

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช
2. **โครงการวิจัย** : การศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้และผัก
กิจกรรม : การศึกษาสารพิษตกค้างการสลายตัวของสารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักบริโภคผล (fruiting vegetable) เพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของอิมิดาโคลพรีด (imidacloprid) ในมะเขือ เพื่อ
กำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Residue Trial of Imidacloprid in Eggplant to Establish Maximum
Residue Limit (MRL)
4. **คณะผู้ดำเนินการ**

หัวหน้าการทดลอง	: นายวิทยา บัวศรี	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กปผ.
ผู้ร่วมงาน	: นางสาวศศิมา มั่งนิมิตร	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กปผ.
	นางสาวลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กปผ.
	นางสาวมัลลิกา ทองเขียว	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กปผ.

5. บทคัดย่อ

การวิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของอิมิดาโคลพรีด (imidacloprid) ในมะเขือเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง วางแผนการทดลองแบบ supervised residue trial ทำการทดลอง จำนวน 6 แปลงต่างพื้นที่กัน แปลงที่ 1 อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี แปลงที่ 2 อ.เดิมบางนางบวช จ.สุพรรณบุรี ในปี 2559 แปลงที่ 3 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี แปลงที่ 4 อ.สามโก้ จ.อ่างทอง ในปี 2561 แปลงที่ 5 อ.โพธาราม จ.ราชบุรี และแปลงที่ 6 อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร ในปี 2562 แต่ละแปลงทดลองมี 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองย่อยที่ 1 แปลงควบคุม และการทดลองย่อยที่ 2 พ่นสารตามคำแนะนำ imidacloprid 10% W/V SL อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 100 ลิตรต่อไร่ ดำเนินการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงมะเขือ ก่อนระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตประมาณ 21 วัน โดยพ่นสาร imidacloprid 7 วันต่อครั้ง รวม 3 ครั้ง ก่อนการพ่นสารสอบเทียบอัตราการไหลของเครื่องพ่นให้สม่ำเสมอตามระบบ GLP สุ่มเก็บตัวอย่างผลผลิตจากแปลงทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0 (2 ชั่วโมงหลังการพ่น), 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ภายหลังจากพ่นสารครั้งสุดท้าย นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ imidacloprid ในมะเขือด้วยวิธีการ QuEChERS Alkaline Hydrolysis ซึ่งทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการแล้ว ตรวจสอบด้วยเทคนิค

LC-MS/MS พบว่าเมื่อใช้วัตถุที่มีพิษตามอัตราแนะนำ พบปริมาณสารพิษตกค้างผลรวมของ imidacloprid และเมตาบอไลต์ที่ประกอบด้วย 6-chloronicotinic acid, olefin, 5-hydroxy, dihydroxy และ urea พบว่าปริมาณการตกค้างสูงสุดจากการทดลองในแปลงที่ 1 – 6 ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ดังนี้ 0.21, 0.14, 0.13, 0.09, 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนแปลงควบคุม ตรวจไม่พบสารตกค้างในทุกตัวอย่างของการทดลองทั้ง 6 แปลง ปัจจุบันได้มีการกำหนดค่า Codex-MRL ของ imidacloprid ในมะเขือ เท่ากับ 0.2 mg/kg กลุ่มประเทศสหภาพยุโรปกำหนดค่า EU-MRL ของ imidacloprid ในมะเขือ เท่ากับ 0.5 mg/kg ส่วนในประเทศไทยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ไม่ได้กำหนดค่าสารพิษตกค้างที่กำหนดให้มีในอาหารของไทย (Thai-MRL) ของ imidacloprid ในมะเขือ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของกรมวิชาการเกษตร ระบุให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลังการพ่นสารครั้งสุดท้าย 14 วัน ถือว่ามีความปลอดภัย

คำสำคัญ : อิมิดาโคลพริด, มะเขือ และ สารพิษตกค้าง

Abstract

The study of imidacloprid residue in eggplant was conducted in 6 trial field locations; Si Prachan district Suphan Buri province (trial 1) Doem Bang Nang Buat district Suphan Buri province (trial 2) Tha Muang district Kanchana Buri province (trial 3) Samko district Ang Thong province (trial 4) Photharam district Ratcha Buri province (trial 5) and Krathum Baen district Samut Sakorn province (trial 6). All of filed trials, each consisted of two plots which were treated and untreated with imidacloprid 10% W/V SL at 40 ml/L. The formulation was applied with 3 times to treated plots at 7- day intervals. Eggplant fruits were collected to determine imidacloprid and its metabolite residues using QuEChERS Alkaline Hydrolysis method. Untreated sample were analyzed for imidacloprid and its metabolite residues which was not detected in all cases. Treated samples were collected and determined of their imidacloprid and its metabolite residues at 0, 3, 5, 7, 14 and 21 days after the last application. The samples were found to contain maximum residue in 6 trials of 0.21, 0.14, 0.13, 0.09, 0.04 and 0.02 mg/kg, respectively. Currently, JMPR has set the codex-MRL value of imidacloprid in eggplant to 0.2 mg/kg. EU countries set the EU-MRL value of imidacloprid in eggplant for 0.5 mg/kg. In Japan, the MRL value of imidacloprid in eggplant is 2 mg/kg. For Thailand, the National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards has not set Thai-MRL of imidacloprid in eggplant. When

compared with the information from Department of Agriculture, indicated that the harvest can be done after the final spraying of 14 days, that is safe.

Keyword : Imidacloprid, Eggplant and Maximum Residue Limit (MRL)

6. คำนำ

คณะกรรมการมาตรฐานอาหารสากล โดยองค์การอาหารและเกษตรและองค์การอนามัยโลก (Codex) FAO/WHO เป็นคณะกรรมการที่จัดตั้งขึ้นเพื่อพิจารณากำหนดมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศเพื่อปกป้องคุ้มครองผู้บริโภค และให้เกิดความเป็นธรรมในการค้าระหว่างประเทศ โดยมีประเทศต่างๆ ทั่วโลกเป็นสมาชิกที่เป็นประเทศทั้งสิ้น 176 ประเทศ (สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2555) คณะกรรมการดังกล่าวจะพิจารณาการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างในผลผลิต และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Maximum Residue Limits: MRLs) ซึ่งจะมีการจัดประชุมทุกปีเพื่อพิจารณากำหนดข้อมูลและการยอมรับค่า MRLs ที่ประเทศสมาชิกเสนอ โดยข้อมูลผลการทดลองปริมาณสารพิษตกค้างของประเทศสมาชิกจะต้องทำการศึกษาภายใต้การปฏิบัติการทางการเกษตรที่ดีที่เหมาะสม (GAP) การกำหนดค่าปริมาณสูงสุด MRLs จะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบพืช และชนิดของพืช โดยการทดลองจะต้องทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง ต่างสถานที่หรือต่างฤดูกาล นำข้อมูลปริมาณสารพิษตกค้างที่ได้จากพ่นวัตถุดิบพืชตามอัตราที่หน่วยราชการแนะนำ ที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยวต่างๆ หลังการพ่นครั้งสุดท้าย มาประกอบการพิจารณาร่วมกับข้อมูลศึกษาความเป็นพิษของวัตถุดิบพืชชนิดนั้นๆ

มะเขือเปราะ เป็นพืชผักที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งสามารถทำรายได้ดีไม่แพ้พืชผักตระกูลอื่นๆ สามารถเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดทั้งปี ช่วยเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกอย่างสม่ำเสมอ แต่ต้องมีการปฏิบัติดูแลรักษาและป้องกันแมลงศัตรูที่คอยมาทำลายแมลงที่สำคัญในขณะนี้ ได้แก่ หนอนเจาะผลมะเขือ ซึ่งถ้าหากระบาดอย่างรุนแรงก็ทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหาย คุณภาพต่ำ ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เกษตรกรต้องลงทุนเสียค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับสารฆ่าแมลงที่นำไปใช้พ่นป้องกันกำจัดเป็นมูลค่าสูง ส่วนการพิจารณานำสารฆ่าแมลงชนิดใดหรือวิธีป้องกันอย่างไร ผู้ใช้จำเป็นจะต้องทำการศึกษาและเข้าใจข้อมูลเบื้องต้นให้เข้าใจชัดเจนให้เสียก่อนจึงสามารถนำเอาวิธีการต่างๆ ไปปฏิบัติ เพื่อให้การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะเขือได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ (สมศักดิ์ และคณะ, 2554)

ตารางที่ 1 ชนิดของแมลงศัตรูมะเขือเปราะ และส่วนของพืชที่ถูกทำลาย

ชนิดแมลงศัตรูพืช		ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	
1. หนอนเจาะผลมะเขือ (egg-plant fruitborer)	<i>Leucinodes orbonalis</i> Guenee	เจาะยอดและผลมะเขือ
2. เพลี้ยจักจั่นฝ้าย (cotton leafhopper)	<i>Amrasca biguttula biguttula</i> (Ishida)	ดูดกินน้ำเลี้ยงใบ
3. แมลงหริ่งขาวยาสูบ (tobacco whitefly)	<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	ดูดกินน้ำเลี้ยงใบ
4. เพลี้ยไฟฝ้าย (cotton thrips)	<i>Thrips palmi</i> Karny	ดูดกินน้ำเลี้ยงตาดอก ดอก ยอดอ่อน ขั้วและผลมะเขือ

ที่มา : สมศักดิ์ และคณะ, 2554

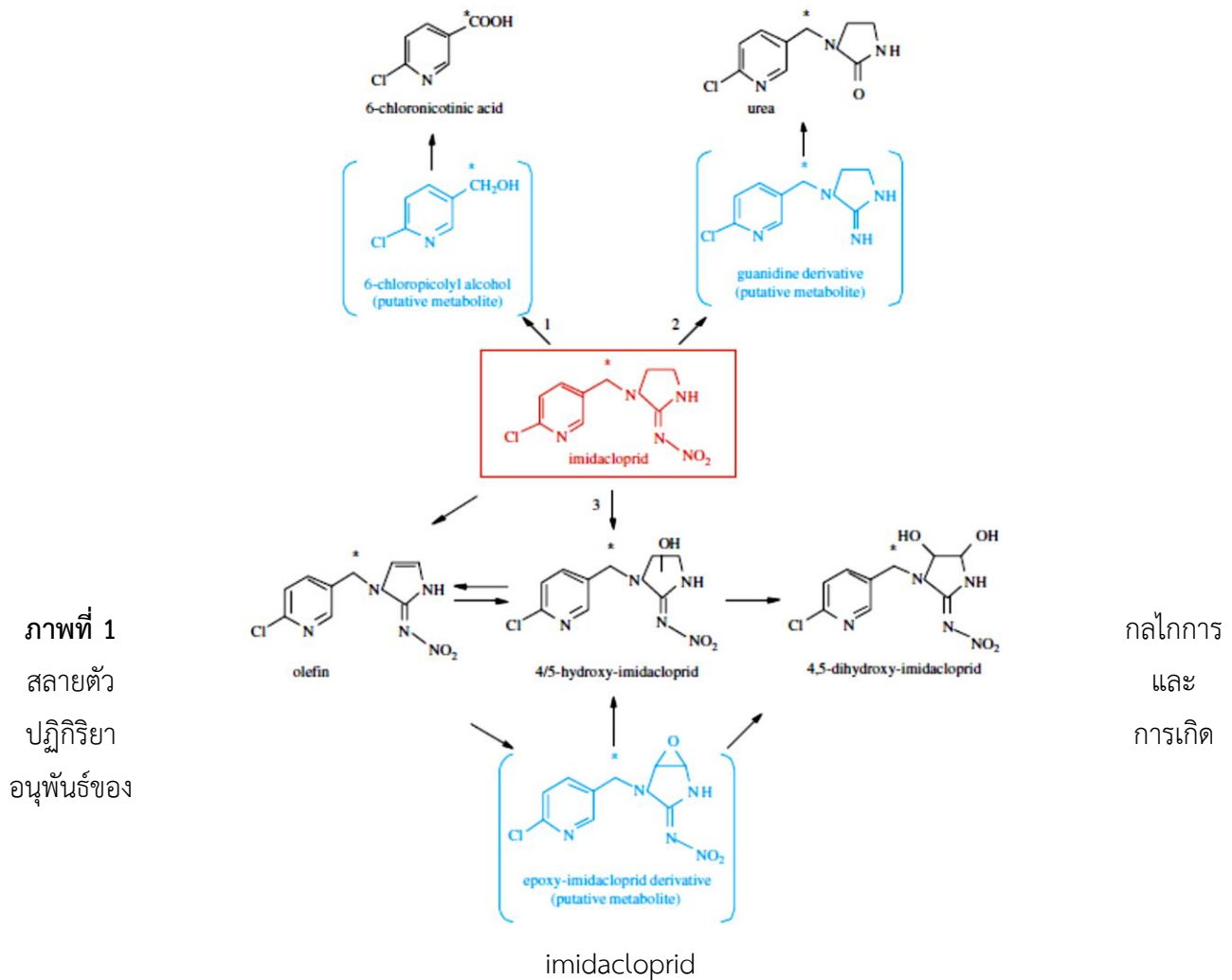
ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟฝ้าย เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของพืช โดยใช้ปากที่เป็นแทง (stylet) เขี่ยเนื้อเยื่อพืชให้เข้าแล้วจึงดูดน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืช ทำให้บริเวณที่ถูกดูดมีลักษณะอาการจากการทำลายทำให้เกิดรอยดำที่ผล เมื่อโตขึ้นทำให้คุณภาพผลผลิตต่ำ ในกรณีของพืชผักที่มีการส่งออกถึงจะมีความเสียหายไม่ชัดเจน แต่การติดไปของเพลี้ยไฟชนิดนี้ไม่ว่าจะเป็นระยะไข่ ตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยก็ตาม จะมีผลกระทบต่อ การส่งออกทันที พบทำลายพืชได้เกือบตลอดปี การระบาดมักพบเสมอในช่วงฤดูร้อน หรือช่วงที่มีอากาศแห้งแล้ง ฝนทิ้งช่วงเป็นเวลานาน การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟฝ้าย ขั้นต้นควรเพิ่มความชื้นโดยการให้น้ำ อย่าปล่อยให้พืชขาดน้ำ เพราะจะทำให้พืชอ่อนแอและเพลี้ยไฟฝ้ายก็อาจจะระบาดอย่างรวดเร็ว ต่อมาให้ใช้สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพป้องกันกำจัด เช่น อิมิดาโคลพริด 10% SL หรือ พิโปรนิล 5% SC หรือ อีมาเม็กตินเบนโซเอต 1.92% EC อัตรา 40, 40 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ (สมศักดิ์ และคณะ, 2554) อัตราการใช้น้ำ ถ้าพืชอายุ 30-60 วันหลังการปลูก ใช้น้ำละ 80 ลิตร อายุเกิน 60 วัน ใช้น้ำไร่ละ 100 ลิตร (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช, 2553)

อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) มีสูตรทางเคมี คือ $C_9H_{10}ClN_5O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 255.7 กรัมต่อโมล เป็นผลึก ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ความหนาแน่น 1.54 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 144 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายได้ในน้ำที่ 0.61 กรัมต่อลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส ค่า LD_{50} ทางปากสำหรับหนู (rat) อยู่ที่ 450 สำหรับหนู (mouse) อยู่ที่ 98 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LC_{50} ทางการสูดดมสำหรับหนู (rat) มากกว่า 5,323 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และค่า LD_{50} ทางผิวหนังสำหรับหนู (rat) มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผล

ความเป็นพิษเชิงนิเวศวิทยา พบว่า ค่า LC_{50} ของปลาเรนโบว์เทราท์ (*oncorhynchus mykiss*) ระยะเวลา 98 ชั่วโมง อยู่ที่ 211 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปลาชนิดอื่นๆ ระยะเวลาเท่ากันอยู่ที่ 237 มิลลิกรัมต่อลิตร (อังคณา, 2556)

imidacloprid มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของนิโคติน (nicotine) โดยสารนี้จัดอยู่ในสารฆ่าแมลงกลุ่มคลอโรนิโคทีน (chloronicotinyl insecticides) แมลงสามารถรับสารฆ่าแมลงนี้ได้โดยการสัมผัสหรือการกิน ซึ่งอิมิดาโคลพริดจะไปออกฤทธิ์โดยจับที่ตัวรับนิโคทีนิก อะเซทิลโคลีน (nicotinic acetylcholine receptor) และทำให้มีการสะสมสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนมากขึ้น ซึ่งผลโดยรวม คือ การรบกวนระบบสื่อประสาทในแมลง แมลงที่ได้รับสารฆ่าแมลงนี้จะเฉื่อยชา อ่อนแรง หยุดกินอาหาร และตายในที่สุด สารฆ่าแมลงนี้มีพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำกว่าแมลง ทำให้มีผลจำเพาะเจาะจงต่อแมลงมากกว่า และการที่การออกฤทธิ์ของสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ต่างจากกลุ่มอื่น ทำให้สามารถใช้กำจัดแมลงที่ดื้อต่อสารฆ่าแมลงกลุ่มอื่นได้

กลไกการสลายตัวของ imidacloprid ซึ่งสามารถสรุปเป็นปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ แสดงในภาพที่ 1 คือ ปฏิกิริยาที่ 1 เมื่อ imidacloprid ทำปฏิกิริยาที่สภาวะรุนแรง (-OH/heat) และนานขึ้น พันธะคู่จะแตกออกให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดคาร์บอกซิลิก เรียกว่า ปฏิกิริยา Oxidative cleavage ผ่านหมู่เมทิลีน (methylene bridge) จะได้อนุพันธ์ 6-chloronicotinic acid ปฏิกิริยาที่ 2 เป็นการรีดิวซ์สารประกอบไนโตร ของอะโรมาติกเอมีน เรียกว่า ปฏิกิริยา reduction of nitro group ให้อนุพันธ์ยูเรีย (urea) ปฏิกิริยาที่ 3 เป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่ -OH (hydroxylation) เข้าไปในโมเลกุลของวงแหวนอิมิดา (imidazolidine ring) จะได้ 4/5-hydroxy-imidacloprid และเปลี่ยนไปเป็น 4,5-hydroxy-imidacloprid ทั้งนี้ 4/5-hydroxy-imidacloprid และ 4,5-hydroxy-imidacloprid สามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์อีพอกซี (epoxy derivative) ที่เกิดจากโมเลกุลที่เติมพันธะคู่แล้ว (desaturated molecules) อีกทั้งเกิดปฏิกิริยาการควบแน่น (dehydration) โดยที่จะกำจัดหมู่ -OH ออกจากโมเลกุลสาร 4/5-hydroxy-imidacloprid และ/หรือ ส่วนของโมเลกุลที่เติมพันธะคู่ของวงแหวนอิมิดา จะได้ olefin



ที่มา : Suchail et. al., 2004.

จากเอกสารของ Joint FAO/WHO food standards programme CODEX committee on pesticide residues 47th session เมื่อวันที่ 13 – 18 เมษายน 2557 ณ กรุงปักกิ่ง สาธารณรัฐประชาชนจีน กำหนดให้การพิจารณาสารพิษตกค้างของ imidacloprid ต้องเป็นปริมาณสารพิษตกค้างผลรวมของ imidacloprid และเมตาบอไลต์ที่ประกอบด้วย 6-คลอโรไพริดีนิล ส่วนหนึ่ง (6-chloropyridinyl moiety) รายงานผลเป็น imidacloprid (สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2559) (sum of imidacloprid and its metabolites containing the 6-chloropyridinyl moiety, expressed as imidacloprid. (JMPR, 2015)) จากวิธีเมแทบอลิซึมและปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ของ imidacloprid ซึ่งเมตาบอไลต์ที่ประกอบด้วย 6-คลอโรไพริดีนิล ส่วนหนึ่ง ในการทดลองนี้จึงกำหนดให้ต้องตรวจวิเคราะห์ imidacloprid, 6-chloronicotinic acid, olefin, 5-hydroxy, dihydroxy และ urea ด้วย

การศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของ imidacloprid ในมะเขือ จึงเป็นการศึกษาเพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการประกอบการพิจารณาการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างในพืช (MRLs) จากการใช้วัตถุที่มีพิษอย่างถูกต้องและปลอดภัย ตามมาตรฐานของ Codex เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และเพื่อประโยชน์ในการต่อรองทางด้านสินค้าเกษตรส่งออก โดยที่กรมวิชาการเกษตรได้ทำการศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของ imidacloprid ในมะเขือ เพื่อนำไปเสนอพิจารณา Thai-MRL, Asian MRL และ Codex MRL ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

7.1.1.1 เครื่องพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (spray equipment) แบบเครื่องยนต์สะพายหลัง (knapsack electrical sprayer, Mitsudaiwa รุ่น TP-20)

7.1.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง เช่น เครื่องจับเวลา เครื่องวัดความเร็วลม เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น และเครื่องบันทึกอุณหภูมิ ที่สอบเทียบแล้ว

7.1.1.3 หลอดทดลอง (screw-capped polypropylene centrifuge tubes) ขนาด 50 มิลลิลิตร

7.1.1.4 หลอดทดลองขนาดเล็ก (micro centrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.1.1.5 ขวดบรรจุสาร (auto sampler vials) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.1.1.6 อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลาย (auto pipette) ขนาด 2-20, 10-100, 20-200, 100-1,000, 500-5,000 ไมโครลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร ที่สอบเทียบแล้ว

7.1.1.7 อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารเคมีจากขวด (dispenser) ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่สอบเทียบแล้ว

7.1.1.8 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balances) ชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง ที่สอบเทียบแล้ว

7.1.1.9 เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor)

7.1.1.10 ตู้อบ (hot air oven) และเตาเผา (muffle furnace)

7.1.1.11 เครื่องผสมตัวอย่าง (vortex mixer)

7.1.1.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมด้วย adapter สำหรับหลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิเมตร

7.1.1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดทดลองขนาดเล็ก (micro centrifuge) สำหรับหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิเมตร

7.1.1.14 เครื่องลดปริมาตรโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (nitrogen evaporator)

7.1.1.15 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder

7.1.1.16 เข็มที่มีกระดาษกรอง (syringe with membrane filter) ขนาด 0.20 ไมโครเมตร

7.1.1.17 เครื่อง ultra performance liquid chromatography (UPLC) ต่อกับ tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) Agilent technologies รุ่น 6460

7.1.1.18 เครื่อง Gas Chromatography (GC) Agilent technologies รุ่น 6890 ซึ่งมีหัวตรวจวัดชนิด Micro Electron Capture Detector (μ ECD) และ Flame Photometric Detector (FPD)

7.1.2 สารเคมี

7.1.2.1 สารมาตรฐานของ imidacloprid ($C_9H_{10}ClN_5O_2$) 99.5%, 6-chloronicotinic acid ($C_6H_4ClNO_2$) 98.7%, olefin ($C_9H_8ClN_5O_2$) 99%, imidacloprid-5-hydroxy ($C_9H_{10}ClN_5O_3$) 96.7%, imidacloprid-4,5-dihydroxy ($C_9H_{10}ClN_5O_4$) 92% และ urea ($C_9H_{10}ClN_3O$) 99.4%

7.1.2.2 ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid 10% W/V SL ชื่อการค้า ยูดารา10 (U dara 10) ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ โดย กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัย วัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร เท่ากับ 10.4% W/V

7.1.2.3 acetonitrile (CH_3CN) ชนิด pesticide grade (PR), formic acid (CH_2O_2) และ sulfuric acid (H_2SO_4) ชนิด analytical grade (AR)

7.1.2.4 acetonitrile และ water (H_2O) ชนิด LC-MS grade

7.1.2.5 anhydrous magnesium sulfate (Mg_2SO_4) เผาที่ $500^{\circ}C$ นาน 5 ชั่วโมง

7.1.2.6 sodium citrate tribasic dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)

7.1.2.7 disodium hydrogen citrate sesquehydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$)

7.1.2.8 sodium chloride (NaCl)

7.1.2.9 sodium hydroxide (NaOH)

7.1.2.10 C18 sorbent (50 ไมโครเมตร)

7.1.2.11 น้ำกลั่น (distilled water)

7.2 วิธีการ

7.2.1 การสำรวจแปลงปลูกและวางแผนการทดลอง

7.2.1.1 สำรวจแปลงปลูกมะเขือเปราะของเกษตรกร เพื่อวางแผนการทดลอง การปฏิบัติงาน และกำหนดระยะเวลาพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยเลือกแปลงทดลองที่มีการปลูกตามหลักการเกษตรที่ดีที่เหมาะสม (Good Agriculture Practice; GAP) ติดต่อขอความร่วมมือจากเกษตรกรเพื่อดำเนินการทดลองจำนวน 6 แปลงต่างพื้นที่กัน แปลงที่ 1 ทำการทดลองที่ ต.ปลายนา อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี ในระหว่างเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน 2559 และแปลงที่ 2 ทำการทดลองที่ ต.ปากน้ำ อ.เดิมบางนางบวช จ.สุพรรณบุรี ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม 2559 แปลงที่ 3 ทำการทดลองที่ ต.วังขนาบ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ในระหว่างเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2561 แปลงที่ 4 ทำการทดลองที่ ต.อบทม อ.สามโก้ จ.อ่างทอง ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ – เมษายน 2561 แปลงที่ 5 ทำการทดลองที่ ต.ท่าชุมพล อ.โพธาราม จ.ราชบุรี ในระหว่างเดือนธันวาคม 2561 – มกราคม 2562 และแปลงที่ 6 ทำการทดลองที่

ต.หนองนไ้ อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร ในระหว่างเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2562 ซึ่งเกษตรกรยินยอมที่จะปฏิบัติตามแผนการดำเนินงานที่กำหนด

7.2.1.2 วางแผนการทดลอง แบบ Supervised Trial (FAO, 2016) ตาม Codex Guidelines มี 2 การทดลองย่อย (experiments) การทดลองย่อยที่ 1 แปลงควบคุม (Control, C) ไม่พ่นสารสำหรับใช้เป็นแปลงเปรียบเทียบกับแปลงที่พ่นสาร และการทดลองย่อยที่ 2 แปลงทดลอง (Experimental treatment, T) พ่นสาร imidacloprid 10% W/V SL ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ (Recommended Dose, R) อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (สมศักดิ์ และคณะ, 2554) อัตราการใช้น้ำ 100 ลิตรต่อไร่ (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช, 2553) ทำการพ่นสารทุก 7 วัน ติดต่อกันรวม 3 ครั้ง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 วันที่พ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid 10% W/V SL ในแปลงมะเขือเปราะ

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	ครั้งที่	วันที่พ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชปีงบประมาณ 2560	
		แปลงทดลองที่ 1 14°40'07.5"N 100°12'06.0"E	แปลงทดลองที่ 2 14°54'43.4"N 100°04'40.7"E
imidacloprid 10% W/V SL ชื่อการค้า ยูดารา10 (Udara10)	1	25 ตุลาคม 2559	3 พฤศจิกายน 2559
	2	1 พฤศจิกายน 2559	10 พฤศจิกายน 2559
	3	8 พฤศจิกายน 2559	17 พฤศจิกายน 2559
	ครั้งที่	วันที่พ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชปีงบประมาณ 2561	
		แปลงทดลองที่ 3	แปลงทดลองที่ 4
	1	15 มกราคม 2561	26 กุมภาพันธ์ 2561
	2	22 มกราคม 2561	3 มีนาคม 2561
	3	30 มกราคม 2561	13 มีนาคม 2561
	ครั้งที่	วันที่พ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชปีงบประมาณ 2562	
		แปลงทดลองที่ 5 13°41'42.7"N 99°47'32.0"E	แปลงทดลองที่ 6 13°40'36.8"N 100°10'35.3"E
	1	19 ธันวาคม 2561	16 มกราคม 2562
	2	26 ธันวาคม 2561	23 มกราคม 2562
	3	3 มกราคม 2562	31 มกราคม 2562

การทดลอง มี 6 กรรมวิธี (treatment) คือ ระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตมะเขือเปราะไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างภายหลังการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid ครั้งสุดท้าย และสุ่มเก็บตัวอย่างรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตจากแปลงทดลอง

ระยะเวลาหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย	วันที่เก็บเกี่ยวผลผลิตจากแปลงทดลองปีงบประมาณ 2560	
	แปลงทดลองที่ 1 อ. ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี	แปลงทดลองที่ 2 อ. เดิมบางนางบวช จ. สุพรรณบุรี
0 วัน (2 ชั่วโมงหลังการพ่น)	8 พฤศจิกายน 2559	17 พฤศจิกายน 2559
3 วัน	11 พฤศจิกายน 2559	20 พฤศจิกายน 2559
5 วัน	13 พฤศจิกายน 2559	22 พฤศจิกายน 2559

7 วัน	15 พฤศจิกายน 2559	24 พฤศจิกายน 2559
14 วัน	22 พฤศจิกายน 2559	1 ธันวาคม 2559
21 วัน	29 พฤศจิกายน 2559	8 ธันวาคม 2559

ตารางที่ 3 ระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตจากแปลงทดลอง (ต่อ)

ระยะเวลาหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย	วันที่เก็บเกี่ยวผลผลิตจากแปลงทดลองปีงบประมาณ 2561	
	แปลงทดลองที่ 3 อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี	แปลงทดลองที่ 4 อ. สามโก้ จ. อ่างทอง
0 วัน (2 ชั่วโมงหลังการพ่น)	30 มกราคม 2561	13 มีนาคม 2561
1 วัน	31 มกราคม 2561	-
3 วัน	2 กุมภาพันธ์ 2561	16 มีนาคม 2561
5 วัน	4 กุมภาพันธ์ 2561	18 มีนาคม 2561
7 วัน	6 กุมภาพันธ์ 2561	20 มีนาคม 2561
14 วัน	13 กุมภาพันธ์ 2561	27 มีนาคม 2561
21 วัน	20 กุมภาพันธ์ 2561	3 เมษายน 2561
	วันที่เก็บเกี่ยวผลผลิตจากแปลงทดลองปีงบประมาณ 2562	
	แปลงทดลองที่ 5 อ. โพธาราม จ.ราชบุรี	แปลงทดลองที่ 6 อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร
0 วัน (2 ชั่วโมงหลังการพ่น)	3 มกราคม 2562	31 มกราคม 2562
1 วัน	4 มกราคม 2562	1 กุมภาพันธ์ 2562
3 วัน	6 มกราคม 2562	3 กุมภาพันธ์ 2562
5 วัน	8 มกราคม 2562	5 กุมภาพันธ์ 2562
7 วัน	10 มกราคม 2562	7 กุมภาพันธ์ 2562
14 วัน	17 มกราคม 2562	14 กุมภาพันธ์ 2562
21 วัน	24 มกราคม 2562	21 กุมภาพันธ์ 2562

7.2.2 การปฏิบัติงานในแปลงทดลอง และการเก็บตัวอย่างมะเขือเปราะจากแปลงทดลอง

ปฏิบัติในแปลงทดลองปลูกมะเขือเปราะ กำหนดพื้นที่เขตกรรม แปลงทดลองที่ 1 มีขนาดพื้นที่ของแปลงทดลอง กว้าง x ยาว เท่ากับ 3.7 x 25 ตารางเมตร และแปลงทดลองที่ 2 เท่ากับ 3.3 x 25 ตารางเมตร และกำหนดมี

3 แปลงทดลองในการทดลองย่อยที่ 2 ส่วนการทดลองย่อยที่ 1 มี 1 แปลงทดลอง ดำเนินการปฏิบัติงานในแปลงทดลองตามระบบ GLP ดังนี้ บันทึกสภาพพื้นที่ ความลาดเอียง ลักษณะของแปลง วิธีการเพราะปลูก ระยะปลูก รูปแบบการให้น้ำ การใช้ปัจจัยการผลิตในพื้นที่

ตรวจสอบหัวฉีด (nozzles) การกระจายละอองของสารและกำหนดอัตราการไหลของเครื่องพ่นที่จะใช้งาน (discharge calibration) ก่อนการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทุกครั้งต้องตรวจสอบอัตราการไหลของเครื่องให้อยู่ในช่วง ± 5 เปอร์เซ็นต์ ของอัตราการไหลที่จะใช้งาน คำนวณเวลายามาตรฐานที่ใช้ในการพ่นต่อเที่ยว (target time) ทำการทดลองเดินตัวเปล่า เดินสพวยเครื่อง และเดินสพวยเครื่องพร้อมพ่น ทุกครั้งก่อนการปฏิบัติงานพ่นในพื้นที่เขตกรรม คำนวณอัตราการพ่นสารต่อพื้นที่ (spray volume) ปริมาตรของสารและปริมาตรของน้ำในการผสม จัดบันทึกข้อมูลผลิตภัณฑ์ของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่จะใช้รวมถึงวิธีการขนส่งผลิตภัณฑ์ไปยังแปลงทดลอง ขั้นตอนและเวลาในการผสม อุณหภูมิและ pH ของน้ำ กำหนดรูปแบบและจำนวนเที่ยว (pass) ของการเดินพ่นในพื้นที่เขตกรรม โดยต้องเดินสไลด์จากขวาไปซ้ายมือของผู้พ่น

การบันทึกข้อมูลในการปฏิบัติงานในพื้นที่เขตกรรม ดังนี้ อายุของพืช (crop growth stage) ความสูงของต้นพืช (crop height) ความแข็งแรงของพืช (crop vigor) ความชื้นของใบพืช (plant surface moisture) พื้นที่ทรงพุ่มของพืชที่ปกคลุมผิวดินโดยประมาณ (estimated % of soil area covered by crop canopy) วัดอุณหภูมิของอากาศ (measured air temperature) วัดความเร็วลมและทิศทางลม (measured wind speed and wind direction) ปริมาณของเมฆในท้องฟ้าโดยประมาณ (estimated % of clouds in the sky) วัดปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (measured relative humidity, %) ลักษณะของดิน (description of soil tilth) ความชื้นของผิวดินโดยประมาณ (estimated of soil surface moisture) อุณหภูมิของดิน (soil temperature) และความลึกของดินที่วัดอุณหภูมิ (depth of measurement of soil temperature)

ในการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผู้พ่นสารและผู้จับเวลา ต้องสวมใส่อุปกรณ์ป้องกัน ทำการพ่นตามรายละเอียดในตารางที่ 2 โดยใช้เครื่องพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (spray equipment) แบบเครื่องยนต์สพวยหลัง (knapsack electrical sprayer, Mitsudaiwa รุ่น TP-20) เมื่อพ่นสารในแต่ละเที่ยวเสร็จ ผู้จัดบันทึกต้องลงบันทึกเวลาที่ใช้ในการพ่นต่อเที่ยว ซึ่งต้องอยู่ในเกณฑ์ ± 5 เปอร์เซ็นต์ของเวลายามาตรฐาน บันทึกทิศทางการเดิน (direction of that pass) หลังจากนั้นต้องคำนวณร้อยละของปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง (amount of test substance applied per hectare) ซึ่งต้องอยู่ในเกณฑ์ -5% ถึง $+10\%$ จึงจะยอมรับผลการปฏิบัติงานในครั้งนั้นได้ โดยผู้ตรวจสอบ จะต้องสังเกตและบันทึกผลการปฏิบัติงานให้เป็นไปตามที่กำหนดและให้คำแนะนำในระหว่างปฏิบัติงาน ร้อยละของปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่พ่นลงในพื้นที่ ดังแสดงในตารางที่ 4

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมะเขือเปราะตามระยะเวลาต่างๆ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3 โดยสุ่มเก็บผลมะเขือเปราะกระจายให้ทั่วทรงพุ่ม ทัวทั้งแปลงทดลอง ให้น้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม เก็บใส่ถุงพลาสติกที่มีป้ายบ่งชี้ตัวอย่าง ประกอบด้วยข้อมูล รหัสการทดลอง (field ID) ชื่อตัวอย่างพืช (crop fraction) ชื่อสารป้องกันกำจัด

ศัตรูพืช (test substance) วันที่เก็บตัวอย่าง (sample date) และผู้รับผิดชอบแปลงทดลอง (filed research director name) พร้อมทั้งหมายเลขโทรศัพท์ที่ใช้การติดต่อ ทั้งนี้ในการเก็บตัวอย่างต้องบันทึกชื่อผู้สุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละแปลง พร้อมทั้งเวลาที่ใช้ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง ปิดถุงให้แน่นบรรจุลงในกล่องที่บรรจุน้ำแข็งซึ่งระบุประเภทของตัวอย่างไว้บนกล่อง ภายในกล่องมีเครื่องบันทึกอุณหภูมิ (data logger) เพื่อขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่อไป โดยต้องบันทึกระยะเวลา อุณหภูมิและวิธีการในการนำส่งตัวอย่างด้วย

ตารางที่ 4 ร้อยละของปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง

แปลงทดลองที่ 1						
Replication	พื้นที่ (m ²)	ร้อยละของปริมาณ imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร				วัสดุที่มีพิษ imidacloprid (กรัม ai/ไร่)
		ครั้งที่ 1 (25 ต.ค. 59)	ครั้งที่ 2 (1 พ.ย. 59)	ครั้งที่ 3 (8 พ.ย. 59)	เฉลี่ย	
R1	92.5	98.83	100.66	97.13	98.87	20
R2	92.5	97.68	100.84	98.12	98.88	20
R3	92.5	98.50	100.66	98.73	99.29	20

ตารางที่ 4 ร้อยละของปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง (ต่อ)

แปลงทดลองที่ 2						
Replication	พื้นที่ (m ²)	ร้อยละของปริมาณ imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร				วัสดุที่มีพิษ imidacloprid (กรัม ai/ไร่)
		ครั้งที่ 1 (3 พ.ย. 59)	ครั้งที่ 2 (10 พ.ย. 59)	ครั้งที่ 3 (17 พ.ย. 59)	เฉลี่ย	
R1	82.5	98.22	100.64	103.88	100.91	20
R2	82.5	97.88	102.62	102.03	100.84	20
R3	82.5	98.40	101.62	101.47	100.49	20

แปลงทดลองที่ 3						
Replication	พื้นที่ (m ²)	ร้อยละของปริมาณ imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร				วัสดุที่มีพิษ imidacloprid (กรัม ai/ไร่)
		ครั้งที่ 1 (15 ม.ค. 61)	ครั้งที่ 2 (22 ม.ค. 61)	ครั้งที่ 3 (30 ม.ค. 61)	เฉลี่ย	
R1	127.5	98.16	102.89	99.23	100.09	20

R2	127.5	100.76	102.44	100.23	101.14	20
R3	127.5	99.50	100.23	103.47	101.07	20
แปลงทดลองที่ 4						
Replication	พื้นที่ (m ²)	ร้อยละของปริมาณ imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร				วัสดุมีพิษ imidacloprid (กรัม ai/ไร่)
		ครั้งที่ 1 (26 ก.พ. 61)	ครั้งที่ 2 (3 มี.ค. 61)	ครั้งที่ 3 (13 มี.ค. 61)	เฉลี่ย	
R1	150	102.27	106.87	105.05	104.73	20
R2	150	104.93	106.21	104.63	105.26	20
R3	150	103.75	104.63	105.36	104.58	20
แปลงทดลองที่ 5						
Replication	พื้นที่ (m ²)	ร้อยละของปริมาณ imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร				วัสดุมีพิษ imidacloprid (กรัม ai/ไร่)
		ครั้งที่ 1 (19 ธ.ค. 61)	ครั้งที่ 2 (26 ธ.ค. 61)	ครั้งที่ 3 (3 ม.ค. 62)	เฉลี่ย	
R1	198	97.73	101.33	101.42	100.16	20
R2	198	97.30	102.25	101.73	100.43	20
R3	198	100.86	101.73	103.38	101.99	20

ตารางที่ 4 ร้อยละของปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง (ต่อ)

แปลงทดลองที่ 6						
Replication	พื้นที่ (m ²)	ร้อยละของปริมาณ imidacloprid ที่พ่นลงในพื้นที่แปลงทดลอง อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร				วัสดุมีพิษ imidacloprid (กรัม ai/ไร่)
		ครั้งที่ 1 (16 ม.ค. 62)	ครั้งที่ 2 (23 ม.ค. 62)	ครั้งที่ 3 (31 ม.ค. 62)	เฉลี่ย	
R1	202.5	99.48	105.95	105.01	103.48	20
R2	202.5	98.87	102.55	104.47	101.96	20
R3	202.5	99.97	104.47	104.29	102.91	20

จากตารางที่ 4 มีการแสดงกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อไร่ของ imidacloprid (กรัม ai/ไร่) ซึ่งสามารถคำนวณได้ตามวิธีการในภาคผนวกที่ 1 ซึ่งแสดงทั้งวิธีการคำนวณหาอัตราการใช้สารเคมีต่อครั้ง การคำนวณปริมาณสารเคมีที่ใช้ต่อพื้นที่ และการคำนวณกรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ของ imidacloprid

7.2.3 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid

7.2.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างมะเขือเปราะจากแปลงทดลอง บันทึกในเอกสารรับตัวอย่าง เวลารับตัวอย่าง สภาพของตัวอย่าง อุณหภูมิระหว่างการขนส่งและเมื่อถึงห้องปฏิบัติการ บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง และจำนวนผลต่อตัวอย่าง กำหนดรหัสตัวอย่างสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ (lab sample ID) ตัวอย่างมะเขือเปราะจะถูกหั่นให้มีขนาดเล็ก และใช้เครื่องบดสับตัวอย่าง (food processor) เพื่อให้ตัวอย่างเป็นความละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วชั่งตัวอย่างจากการทดลองย่อยที่ 1 แปลงควบคุม 1 ซ้ำ และการทดลองย่อยที่ 2 แปลงทดลอง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ น้ำหนัก 10 ± 0.05 กรัม ลงในหลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร และทำการชั่งเก็บตัวอย่าง (archive) ให้ได้น้ำหนักตัวอย่างละอย่างน้อย 100 กรัม ทั้งนี้ทุกขั้นตอนในการหั่น บดสับ ชั่ง และเก็บตัวอย่าง ต้องมีการจดบันทึกเวลาการทำงานด้วย จากนั้นนำตัวอย่างที่ชั่งแล้วไปสกัดและตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง

7.2.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐาน imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ซึ่งประกอบด้วย 6-chloronicotinic acid, olefin, imidacloprid-5-hydroxy, imidacloprid-4,5-dihydroxy และ urea โดยชั่งสารมาตรฐานให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำค่า %purity มาคำนวณกลับเป็นน้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น olefin ชั่งใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 671.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ acetonitrile PR grade เป็นตัวทำละลาย

2) เตรียม mix standard solution ของสารละลายมาตรฐาน imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ความเข้มข้น 100, 5 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยการผสม stock solution ของสารละลายมาตรฐาน imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid จากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในข้อ 1) ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยใช้อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลาย (auto pipette) ที่สอบเทียบแล้ว แล้วทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานผสมดังกล่าว ให้มีความเข้มข้นของสารละลายผสม เท่ากับ 5 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ acetonitrile PR grade เป็นตัวทำละลาย

3) เตรียม working mix standard in matrix solution จากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในข้อ 2) mix standard solution นำมาเตรียมให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมที่จะใช้งาน เท่ากับ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ matrix solution จากการสกัดตัวอย่าง แปลงควบคุม เป็นตัวทำละลาย โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

.....สมการที่ 1

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น (mg/kg) C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการเตรียม (mg/kg)
 V_1 = ปริมาตรของสารละลายตั้งต้น (ml) V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการเตรียม (ml)

4) ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่จะใช้งาน (working standard solution in matrix) ให้มีค่า Correlation coefficient (R^2) ของ linear regression ของสารละลายมาตรฐาน imidacloprid, 6-chloronicotinic acid, olefin, imidacloprid-5-hydroxy, imidacloprid-4,5-dihydroxy และ urea โดยต้องมีค่า $R^2 \geq 0.995$ ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ยอมรับได้

7.2.3.3 การหาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

เพื่อทดสอบวิธีการที่นำมาใช้ในการทดลองว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมหรือไม่ โดยการเติมสารมาตรฐาน imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนในตัวอย่างมะเขือเปราะที่ไม่มีสารพิษตกค้างของ imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ (Eurachem, 2014) แล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีการสกัด การขจัดสิ่งปนเปื้อนและการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ตามวิธีการวิเคราะห์ ในข้อ

7.2.3.4 เพื่อทดสอบหาประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน (recovery)

7.2.3.4 การสกัดและ clean up ตัวอย่าง

การสกัดตัวอย่าง (Extraction/Partition) สกัดสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid โดยวิธีวิเคราะห์ QuEChERS Alkaline Hydrolysis (Unitedchem, 2013) มีขั้นตอนดังนี้

1) การทำ Alkaline Hydrolysis มีขั้นตอนดังนี้

- 1.1) ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.05 กรัม ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.2) เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้ว เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที
- 1.3) ปรับ pH ให้ได้ 12 ด้วยสายละลาย 5 M NaOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดฝาแล้ว เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที
- 1.4) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.5) ปรับ pH ให้กลับมาเหมือนเดิม ด้วย 2.5 M H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดฝาแล้ว เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที

2) การสกัดตัวอย่าง (sample extraction) มีขั้นตอนดังนี้

- 1.1) เติม acetonitrile ชนิด pesticide grade (PR) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที

1.2) เติม sodium chloride 1.0 กรัม magnesium sulfate 4 กรัม sodium citrate tribasic dihydrate 1 กรัม และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม ปิดฝาแล้ว เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาที

1.3) นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 5 นาที

3) การ clean up (ทำความสะอาดตัวอย่าง) โดยวิธี Dispersive-SPE Cleanup มีขั้นตอนดังนี้

1.1) ใช้ auto pipette ดูดสารละลายส่วนบน 1 มิลลิลิตร ใส่ micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี C18 0.05 กรัม และ magnesium sulfate 0.15 กรัม เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 วินาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm นาน 2 นาที

1.2) ดูดสารละลายส่วนบนของตัวอย่าง กรองผ่านเข็มขนาด 3 มิลลิลิตรที่มีกระดาษกรอง (syringe with membrane filter) ขนาด 0.20 ไมโครเมตร ลงในขวดบรรจุสาร (auto sampler vials) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

Alkaline Hydrolysis

ชั่ง Sample 10.00 g ใส่ใน Centrifuge tube ขนาด 50 ml



เติม DI water 2 ml



Vortex 1 min.

ปรับ pH ให้ได้ 12 ด้วย 5 M NaOH 100 μ l



Vortex 1 min.

ตั้งทิ้งไว้ 30 min. ที่อุณหภูมิห้อง



ปรับ pH ให้กลับมาเหมือนเดิม ด้วย 2.5 M H₂SO₄ 100 μ l

Sample Extraction



เติม 10 ml Acetonitrile (PR)



Vortex 1 min.

เติม 4.00g MgSO₄ + 1.00g NaCl + 1.00g Na₃HCl + 0.50g Na₂HCl



Vortex 1 min.

Centrifuge at 3,000 rpm นาน 5 min.



Sample Clean up

Pipette sample 1.0 ml ใส่ micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml

ที่มี 0.05g C18 + 0.15g MgSO₄



Vortex 1 min.

Centrifuge at 5,000 rpm นาน 2 min.

↓
กรองผ่าน syringe ที่มี filter 0.20 µm
↓
วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS

ภาพที่ 2 ขั้นตอนวิธี QuEChERS Alkaline Hydrolysis
ที่มา : Unitedchem. (2013)

7.2.3.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเทคนิค Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid จำนวน 6 ชนิด ตามวิธีการที่กำหนด ในข้อ 2.3.4 ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยกำหนดค่า Condition ของเครื่องมือวิเคราะห์ ดังตารางที่ 6

- 1) เครื่องมือ (Equipment): LC-MS/MS Agilent
- 2) คอลัมน์ (Column): Kinetex 26u XB-C18 100A, 100 x 2.1 mm
- 3) Mobile phase: A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in acetonitrile

ตารางที่ 6 ระยะเวลาและอัตราที่ใช้ของ mobile phase

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
3.00	60	40
5.00	5	95
5.10	95	5
6.00	95	5

4) Flow: 0.45 ml/min, Temp. 40°C, Injection volume: 2 µl

5) Post time: 1 min, Total cycle time: 7 min

6) MS conditions: Positive mode, Gas temp.: 350 °C, Gas flow: 10 L/min, Nebulizer: 40 psi, Capillary: 3,500 V และกำหนดค่า MRM Precursor/Product Ion Transitions and Instrument Condition ได้ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 MRM Precursor/Product Ion Transitions and Instrument Condition

Analyte	Molecular formula	t _R ^a (min)	Ion transition	Dwell time	Frag (V)	CE (V)	Ion transition	Dwell time	Frag (V)	CE (V)
---------	-------------------	-----------------------------------	----------------	------------	----------	--------	----------------	------------	----------	--------

			(primary)				(secondary)			
imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	2.559	256.0 > 209.0	30	80	10	256.0 > 175.0	30	80	10
6-chloronicotinic acid	C ₆ H ₄ ClNO ₂	2.306	158.0 > 121.9	30	80	18	158.0 > 77.9	30	80	25
olefin	C ₉ H ₈ ClN ₅ O ₂	2.099	254.1 > 205.1	30	80	10	254.1 > 171.1	30	80	15
5-hydroxy	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₃	2.205	272.1 > 225.1	30	80	10	272.1 > 190.9	30	80	14
4,5-hydroxy	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₄	2.059	288.0 > 244.0	30	80	10	288.0 > 188.8	30	80	25
urea	C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O	2.236	212.1 > 128.1	30	80	18	212.1 > 78.0	30	80	40

หมายเหตุ^a t_R = Retention time

โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid จำนวน 6 ชนิด แสดงเป็นรูปภาพ TIC และ MRM ของสารแต่ละชนิด ได้ดังภาคผนวกที่ 2

7.2.3.6 การทำ Calibration curve

นำสารละลายมาตรฐาน working mix standard in matrix solution ของ imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ในข้อ 7.2.3.2, 3) ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ matrix solution จากการสกัดตัวอย่างแปลงควบคุม เป็นตัวทำละลาย ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อทำ calibration curve ในการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน มีค่า Correlation coefficient (R²) ของ linear regression ของสารละลายมาตรฐาน imidacloprid, 6-chloronicotinic acid, olefin, imidacloprid-5-hydroxy, imidacloprid-4,5-dihydroxy และ urea เท่ากับ 0.9993, 0.9986, 0.9997, 0.9992, 0.9982 และ 0.9986 ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวกที่ 3 โดยมีค่า R² ≥ 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังแสดงรายละเอียดของ calibration curve ของสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ ในภาคผนวกที่ 3

7.3 ระยะเวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 - กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการสลายตัวของสารพิษตกค้างของอิมิดาโคลพริด (imidacloprid) ในมะเขือเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง วางแผนการทดลองแบบ supervise residue trial ตาม Codex

Guidelines วิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS Alkaline Hydrolysis (Unitedchem, 2013) ซึ่งทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ ตรวจวัดโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS พบว่า มี %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ 70 – 120 เปอร์เซ็นต์ (SANCO, 2014) ทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีบางซ้ำของการวิเคราะห์มีค่ามากกว่าเกณฑ์การยอมรับ คำนวณค่า HORRAT จากสมการ Horwitz (William และ Richard, 1995) มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ $HORRAT \leq 2$ และประเมินค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ซึ่งต้องพิจารณาด้วยว่าค่า %RSD_r < Horwitz %RSD_r จึงจะสามารถนำค่า SD มาคำนวณได้ (Codex, 2015) เมื่อประเมินด้วยวิธีการคำนวณและทำการยืนยันผลการประเมินแล้วพบว่าค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ รายละเอียดผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid

No.	Analyte	Linearity / Range (mg/kg)	Spike Level (mg/kg)	Replicate (n)	%Recovery				%RSD _r	Horwitz %RSD _r	HORRAT	LOD (3SD) _{cal}	LOQ (10SD) _{cal}
					min	max	mean	SD					
1	imidacloprid	0.005 - 2.0	0.01	10	92	107	99	0.0005	4.76	10.57	0.45	0.001	0.005
2	6-chloronicotinic acid	0.005 - 2.0	0.01	10	73	92	81	0.0008	9.68	10.90	0.89	0.002	0.008
3	olefin	0.005 - 2.0	0.02	10	88	112	97	0.0011	6.33	9.55	0.66	0.004	0.012
4	5-hydroxy	0.005 - 2.0	0.01	10	93	109	101	0.0006	5.80	10.54	0.55	0.002	0.006
5	4,5-hydroxy	0.005 - 2.0	0.02	10	97	111	102	0.0010	4.65	9.49	0.49	0.003	0.009
6	urea	0.005 - 2.0	0.01	10	85	98	89	0.0004	4.16	10.74	0.39	0.001	0.004

ทำการทดลอง จำนวน 6 แปลงต่างพื้นที่กัน แปลงที่ 1 ทำการทดลองที่ ต.ปลายนา อ.ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี ในระหว่างเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน 2559 และแปลงที่ 2 ทำการทดลองที่ ต.ปากน้ำ อ.เดิมบางนางบวช จ.สุพรรณบุรี ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม 2559 แปลงที่ 3 ทำการทดลองที่ ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ในระหว่างเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2561 แปลงที่ 4 ทำการทดลองที่ ต.อบทม อ.สามโก้ จ.อ่างทอง ใน

ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ – เมษายน 2561 แปลงที่ 5 ทำการทดลองที่ ต.ท่าซุ่มพล อ.โพธาราม จ.ราชบุรี ในระหว่างเดือนธันวาคม 2561 – มกราคม 2562 และแปลงที่ 6 ทำการทดลองที่ ต.หนองนกไข่ อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร ในระหว่างเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2562 แต่ละแปลงทดลองมี 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองย่อยที่ 1 แปลงควบคุม ไม่พ่นสารสำหรับใช้เป็นแปลงเปรียบเทียบกับแปลงที่พ่นสาร และการทดลองย่อยที่ 2 พ่นสาร imidacloprid 10% W/V SL อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (สมศักดิ์ และคณะ, 2554) อัตราการใช้น้ำ 100 ลิตรต่อไร่ (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2553) ดำเนินการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงมะเขือเปราะ (*Solanum virginianum* Linn.) ก่อนระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตประมาณ 21 วัน โดยพ่นสาร imidacloprid 7 วันต่อครั้ง รวม 3 ครั้ง ก่อนการพ่นสารทุกครั้งต้องตรวจสอบอัตราการไหลของเครื่องพ่นให้สม่ำเสมอตามระบบ GLP สุ่มเก็บตัวอย่างผลผลิตจากแปลงทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0 (2 ชั่วโมงหลังการพ่น), 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ภายหลังจากพ่นสารครั้งสุดท้าย นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของ imidacloprid ในมะเขือ ด้วยวิธีการ QuEChERS Alkaline Hydrolysis (Unitedchem, 2013) ซึ่งทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการแล้ว ตรวจสอบด้วยเทคนิค Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณสารพิษตกค้างของ imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ในมะเขือที่ระยะเวลาต่างๆ ของแปลงทดลองที่ 1-6

ระยะเวลา หลังการพ่น ครั้งสุดท้าย (วัน)	ปริมาณสารพิษตกค้างเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, mg/kg)							
	แปลง ควบคุม	แปลงอัตราแนะนำ						
		imidacloprid	6-chloronicotinic acid as imidacloprid	olefin	5-hydroxy as imidacloprid	4,5-hydroxy	urea	Total ^{1/} Imidacloprid
แปลงทดลองที่ 1 อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี								
0 ^{2/}	ND ^{3/}	0.110	0.007	ND	0.006	ND	ND	0.12
3	ND	0.067	0.009	ND	0.007	ND	ND	0.08
5	ND	0.056	0.009	ND	0.007	ND	ND	0.07
7	ND	0.042	0.011	ND	0.008	ND	ND	0.06

แปลงทดลองที่ 5 อ.โพธาราม จ.ราชบุรี								
0	ND	0.172	ND	ND	<0.006	ND	ND	0.18
1	ND	0.053	ND	ND	<0.006	ND	ND	0.06
3	ND	0.036	<0.008	ND	<0.006	ND	ND	0.04
5	ND	0.033	ND	ND	<0.006	ND	ND	0.04
7	ND	0.022	<0.008	ND	<0.006	ND	ND	0.03
14	ND	0.008	<0.008	ND	<0.006	ND	ND	0.01
21	ND	0.005	ND	ND	<0.006	ND	ND	0.01
แปลงทดลองที่ 6 อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร								
0	ND	0.159	<0.008	ND	ND	ND	ND	0.17
1	ND	0.102	<0.008	ND	ND	ND	ND	0.11
3	ND	0.090	<0.008	ND	ND	ND	ND	0.10
5	ND	0.065	0.008	ND	ND	ND	ND	0.08
7	ND	0.059	0.008	ND	ND	ND	ND	0.07
14	ND	0.011	<0.008	ND	ND	ND	ND	0.02
21	ND	<0.005	<0.008	ND	ND	ND	ND	0.01

1/ Total imidacloprid หมายถึง ผลรวมของ imidacloprid และเมตาบอไลต์ที่ประกอบด้วย 6-คลอโรไพริดีนิล ส่วนหนึ่ง (6-chloropyridinyl moiety) รายงานผลเป็น imidacloprid (JMPR, 2015)

2/ ระยะเวลา 2 ชั่วโมงหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย

3/ ND คือ not detectable

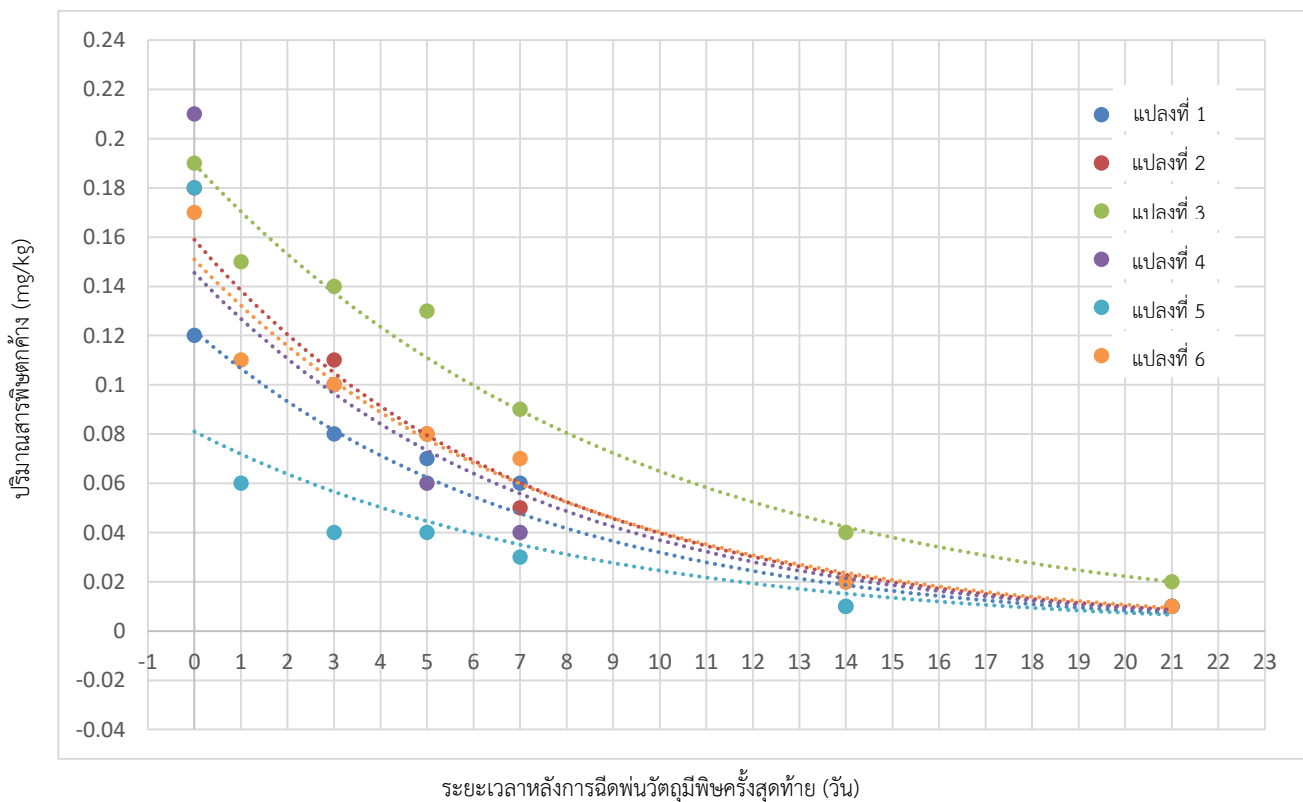
4/ LOQ ของ imidacloprid คือ 0.005, 6-chloronicotinic acid คือ 0.008 และ 5-hydroxy คือ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารกำจัดศัตรูพืชตามอัตราแนะนำ พบปริมาณสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ในแปลงทดลองที่ 1 ดังนี้ สารพิษตกค้าง imidacloprid ตรวจพบ 0.110, 0.067, 0.056, 0.042 และ 0.008 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลา 21 วัน ตรวจไม่พบสารตกค้าง อนุพันธ์ของ imidacloprid ชนิด 6-chloronicotinic acid ตรวจพบ 0.007, 0.009, 0.009, 0.011 และ 0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลา 21 วัน ตรวจไม่พบสารตกค้าง และอนุพันธ์ของ imidacloprid ชนิด 5-hydroxy ตรวจพบ 0.006, 0.007, 0.007 และ 0.008 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลา 14 และ 21 วัน ตรวจไม่พบสารตกค้าง ส่วนอนุพันธ์ของ imidacloprid ชนิด olefin, imidacloprid-4,5-dihydroxy และ urea ตรวจไม่พบสารตกค้างในทุกตัวอย่างของการทดลอง และแปลงควบคุมตรวจไม่พบสารตกค้างในทุกตัวอย่างของการทดลอง

ทำการประเมินผลการตรวจพบสารพิษตกค้างตามรูปแบบการรายงานผลของ JMPR (2015) ที่กำหนดให้รายงานในรูปของผลรวมของ imidacloprid และเมตาบอไลต์ที่ประกอบด้วย 6-คลอโรไพริดีนิล ส่วนหนึ่ง (6-

chloropyridinyl moiety) รายงานผลเป็น imidacloprid ซึ่งประกอบด้วย imidacloprid, 6-chloronicotinic acid, olefin, 5-hydroxy, dihydroxy และ urea สำหรับแปลงทดลองที่ 1 ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7 และ 14 วัน ดังนี้ 0.12, 0.08, 0.07, 0.06, 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และไม่พบสารพิษตกค้าง ที่ระยะเวลา 21 วัน

ผลการทดลองในแปลงทดลองที่ 2 ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน พบปริมาณสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ดังนี้ 0.18, 0.11, 0.08, 0.05, 0.02 และน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แปลงทดลองที่ 3 พบปริมาณสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ดังนี้ 0.19, 0.15, 0.14, 0.13, 0.09, 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ แปลงทดลองที่ 4 พบปริมาณสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ดังนี้ 0.21, 0.10, 0.06, 0.04, 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ สำหรับแปลงทดลองที่ 5 พบปริมาณสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ดังนี้ 0.18, 0.06, 0.04, 0.04, 0.03, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ และแปลงทดลองที่ 6 พบปริมาณสารพิษตกค้าง imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid ดังนี้ 0.17, 0.11, 0.10, 0.08, 0.07, 0.02 และ 0.01 ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ



ภาพที่ 3 แสดงอัตราการสลายตัวของสารพิษตกค้างรวมของ imidacloprid ในมะเขือแปลงทดลองที่ 1-6

จากภาพที่ 3 พบว่าปริมาณสารพิษตกค้างผลรวมของ imidacloprid และเมตาบอไลต์ที่ประกอบด้วย 6-chloronicotinic acid, olefin, 5-hydroxy, dihydroxy และ urea มีปริมาณการตกค้างสูงสุดจากการทดลองในแปลงที่ 1 – 6 ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ดังนี้ 0.21, 0.14, 0.13, 0.09, 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยปริมาณสารพิษตกค้างของอิมิดาโคลพริด (imidacloprid) ในมะเขือเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (Maximum Residue Limit, MRL) วางแผนการทดลองแบบ supervise residue trial ตาม Codex Guidelines ทำการทดลอง จำนวน 2 แปลงต่างพื้นที่กัน พบว่าเมื่อใช้สาร imidacloprid 10% W/V SL อัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการใช้น้ำ 100 ลิตรต่อไร่ พ่นสาร imidacloprid ในแปลงมะเขือทุก 7 วันต่อครั้ง รวม 3 ครั้ง พบว่า imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid มีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว โดยที่แปลงทดลองที่ 1 ที่ระยะเวลา 0, 3, 5, 7 และ 14 วัน ดังนี้ 0.12, 0.08, 0.07, 0.06, 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และไม่พบสารพิษตกค้าง ที่ระยะเวลา 21 วัน แปลงทดลองที่ 2 พบปริมาณสารพิษตกค้าง 0.18, 0.11, 0.08, 0.05, 0.02 และน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลาดังกล่าวตามลำดับ แปลงทดลองที่ 3 พบปริมาณสารพิษตกค้าง 0.19, 0.14, 0.13, 0.09, 0.04 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลาดังกล่าวตามลำดับ แปลงทดลองที่ 4 พบปริมาณสารพิษตกค้าง 0.21, 0.10, 0.06, 0.04, 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลาดังกล่าวตามลำดับ แปลงทดลองที่ 5 พบปริมาณสารพิษตกค้าง 0.18, 0.04, 0.04, 0.03, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลาดังกล่าวตามลำดับ และแปลงทดลองที่ 6 พบปริมาณสารพิษตกค้าง 0.17, 0.10, 0.08, 0.07, 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลาดังกล่าวตามลำดับ ที่ระยะเวลาดังกล่าวตามลำดับ ส่วนแปลงควบคุม ตรวจไม่พบสารตกค้างในทุกตัวอย่างของการทดลองทั้ง 6 แปลง กำหนดให้ค่า LOD และ LOQ ของวิธีการทดสอบ เท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ หากพิจารณาข้อมูลการจากตรวจพบสารตกค้าง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Codex-MRL ได้กำหนดค่าของ imidacloprid ในมะเขือ (eggplant) เท่ากับ 0.2 mg/kg กลุ่มประเทศสหภาพยุโรปกำหนดค่า EU-MRL ของ imidacloprid ในมะเขือ (aubergines/eggplants) เท่ากับ 0.5 mg/kg ส่วนในประเทศไทยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ไม่ได้กำหนดค่าสารพิษตกค้างที่กำหนดให้มีในอาหารของไทย (Thai-MRL) ของ imidacloprid ในมะเขือ แต่ได้กำหนดค่าในกะเพรา แมงลัก ยี่หระ และโหระพา 20 mg/kg ส้มเป็ลือกลอน 1 mg/kg ลำไย 0.8 mg/kg มะม่วง 0.4 mg/kg กระเจี๊ยบเขียว 0.1 mg/kg ข้าวเปลือกและข้าวสาร 0.05 mg/kg (มกษ. 9002-

2559) ดังนั้น ข้อมูลจากการทดลองที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการพิจารณากำหนดค่า MRL สารพิษตกค้างของประเทศ ไทยสำหรับ imidacloprid ในมะเขือต่อไป เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลเอกสารคำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและ สัตว์ศัตรูพืช ปี 2553 ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (สอพ.) กรมวิชาการเกษตร ระบุให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลังการ พ่นสารครั้งสุดท้าย 14 วัน ผลจากการทดลองพบว่าสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตามเอกสารระบุ จึงจะสามารถบริโภค มะเขือหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้ายได้อย่างปลอดภัย แต่ทั้งนี้เกษตรกรผู้ปลูกมะเขือก็ควรปฏิบัติตามหลัก GAP และ เลือกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อป้องกันและควบคุมศัตรูพืชตามการระบาดเท่านั้น และควรใช้ตามคำแนะนำ อย่างเคร่งครัด ถึงแม้ imidacloprid จะเป็นสารที่มีพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลื้อยคลานต่ำกว่าแมลง โดยเฉพาะผึ้งก็ตาม

ทั้งนี้จากการประชุมของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการ ผลิตทางการเกษตร ในวันที่ 13 มีนาคม 2560 ได้นำเสนอผลจากการทำแปลงทดลองพื้นที่และรายงานผลการตรวจ วิเคราะห์สารพิษตกค้างของ imidacloprid ในมะเขือ ได้มีกำหนดค่า PHI ที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่า MRL ตามชนิดพืชสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ที่ได้ทำการทดลองสารพิษตกค้างแล้ว โดยใช้ข้อมูลสารพิษตกค้างที่ตรวจพบ เปรียบเทียบกับค่า Codex-MRL, EU-MRL และ Japan-MRL กำหนดให้การใช้สาร imidacloprid 10% W/V SL อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ในมะเขือ มีค่า PHI เท่ากับ 2 วัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลการสลายตัวของอิมิดาโคลพริด (imidacloprid) ในมะเขือเพื่อนำไปใช้ในการพิจารณากำหนดค่า ปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างของประเทศไทย ตลอดจนนำไปเสนอ เพื่อกำหนดค่า MRL ของอาเซียนและของ Codex ต่อไป

2. ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจมะเขือจากแหล่งผลิต และแหล่งจำหน่ายจะเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ทราบถึง สถานการณ์สารพิษตกค้างในผลผลิตการเกษตร เพื่อเป็นข้อมูลในการคุ้มครองผู้บริโภค และแนวทางในการแก้ปัญหา สารพิษตกค้างในมะเขือ หรือพืชผักอื่นๆ เพื่อให้การผลิตผักของประเทศไทยมีคุณภาพปลอดภัยเป็นที่ยอมรับทั้งใน ประเทศและต่างประเทศ

3. ระยะเวลาหลังจาก 14 วันหลังจากการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid ในมะเขือตามอัตรา แนะนำ เป็นระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมและปลอดภัย ซึ่งสามารถนำไปแนะนำให้เกษตรกรใช้เก็บเกี่ยวผลผลิต อย่างถูกต้องและปลอดภัย เพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างในผลิตผลการเกษตรและสิ่งแวดล้อมซึ่งจะช่วยให้เกิดความ ปลอดภัยต่อ ผู้บริโภคและในการส่งออก

4. นำข้อมูลระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมที่ได้มาร่วมพิจารณาการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง ของ imidacloprid ในผลผลิตการเกษตรในประเทศ (National MRL) ซึ่งเป็นผลดีในด้านเศรษฐกิจ โดยใช้เป็นค่า ต่อรองและรักษาผลประโยชน์ในการค้าขายผลผลิตทางการเกษตรระหว่างประเทศ

5. ข้อมูลจากการทดลองนี้นำไปเผยแพร่แก่นักวิชาการในกรมวิชาการเกษตร และหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง นิสิต นักศึกษา ประชาชน เกษตรกร ได้ทราบถึงสารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช imidacloprid ในมะเขือ และระมัดระวังการบริโภคให้ปลอดภัย

11. คำขอขอบคุณ (ถ้ามี)

คณะผู้ดำเนินการทดลอง ต้องขอขอบคุณเกษตรกรทุกท่านที่ยินยอมให้ผู้วิจัยใช้พื้นที่ทางการเกษตรในการปฏิบัติงานตามแผนการดำเนินงานที่ได้กำหนดไว้ ดูแลแปลงทดลองรวมทั้งอำนวยความสะดวกการปฏิบัติงานของผู้วิจัย จนทำให้การทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2555. การกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRLs). เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเพื่อเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. 15-16 พฤศจิกายน 2555. 56-69.

สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2559. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ.9002-2559 สารพิษตกค้าง-ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 133 ตอนพิเศษ 288 ง วันที่ 13 ธันวาคม พุทธศักราช 2559. 55 หน้า.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2553. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช. กรมวิชาการเกษตร. 303 หน้า.

สมศักดิ์ สิริพลตั้งมั่น อุราพร หนูนารถ สมรวย รวมชัยอภิกุล และศรีจันทร์ ศรีจันทร์. 2554. เอกสารวิชาการแมลงศัตรูเห็ด ผัก และไม้ดอก. กลุ่มบริหารศัตรูพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 74 หน้า.

อังคณา สุวรรณภูฏ. 2556. นิโอนิโคตินอยด์. จดหมายข่าวผลิใบ ก้าวใหม่การวิจัยและพัฒนาการเกษตร. ปีที่ 16 ฉบับที่ 3. 5-10.

Codex Alimentarius. 2015. Codex Alimentarius Commission Procedure Manual, 23rd ed.

Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed. 62 p.

- SANCO. 2014. Guidance document on analytical quality and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Commission. Document No SANCO/12571/ 2013, Implemented 2014. 42 p.
- FAO. 2016. 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. FAO, Rome. 286 p.
- Horwitz, W. and R. Albert. 1995. Precision in analytical measurements: Expected values and consequences in geochemical analysis. Fresenius J Anal Chem, 351:507-513
- JMPR. 2015. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Pesticide Residues 47th Session. Beijing, P.R. China, 13-18 April 2015.
- Suchail S. Sousa G.D. Rahmani R. and Belzunces L.P. 2004. In vivo distribution and metabolism of ¹⁴C-imidacloprid in different compartments of Apis mellifera L. Pest Management Science. Society of Chemical Industry. 60: 1056–1062.
- Unitedchem, 2013. Determination of Chlorophenoxyacetic Acid and Other Acidic Herbicides Using a QuEChERS Sample Preparation Approach and LC-MS/MS Analysis. 7 p.

13. ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

การคำนวณกรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ของอิมิดาโคลพริด (imidacloprid)

การคำนวณหาอัตราการใช้สารเคมีต่อครั้ง

ใช้อัตราที่แนะนำตามเอกสารวิชาการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี พ.ศ. 2554 เรื่อง แมลงศัตรูผัก เห็ด และไม้ดอก จัดทำโดยกลุ่มบริหารศัตรูพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา ของกรมวิชาการเกษตร (สมศักดิ์ สิริพลตั้งมั่น และคณะ, 2554) ซึ่งจะระบุเป็นปริมาณสารเคมี (กรัม หรือ มิลลิลิตร) ต่อน้ำ 20 ลิตร นำอัตรานี้มาคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ กิโลกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ลิตร (kg a.i./hl^{1/}) โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณสาร (kg ai/hl)} = \frac{\text{ปริมาณสาร (g หรือ ml) ที่แนะนำต่อน้ำ 20 ลิตร} \times \% \text{concentration}}{20,000}$$

จากคำแนะนำของเอกสารฯ ให้ใช้ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น ปริมาณสาร (kg a.i./hl)} &= \frac{40 \text{ มิลลิลิตร} \times 10\%}{20,000} \\ &= 0.02 \text{ กรัมของสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ (g a.i./hl)} \end{aligned}$$

การคำนวณปริมาณสารเคมีที่ใช้ต่อพื้นที่ในหน่วย kg ai/ha^{3/}

เอกสารคำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูศัตรูพืช ปี 2553 ของกรมวิชาการเกษตร อัตราการใช้ น้ำ ถ้าพืชอายุ 30-60 วันหลังการปลูก ใช้น้ำละ 80 ลิตร อายุเกิน 60 วัน ใช้น้ำไร่ละ 100 ลิตร^{2/}

โดยคำแนะนำของเอกสารฯ ให้ใช้ imidacloprid 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

ดังนั้น น้ำ 20 ลิตร มี imidacloprid 40 มิลลิลิตร

$$\text{ถ้า น้ำ 100 ลิตร จะมี imidacloprid } \frac{40 \text{ มิลลิลิตร} \times 100 \text{ ลิตร}}{20 \text{ ลิตร}} = 200 \text{ กรัมของสารออกฤทธิ์ (g a.i.)}$$

ซึ่งอิมิดาโคลพริด ระบุความเข้มข้นเท่ากับ 10%

ดังนั้นใน 100 กรัม มี imidacloprid 10 กรัม

$$\text{ถ้าใน 200 กรัม จะมี imidacloprid } \frac{10 \text{ กรัม} \times 200 \text{ กรัม}}{100 \text{ กรัม}} = 20 \text{ กรัมของสารออกฤทธิ์ต่อไร่ (g a.i./rai)}$$

เปลี่ยนจากหน่วยไร่ (rai) เป็น Hectares (ha)

จาก 1 (Hectares) ha มี 6.25 ไร่

ซึ่งจากการคำนวณ 1 ไร่ มี imidacloprid 20 กรัมของสารออกฤทธิ์ (g a.i.)

$$\text{ดังนั้น 6.25 ไร่ มี imidacloprid } \frac{20 \text{ กรัม a.i.} \times 6.25 \text{ ไร่}}{1 \text{ ไร่}} = 125 \text{ กรัมของสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ (g a.i./ha)}$$

หรือ 0.125 กิโลกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ (kg a.i./ha)

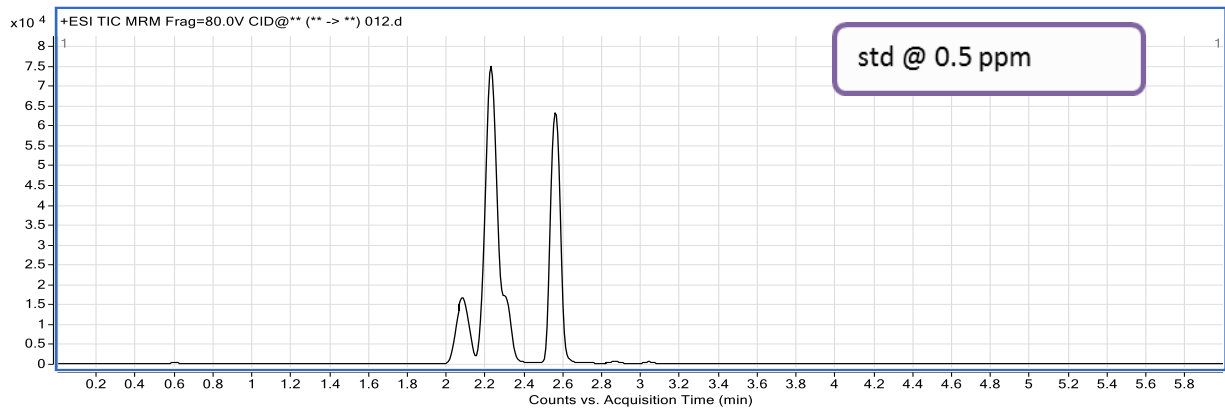
1/ Application rate (kg a.i./hl) is the recommendation from approved label.

2/ Spray volume (l/ha) is the additional recommendation from Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (Ref.: Recommendations on the control of Insect Pests, 2010)

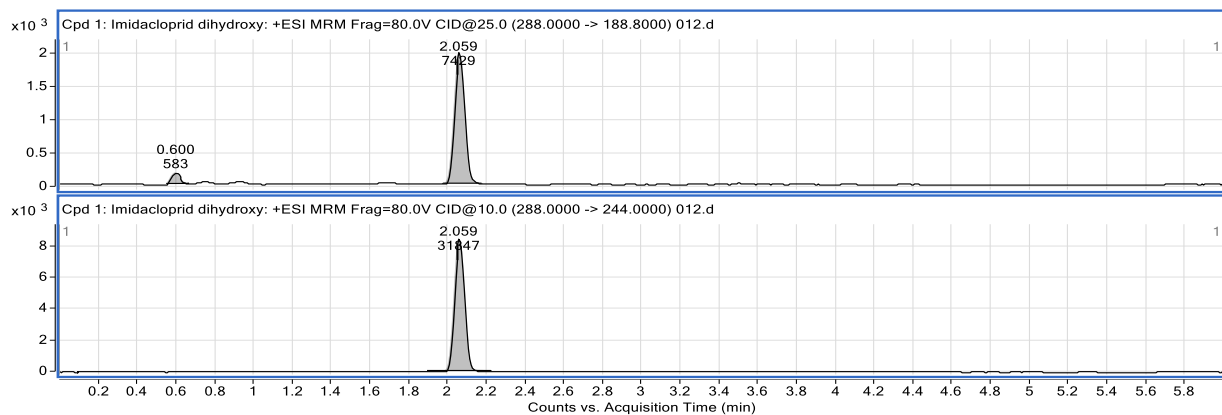
3/ Application rate (kg a.i./ha) is calculated from 1/ and 2/

ภาคผนวกที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์

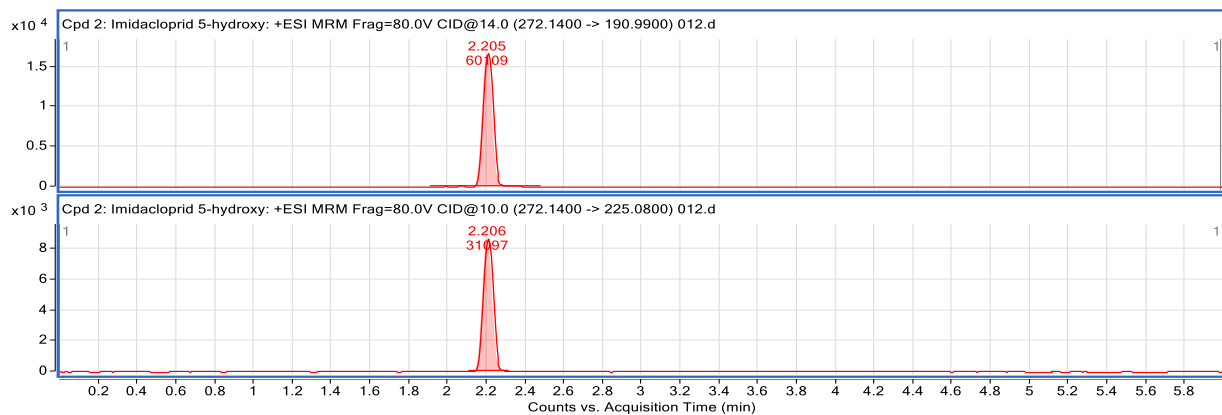
ภาพที่ ผ.2-1 TIC ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ imidacloprid และอนุพันธ์ของ imidacloprid



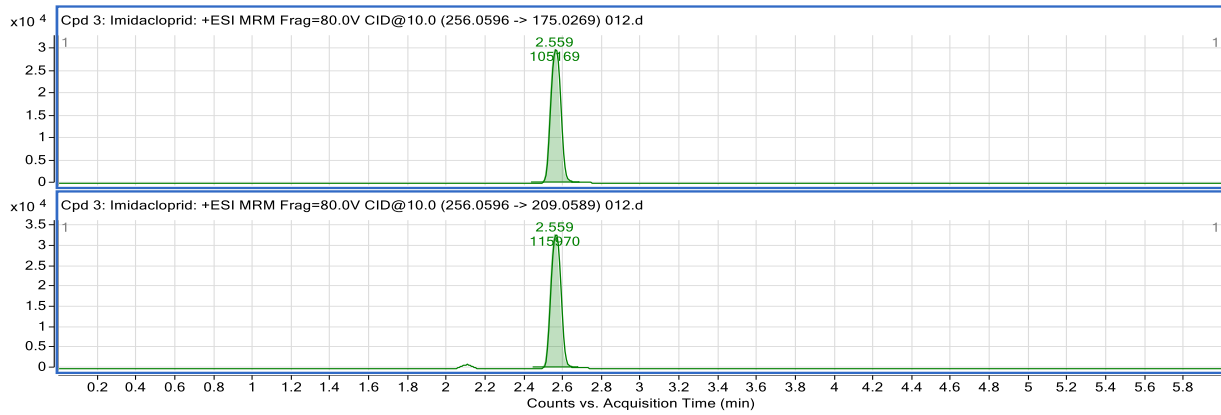
ภาพที่ ผ.2-2 MRM ของสาร imidacloprid-4,5-hydroxy



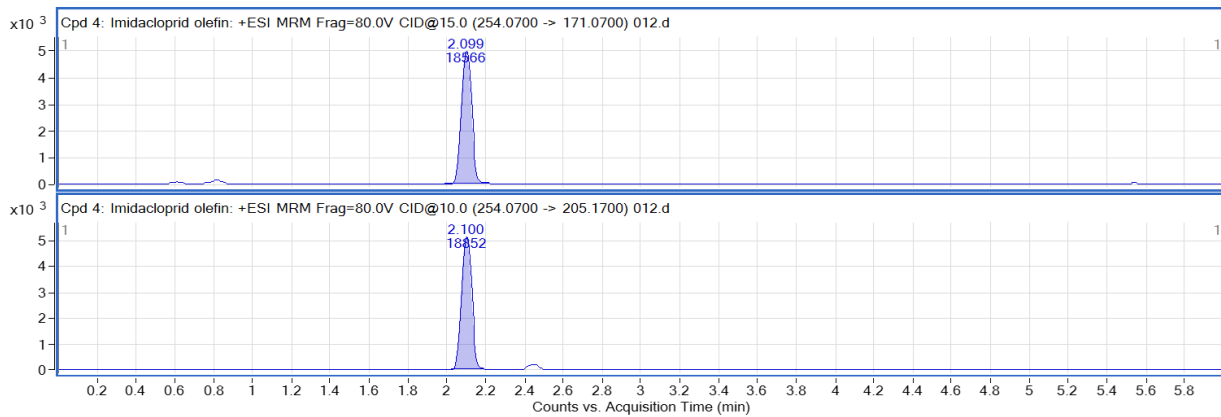
ภาพที่ ผ.2-3 MRM ของสาร imidacloprid-5-hydroxy



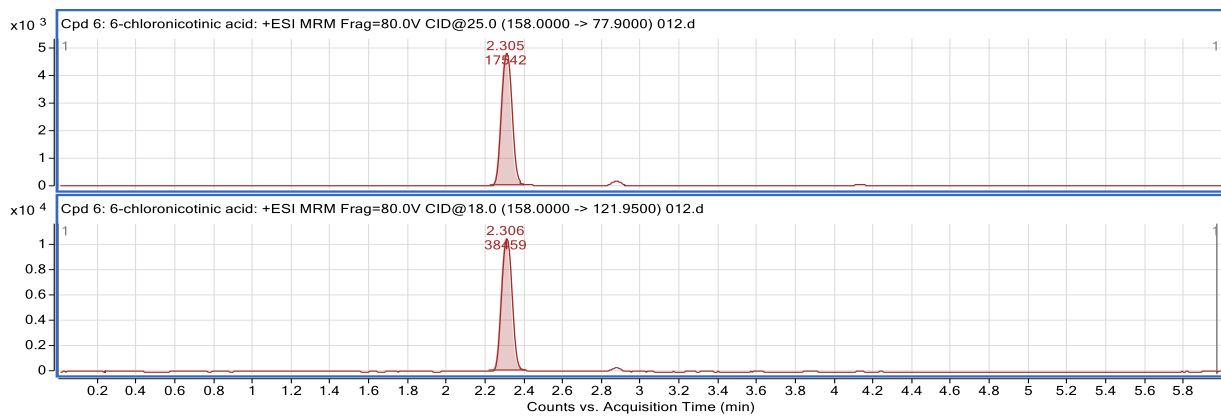
ภาพที่ ผ.2-4 MRM ของสาร imidacloprid



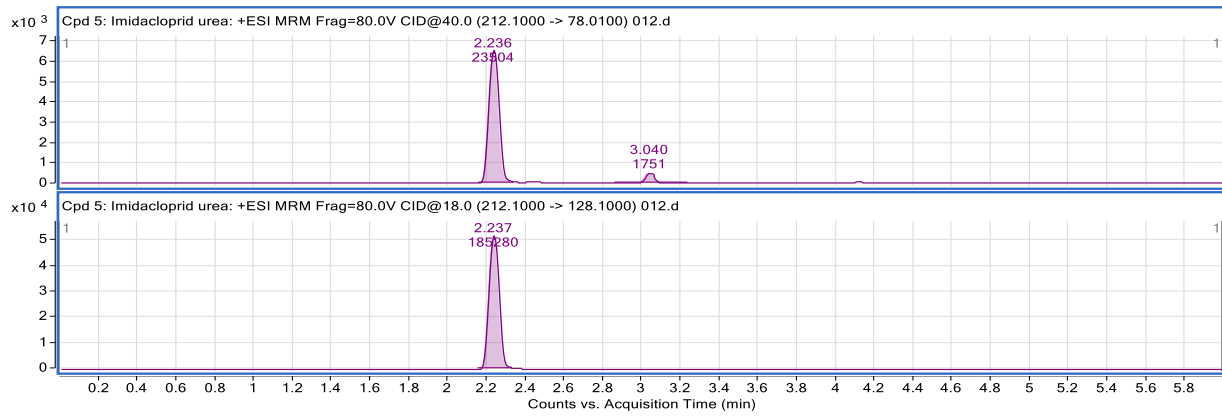
ภาพที่ ผ.2-5 MRM ของสาร imidacloprid olefin



ภาพที่ ผ.2-6 MRM ของสาร 6-chloronicotinic acid

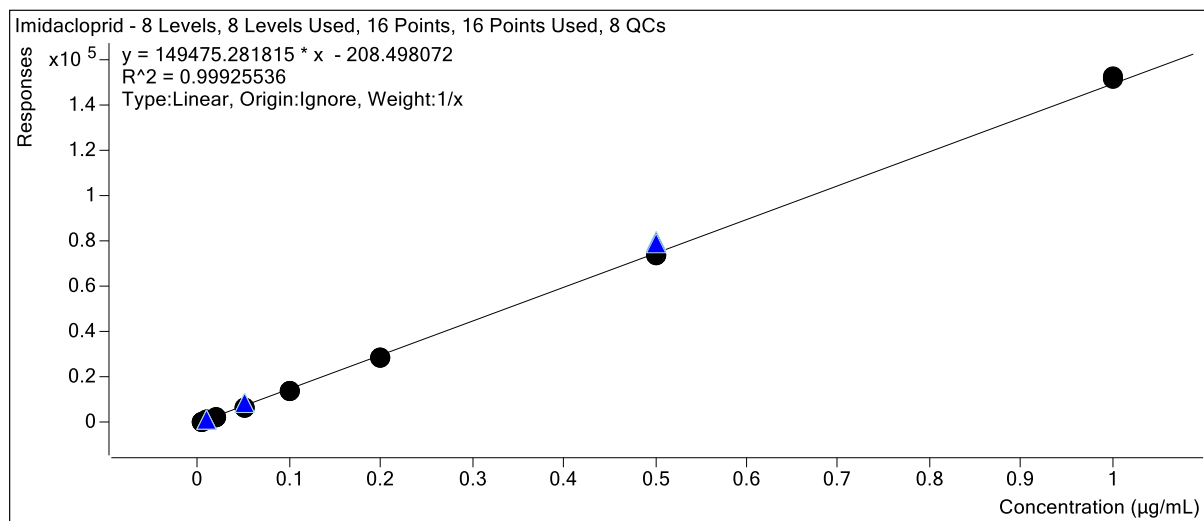


ภาพที่ ผ.2-7 MRM ของสาร imidacloprid urea

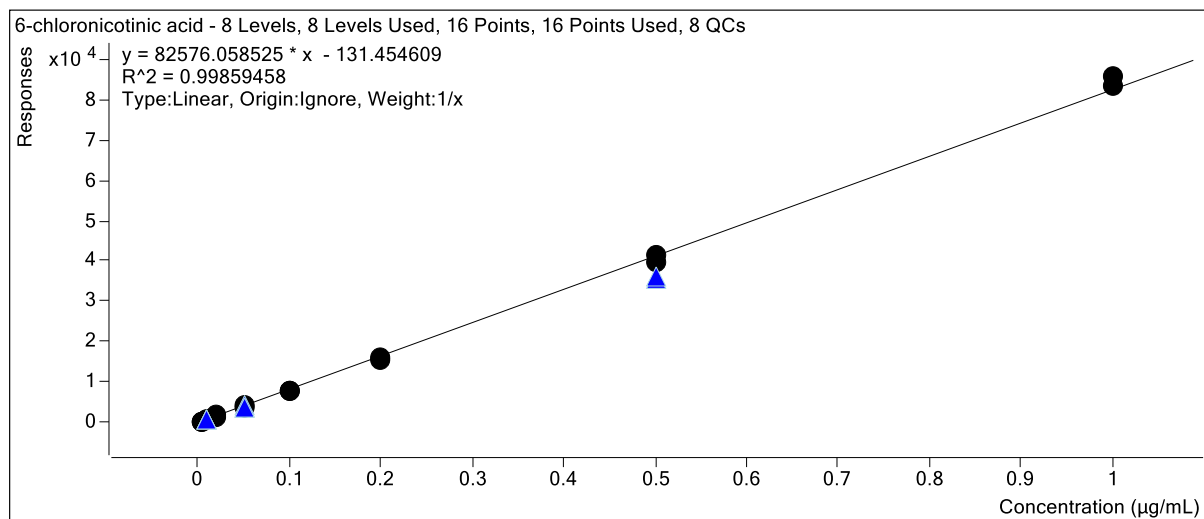


ภาคผนวกที่ 3 calibration curve ของสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์

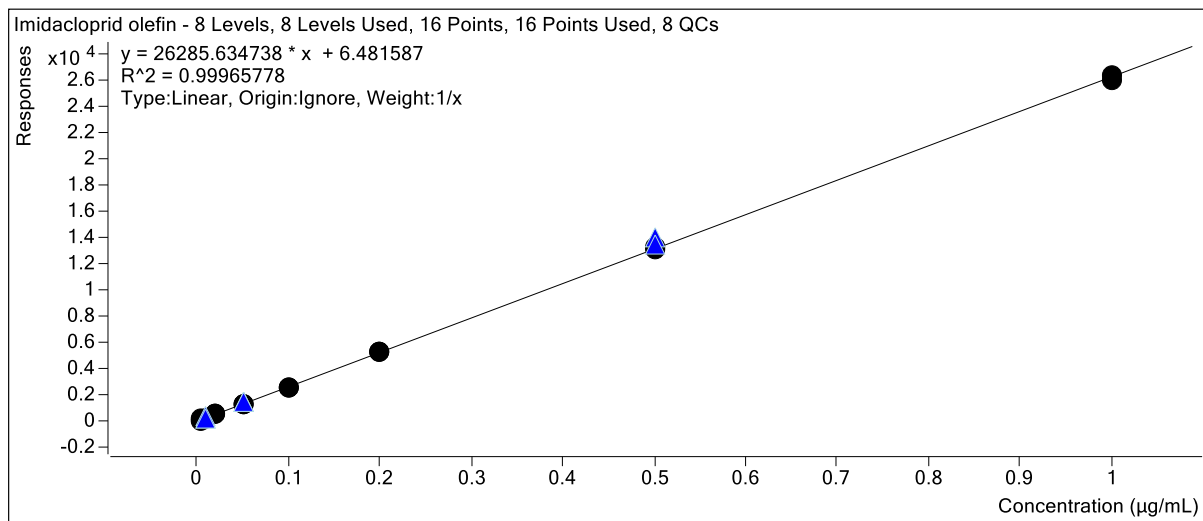
ภาพที่ ผ.3-1 calibration curve ของ imidacloprid



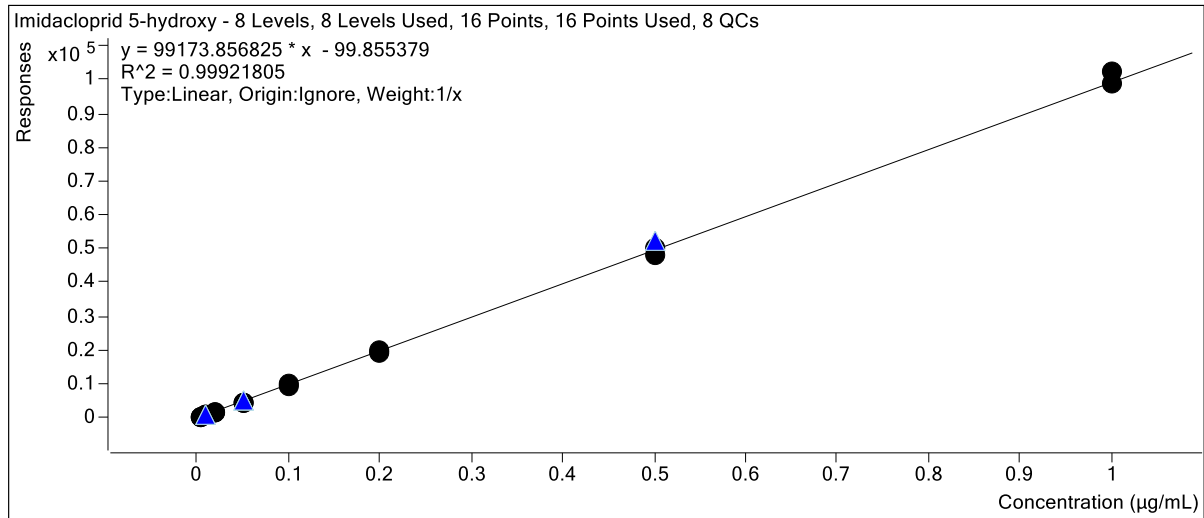
ภาพที่ ผ.3-2 calibration curve ของ 6-chloronicotinic acid



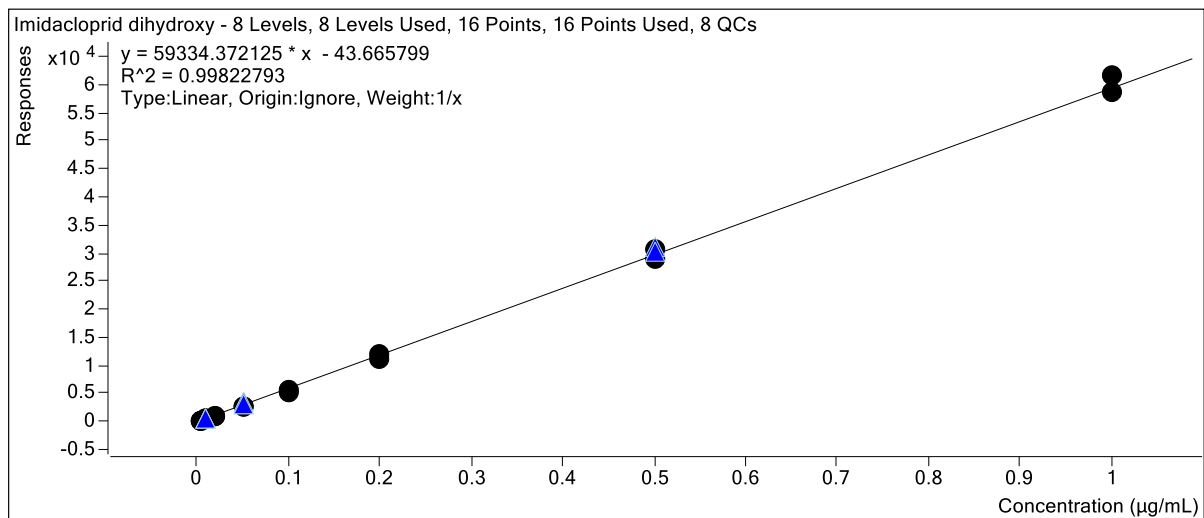
ภาพที่ ผ.3-3 calibration curve ของ imidacloprid olefin



ภาพที่ ผ.3-4 calibration curve ของ imidacloprid-5-hydroxy



ภาพที่ ผ.3-5 calibration curve ของ imidacloprid-4,5-hydroxy



ภาพที่ ผ.3-6 calibration curve ของ imidacloprid urea

