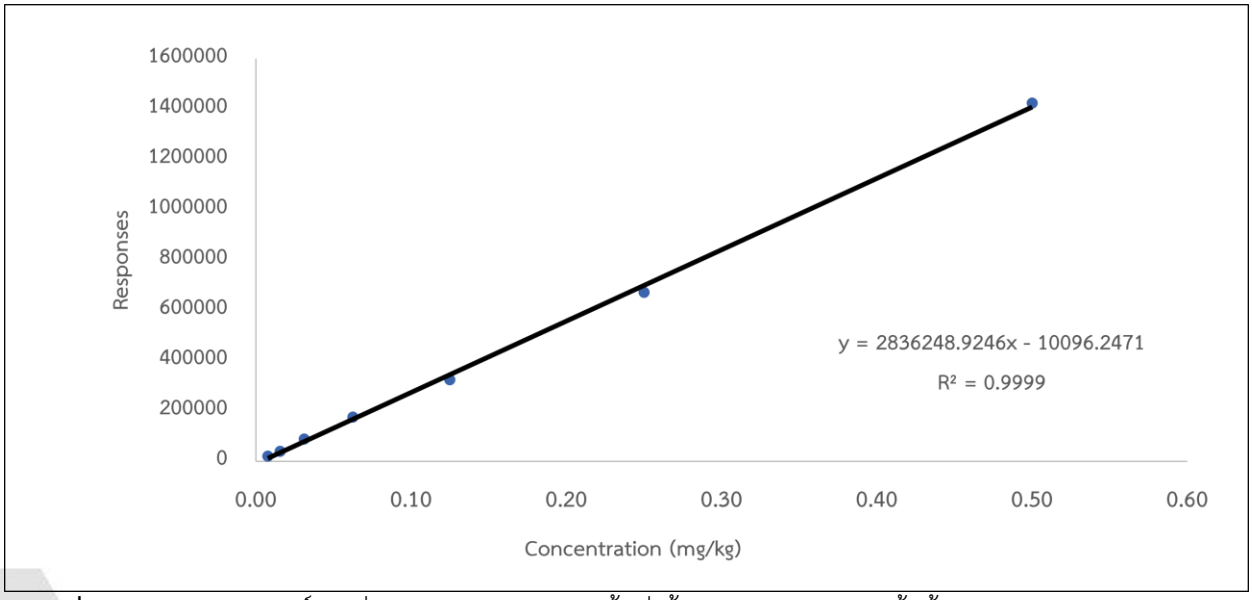
จากการ spike สารมาตรฐาน methoxyfenozide ในตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.01 mg/kg 10 ซ้ำ สามารถประเมิน accuracy และ precision ได้ คือคำนวณ %Recovery อยู่ในช่วง 76-119 และ %RSD เท่ากับ 14.2 ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg สามารถกำหนดเป็นค่า LOQ ได้เนื่องจากสามารถประเมิน accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

1.5 Matrix effect (ME)

ผลการทดสอบ matrix effect จากการนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัด standard in matrix และ standard in solvent มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างบนแกน x แสดงดังภาพที่ 4 และ 5 ตามลำดับ จากนั้นนำความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in matrix และความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in solvent มาคำนวณหา %ME พบว่า วิธีนี้มี %ME เท่ากับ 0.4 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 10% แสดงว่าความชันไม่มีความแตกต่างกัน (NATA, 2018) คือไม่เกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกนกับความเข้มข้นของ standard in matrix



ภาพที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกนกับความเข้มข้นของ standard in solvent

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ methoxyfenozide ในกะเพราจากแปลงทดลอง

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองในแปลงกะเพราของเกษตรพื้นที่ ตำบลหนองปากโลง อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม พบว่าแปลงเปรียบเทียบ มีปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกตัวอย่าง และแปลงทดลองพ่น methoxyfenozide ในกะเพราตามอัตราแนะนำ พบสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ที่ระยะเวลา 0 วันหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย ที่ระยะเวลา 1 3 5 7 10 และ 14 วัน ภายหลังการพ่นครั้งสุดท้าย พบปริมาณสารตกค้าง methoxyfenozide เฉลี่ย 11.16 10.01 3.35 2.52 1.36 และ 0.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แสดงปริมาณสารตกค้าง methoxyfenozide ดังตารางที่ 5

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองในแปลงกะเพราของเกษตรพื้นที่ ตำบลทุ่งทอง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าแปลงเปรียบเทียบ มีปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกตัวอย่าง และแปลงทดลองพ่น methoxyfenozide ในกะเพราตามอัตราแนะนำ พบสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ที่ระยะเวลา 0 วันหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย ที่ระยะเวลา 1 3 5 7 10 14 และ 21 วัน ภายหลังการพ่นครั้งสุดท้าย พบปริมาณสารตกค้าง methoxyfenozide เฉลี่ย 8.51 5.50 2.34 0.51 0.18 0.093 0.015 และ น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แสดงปริมาณสารตกค้าง methoxyfenozide ดังตารางที่ 6

การทดลองที่ 3 ทำการทดลองในแปลงกะเพราของเกษตรพื้นที่ ตำบลหนองปากโลง อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม พบว่าแปลงเปรียบเทียบ มีปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide น้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกตัวอย่าง และแปลงทดลองพ่น methoxyfenozide ในกะเพราตามอัตราแนะนำ พบสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ที่ระยะเวลา 0 วันหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย ที่ระยะเวลา 1 3 5 7 10 14 และ 21 วัน ภายหลังการพ่นครั้งสุดท้าย พบปริมาณสารตกค้าง methoxyfenozide เฉลี่ย 6.51 5.40 4.18 3.85 2.02 1.77 0.15 และ 0.061 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แสดงปริมาณสารตกค้าง methoxyfenozide ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา (การทดลองที่ 1)

ระยะเวลาหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย (วัน)	ปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)					
	แปลงควบคุม			แปลงทดลอง		
	Rep.1	Rep.2	เฉลี่ย	Rep.1	Rep.2	เฉลี่ย
0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10.02	12.29	11.16
1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10.21	9.82	10.01
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3.25	3.45	3.35
5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2.44	2.60	2.52
7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.36	1.36	1.36
10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.85	0.69	0.77
14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.14	0.11	0.13

Rep. = Replication (ซ้ำของการเก็บตัวอย่าง)

LOQ = 0.01 mg/kg

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา (การทดลองที่ 2)

ระยะเวลาหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย (วัน)	ปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)					
	แปลงควบคุม			แปลงทดลอง		
	Rep.1	Rep.2	เฉลี่ย	Rep.1	Rep.2	เฉลี่ย
0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8.46	8.56	8.51
1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6.06	4.94	5.50
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2.51	2.17	2.34
5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.54	0.48	0.51
7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.18	0.18	0.18
10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.10	0.090	0.093
14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.014	0.016	0.015
21	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Rep. = Replication (ซ้ำของการเก็บตัวอย่าง)

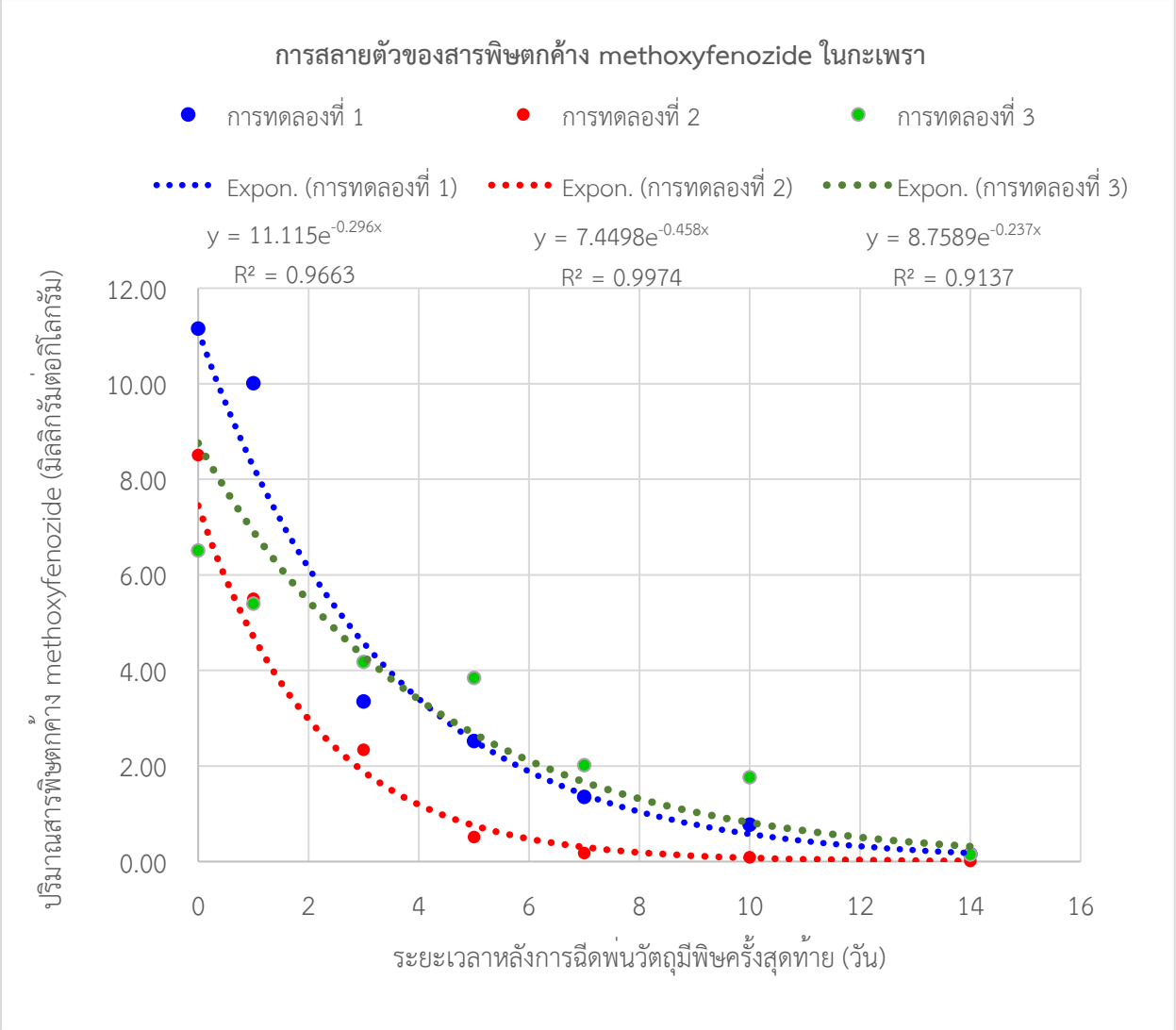
LOQ = 0.01 mg/kg

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา (การทดลองที่ 3)

ระยะเวลาหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย (วัน)	ปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)					
	แปลงควบคุม			แปลงทดลอง		
	Rep.1	Rep.2	เฉลี่ย	Rep.1	Rep.2	เฉลี่ย
0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6.74	6.28	6.51
1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5.80	5.00	5.40
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3.86	4.49	4.18
5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3.97	3.73	3.85
7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.97	2.06	2.02
10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.77	1.76	1.77
14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.15	0.15	0.15
21	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.064	0.058	0.061

Rep. = Replication (ซ้ำของการเก็บตัวอย่าง)

LOQ = 0.01 mg/kg

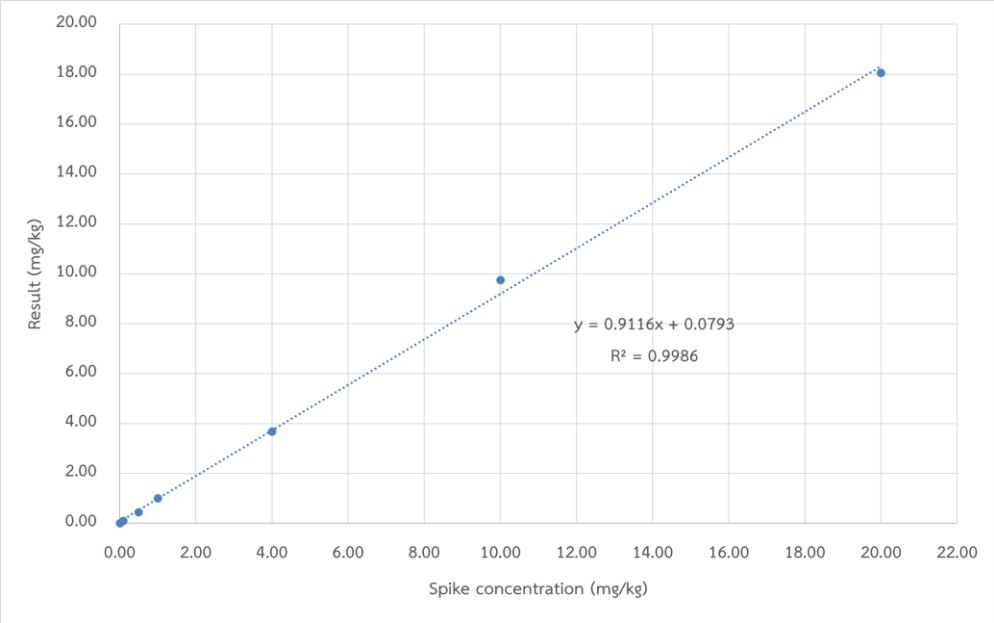


ภาพที่ 3 แสดงการสลายตัวของ methoxyfenozide ในกะเพราของการทดลองครั้งที่ 1 2 และ 3

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพราได้ทำการตรวจสอบการ working range โดยการนำข้อมูลผล Recovery ของการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ (QC) ในแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ดังตารางที่ 8 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณที่วิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นที่เติมลงไป แสดงดังภาพที่ 4 มีค่า Coefficient of Determination (R2) = 0.9986 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (Eurachem, 2014)

ตารางที่ 8 ผลการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา

Spiked concentration (mg/kg)	Result (mg/kg)				
	Recovery 1	Recovery 2	Recovery 3	Average	Standard Deviation
0.010	0.012	0.0083	0.0076	0.0093	0.0023
0.10	0.097	0.093	0.089	0.093	0.0040
0.50	0.44	0.45	0.45	0.45	0.0033
1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	0.0053
4.00	3.66	3.66	3.69	3.67	0.013
10.00	9.80	9.51	9.92	9.74	0.21
20.00	18.06	18.12	17.97	18.05	0.076



ภาพที่ 4 Coefficient of Determination (R^2) การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสลายตัวของ methoxyfenozide ในกะเพรา ในการทดลองครั้งที่ 1 2 และ 3 เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือ สลายตัวลดลงอย่างรวดเร็วหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย 1-7 วัน และค่อยๆลดลง ในที่ 10, 14 และ 21 วันหลังการพ่นวัตถุมีพิษครั้งสุดท้าย เนื่องจาก Codex และประเทศไทย ยังไม่ได้กำหนดค่า MRLs ของ methoxyfenozide ในกะเพรา แต่กลุ่มสหภาพยุโรป(European Union: EU) กำหนดค่า MRLs ในกะเพรา (Holy Basil/tulsi) เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นเมื่อนำข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide ในกะเพรา ทั้ง 3 การทดลอง พิจารณากำหนดค่าระยะเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัยหรือ PHI (Pre Harvest Interval) ประกอบกับค่า EU MRLs จะได้ค่า PHI ที่ 7 วัน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำไปเป็นค่ากำหนดในการเก็บเกี่ยวผลผลิตอย่างถูกต้องและปลอดภัย สำหรับเกษตรกร หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และใช้เป็นค่าแนะนำสำหรับการปลูกพืช ตามหลักปฏิบัติทางการเกษตรดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice: GAP) และนำข้อมูลการสลายตัวของสารพิษตกค้าง เพื่อใช้ประกอบการพิจารณากำหนดค่า Thai MRLs และ Asean MRLs ของ methoxyfenozide ในกลุ่มพืชสมุนไพร

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา. 2553. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2553. เอกสารวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ. 303 หน้า.

คณะนักวิจัยกลุ่มบริหารศัตรูพืชและกลุมกีฏและสัตววิทยา. คำแนะนำการปองกันกำจัดแมลง-สัตวศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยจากงานวิจัย ปี 2564. เอกสารวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์ ไพศาล รัตนเสถียร อัจฉรา หวังอาษา และวรจิต ผาภูมิ. 2548. ประสิทธิภาพและวิธีการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูของพืชผักสวนครัว. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร. หน้า 590-617.

มานิตา คงชื่นสิน. คู่มือการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชสำหรับการผลิตผักเพื่อการส่งออกสหภาพยุโรป(ฉบับปรับปรุง). กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร. หน้า 36-38

สัญญาณี ศรีคชา. แมลงศัตรูพืช กะเพรา โหรพา แมงลัง ผักชี และการป้องกันกำจัด. 2559. กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaher. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Actonitrile Extraction/Paritioning and “Dispersive solid- Phase Extraction” for determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC. Int.86, 412-431.

AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. https://www.aoac.org

Eurachem. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second Edition.

European Commission. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Directorate General for Health and Food Safety. Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. SANTE/11813/2017 21-22 November 2017 rev.0.

FAO Plant Production and Protection Paper 225. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, 2016 Third edition.

NATA. 2018. General Accreditation Guidance-Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. January, Australia.