
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม ออร์กาโนฟอสฟอรัสและกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ ตกค้างพร้อมกันในอาหารบางชนิด โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

วีรวุฒิ วิทยานันท์ และธรรณศิริ ไชยมงคล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

E-mail: weerawut.w@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ การแยกสารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดออกจากอาหารอย่างมีประสิทธิภาพก่อนการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องเป็นขั้นตอนที่ยากและเป็นอุปสรรคสำคัญในงานวิเคราะห์ จึงได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ สารที่มีคุณสมบัติทางเคมีหลากหลายพร้อมกันอย่างง่าย โดยปรับปรุงจากหลักการเตรียมตัวอย่าง AOAC 2007.01 เพื่อตรวจ วิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 21 ชนิด และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ 8 ชนิดในอาหารบางชนิด ได้แก่ นมโค นมผง น้ำนมถั่วเหลือง และไข่ไก่ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดเอฟพีดี (GC - FPD) และชนิดอีซีดี (GC - ECD) พร้อมกัน ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่ากราฟมาตรฐานและช่วงของการวัดของสารทุกชนิดมีความเป็น เส้นตรงในช่วง 20 - 300 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม และ 10 - 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่าง 0.995 และ 0.999 มีความแม่นยำในอาหารชนิดต่างๆ แสดงด้วยร้อยละของการกลับคืน (% recovery) ที่ระดับ 10, 30 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในช่วงร้อยละ 25.5 ถึง 173.8 และมีความเที่ยงแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในช่วงร้อยละ 1.1 ถึง 30.4 และมีสารบางชนิดไม่สามารถตรวจวัดได้ ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิง ปริมาณเท่ากับ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ เปรียบเทียบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ใช้อยู่เดิม ในห้องปฏิบัติการ (Onley method) พบว่าวิธีใหม่เป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ประหยัด และสามารถ วิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดได้พร้อมกัน การวิเคราะห์นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสารกลุ่มอื่นในอาหารชนิดอื่น ๆ และยังสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากของการวิเคราะห์งานประจำเพื่อลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้อีกด้วย

บทนำ

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชสังเคราะห์ถูกนำมาใช้ในภาคการเกษตรและสาธารณสุขอย่างกว้างขวางเมื่อราวหนึ่งร้อยปีที่ผ่านมา เมื่อมีการใช้ที่ไม่ถูกต้องเหมาะสมอาจตกค้างในพืช สัตว์ สิ่งแวดล้อม และสามารถถ่ายทอดสู่มนุษย์ได้ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽¹⁾ กำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL) ของสารกำจัดศัตรูพืชและปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่ปนเปื้อนจากสาเหตุที่ไม่อาจหลีกเลี่ยงได้ (Extraneous Maximum Residue Limit, EMRL) ซึ่งเป็นสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine compounds, OCs) ตกค้างในอาหารที่มีไขมัน สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาวิธี⁽²⁾ เพื่อตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม OCs ในนม และเปิดให้บริการโดยได้รับการรับรองคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 แต่ยังไม่มียุติวิธีที่สามารถวิเคราะห์สารชนิดอื่นในนมได้ สารเหล่านี้เป็นสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus compounds, OPs), กลุ่มสารสังเคราะห์ไพเรทรอยด์ (synthetic pyrethroids, SPs), กลุ่มคาร์บาเมต (carbamates, CARs) และสารอื่นๆ นอกจากนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 350) พ.ศ. 2556 เรื่อง นมโค⁽³⁾ ระบุว่าคุณสมบัติของนมต้องไม่มีสารที่อาจเป็นพิษหรือสารปนเปื้อนในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ประกอบกับปัจจุบันยังไม่มีรายงานที่ระบุถึงสถานการณ์การตกค้างของสารเคมีดังกล่าวในประเทศไทย ดังนั้นกระทรวงสาธารณสุขจึงต้องมีวิธีตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสม มีความถูกต้องของวิธี และครอบคลุมจำนวนสารที่มีค่ากำหนดตามกฎหมายเพื่อการเฝ้าระวังความปลอดภัยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารเหล่านี้ที่จำหน่ายในประเทศ

ในอดีตสารกำจัดศัตรูพืชที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเป็นสารกลุ่ม OCs ซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน (fat soluble) วิธีที่ใช้วิเคราะห์อาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (fatty food) จึงถูกพัฒนาให้สามารถสกัดสารกลุ่ม OCs โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ละลายไขมันและสารสนใจออกจากตัวอย่าง แล้วจึงกำจัดไขมันออกอีกครั้ง จึงจะสามารถตรวจวัดด้วยเครื่องมือได้ จะเห็นว่าการวิเคราะห์อาหารที่เป็น fatty food นั้นต้องผ่านขั้นตอนการสกัดที่ใช้สารเคมีหลายชนิดในปริมาณมากและส่งผลถึงประสิทธิภาพการสกัดด้วย⁽⁴⁾ เนื่องจากสารกลุ่ม OCs มีความคงตัวสูงมาก ต่อมาจึงมีมาตรการห้ามใช้สารดังกล่าว หลังจากสารกลุ่มนี้ที่ตกค้างในห่วงโซ่อาหารมีปริมาณลดลงจากการยกเลิกการใช้งาน อุตสาหกรรมผู้ผลิตสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้พัฒนาสารกลุ่มใหม่ๆ ที่มีความคงทนในสภาพแวดล้อมน้อยกว่าและเป็นพิษต่อมนุษย์น้อยกว่าขึ้น อาทิ สารกลุ่ม OPs และสารกลุ่ม SPs เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้สามารถตกค้างในอาหารได้เช่นเดียวกัน

งานวิจัยหลายชิ้นมีการใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลายในการสกัด^(5,6,7) เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารที่มีความหลากหลายของคุณสมบัติทางเคมี ซึ่งเหมาะสมสำหรับอาหารที่มีไขมันไม่มาก เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารได้ครอบคลุมทั้งชนิดมีขั้วและไม่มีขั้ว และให้อัตราการกลับคืน (recovery) สูง และในขณะเดียวกันก็ไม่ละลายสารที่ไม่มีขั้ว เช่น ไขมัน และสารที่มีขั้วสูง เช่น โปรตีน เกลือ และน้ำตาล ออกมาระหว่างการสกัด วิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชใน low fatty food ที่เป็นที่ยอมรับแพร่หลายคือ วิธี matrix solid - phase dispersion (MSPD)^(8,9) และ วิธี quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS)⁽¹⁰⁾ ซึ่งมี Anastassiades และคณะเป็นผู้เสนอขึ้นในปี 2003 ในเวลาต่อมาได้ถูกใช้เป็นวิธีมาตรฐาน AOAC Official Method 2007.01 ในการวิเคราะห์ผักและผลไม้และได้ถูกพัฒนาดัดแปลงให้ใช้กับชนิดสารและชนิดอาหารที่หลากหลายขึ้นโดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น GC - MS/MS, LC - MS/MS และ GC/TOF - MS^(11,12) วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่าย และประหยัด จึงน่าจะเป็นวิธีที่สามารถนำมาปรับปรุงใช้ในห้องปฏิบัติการทดแทนวิธีของ Onley⁽¹³⁾ ที่ใช้อยู่ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาและทรัพยากรมาก งานวิจัยชิ้นนี้เลือกอาหารที่มีปริมาณไขมันตั้งแต่ 2% ถึง 30% โดยน้ำหนัก ได้แก่ นมโค นมผง นำนมถั่วเหลือง และไข่ไก่

เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยอาหารในการคุ้มครองผู้บริโภคซึ่งเป็นการกิจหลักของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารจึงดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์พร้อมกันในอาหารบางชนิดโดยดัดแปลงวิธี AOAC 2007.01 เพิ่มเติมจากสารกลุ่ม OCs ที่ได้ดำเนินการไปแล้ว แล้วเปรียบเทียบคุณลักษณะและประสิทธิภาพกับวิธีเดิมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (Onley method) เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ และตรวจติดตามการตกค้างเพื่อทำให้ทราบสถานการณ์และความรุนแรงของการตกค้างและนำมาประเมินความปลอดภัยของผู้บริโภคและหาแนวทางการป้องกันแก้ไขปัญหาที่เหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : acetonitrile (HPLC) และ acetone (HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของ J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา n - hexane (PR) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Scharlau ประเทศสเปน glacial acetic acid (AR) เป็นผลิตภัณฑ์ของ AnalaR ประเทศอังกฤษ ethyl acetate (HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Burdick & Jackson ประเทศเกาหลีใต้ magnesium sulfate anhydrous (MgSO_4) (AR) และ sodium acetate (NaOAc) (AR) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Merck KGaA ประเทศเยอรมนี mixture of 150 mg MgSO_4 , 50 mg Primary Secondary Amine sorbent (PSA) and 50 mg C18EC Part No: 5982-5122 Dispersive SPE 2ml, Fatty Samples, AOAC เป็นผลิตภัณฑ์ของ Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำ reverse osmosis (RO), acetonitrile +1 % acetic acid เตรียมโดยการตวง acetonitrile ประมาณ 200 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetic acid 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 250 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

สารมาตรฐาน (Standards) : สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (Organophosphorus compounds, OPs) จำนวน 21 สาร ได้แก่ acephate, azinphos - methyl, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, parathion - methyl, pirimiphos - methyl, phosalone, profenofos, prothiofos และ triazophos สารกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Synthetic pyrethroids, SPs) จำนวน 8 สาร ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate และ permethrin สารทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer ประเทศเยอรมนี ความบริสุทธิ์ (purity) ระหว่างร้อยละ 94.0 - 99.0

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน : เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานกลุ่ม OPs ใน acetone และกลุ่ม SPs ใน n - hexane ความเข้มข้นประมาณ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นกว่า -4 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายผสมของสารมาตรฐานกลุ่ม OPs 21 ชนิด และสารละลายผสมของสารมาตรฐานกลุ่ม SPs 8 ชนิด ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetone และ n - hexane ตามลำดับ โดยปิเปต stock solution สารมาตรฐานแต่ละชนิดประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายและเตรียมสารละลายผสมของสารมาตรฐาน 21 ชนิด และสารละลายผสมของสารมาตรฐานกลุ่ม SPs 8 ชนิด เพื่อทำ intermediate solution และ working solution ช่วงความเข้มข้น 0.02, 0.06, 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นกว่า -4 องศาเซลเซียส

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง และ 5 ตำแหน่งสำหรับชั่งสารมาตรฐาน เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) ความเร็วรอบ 3,500 - 4,000 รอบต่อนาที รุ่น HERMLE Z366 ประเทศเยอรมนี เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating box และใช้แก๊สไนโตรเจนในการระเหยสารสกัด REACTI - THERM III #TS - 18824 Thermo scientific เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vertex - 2Genie micropipette ขนาด 2 - 20 ไมโครลิตร ขนาด 20 - 200 ไมโครลิตร และขนาด 100 - 1,000 ไมโครลิตร amber vial ขนาด 4 หรือ 8 มิลลิลิตร centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร Pasteur pipette ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส certified volumetric flask ก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n - hexane 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

เครื่อง GC - FPD: Agilent Technology 6890N โดยใช้ analytical column: DB1701 (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness) และ DB-35ms (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness)

เครื่อง GC - ECD: Agilent Technology 6890N โดยใช้ analytical column: DB - 5MS (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness) และ Rtx - CLPesticides2 (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างอาหารในการทดสอบความถูกต้องของวิธี ได้แก่ นมโค นมผง น้ำนมถั่วเหลือง และไข่ไก่ ซึ่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น analytical portions โดยซึ่งตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นของเหลว ได้แก่ นมโค น้ำนมถั่วเหลือง และไข่ น้ำหนัก 10.0 ± 0.1 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นของแข็งหรือผง ได้แก่ นมผง น้ำหนัก 5.0 ± 0.05 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ก่อนการวิเคราะห์ให้เติมน้ำ RO ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าผสมกันแล้ววางทิ้งไว้ 15 นาที และตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส

การพัฒนาวิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์

ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างนมโคที่ซึ่งไว้มาเติม acetonitrile + 1% acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมืออย่างแรง 1 นาที แล้วเติม MgSO_4 4 กรัม และ NaOAc 1 กรัม แล้วเขย่าต่ออีก 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500 - 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดด้านบนส่วนใสที่ได้ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทดสอบประสิทธิภาพของการทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวดูดซับของแข็งแบบกระจาย (d - SPE) โดยในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นำสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนการสกัดใน centrifuge tube เติมตัวดูดซับของแข็งแบบกระจาย (d - SPE) ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

- 150 mg MgSO_4 + 50 mg PSA + 50 mg C18
- 150 mg MgSO_4 + 50 mg PSA + 50 mg GCB
- 150 mg MgSO_4 + 50 mg PSA + 50 mg GCB + 50 mg C18

หลังจากนั้นเขย่าประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500 - 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการประเมินประสิทธิภาพ d - SPE สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม SPs ด้วยเครื่อง GC - ECD เท่านั้นโดยสารสกัดส่วนใสที่ได้จะถูกนำไประเหยแห้งปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมของ n-hexane:ethyl acetate (3:1) แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ co - extractive ที่สกัดออกจากตัวอย่าง

โดยการคำนวณพื้นที่ใต้พีคทั้งหมด (Peak Area Sum) ส่วนการวิเคราะห์สารกลุ่ม OPs ไม่ต้องทำการประเมินเนื่องจากไม่มีพีคครบถ้วนใน GC-FPD

เลือก d - SPE ที่เหมาะสมหลังจากประเมินประสิทธิภาพของ d-SPE แล้ว ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยเติม d-SPE ที่คัดเลือกแล้วในสารสกัดปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากขั้นตอนการสกัด เขย่า 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500-4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ 2 มิลลิลิตรใส่ใน amber vial ขนาด 4 หรือ 8 มิลลิลิตร นำไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม n-hexane:ethyl acetate (3:1) จนครบ 1 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นตัวอย่าง 2 กรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับอาหารที่เป็นของเหลว และ 1 กรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับอาหารที่เป็นของแข็งก่อนนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเครื่อง GC - FPD และ GC - ECD

การตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง GC - FPD และ GC - ECD

ใช้เครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟีของ Agilent Technologies รุ่น 6890N ที่ติดตั้ง detector 2 ชนิดในเครื่องเดียวกัน ใช้ analytical column ที่ระบุในหัวข้อเครื่องมือและอุปกรณ์ ใช้ GC - FPD ในการตรวจวัดสารกลุ่ม OPs โดยใช้สภาวะเครื่องดังนี้ pulse splitless mode: pressure 17.5 psi, purge flow 60 ml/min, purge time 0.8 min ใช้ helium เป็น carrier gas มี flow rate 1.5 ml/min (constant flow) และใช้ nitrogen เป็น make up gas 60 ml/min จุด flame โดยใช้ hydrogen 75 ml/min และ air 100 ml/min มี injection volume เป็น 1 μ l มีอุณหภูมิ injector และ detector เป็น 220°C และ 200°C ตามลำดับ ใช้ GC - ECD ในการตรวจวัดสารกลุ่ม SPs โดยใช้สภาวะดังนี้ splitless mod: pressure 17.5 psi, purge flow 60 ml/min, purge time 0.8 min ใช้ helium เป็น carrier gas มี flow rate 1.5 ml/min (constant flow) และใช้ nitrogen เป็น make up gas 60 ml/min มีอุณหภูมิ injector และ detector เป็น 200°C และ 300°C ตามลำดับ สามารถวิเคราะห์สารทั้งสองกลุ่มได้ในคราวเดียวกันโดยใช้ oven temperature program เป็น initial 80°C hold 1 min, rate 20°C/min to 190°C, rate 2.5°C/min to 220°C, rate 1.5°C/min to 240°C, rate 8°C/min to final 270°C hold 8 min

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะของวิธี ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ ทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank และ sample blank เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal - to - noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี Retention time (RT) ใกล้เคียงกับสารที่สนใจถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ สร้างกราฟมาตรฐานแบบ matrix - matched calibration (MMC) โดยใช้สารสกัดที่ได้จากนมโคที่เป็น blank เป็นตัวทำละลาย เจือจาง intermediate standard solution ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและฉีดเข้าเครื่อง GC แบบสุ่ม (random, $n = 3$) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ โดยการเติมสารมาตรฐานในนมโค (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n = 3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

หาขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) โดยเติมสารละลายมาตรฐานทั้งหมดลงในสารสกัดจากนมโคแล้วนำไปวิเคราะห์หาค่า LOD ที่ระดับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำ ($n = 6$) แล้วคำนวณค่า S/N หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) โดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำ ($n = 6$) แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 60 - 120 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับ LOQ, 3xLOQ และ 10xLOQ ที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ ($n = 6$) แล้วคำนวณ %recovery และ RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 60 - 120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): RSD มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty, MU) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่ทำการทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM⁽¹⁴⁾ ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k = 2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

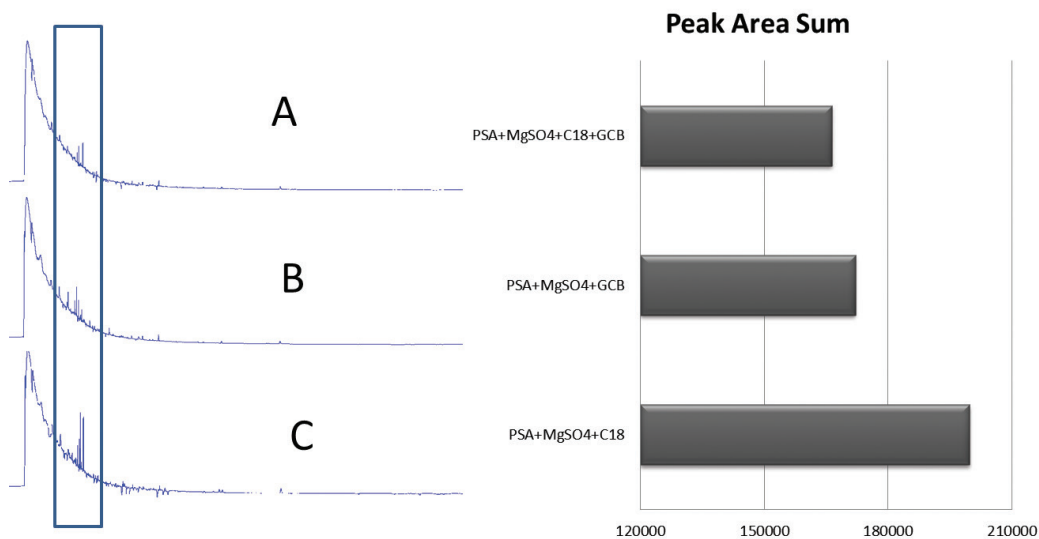
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีกับวิธี Onley⁽¹³⁾

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารกลุ่ม OPs และ กลุ่ม SPs ในนมโคที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี Onley โดยวิเคราะห์วิธีละ 6 ซ้ำ ($n = 6$) แล้วประเมินจากความแม่นยำ (%recovery) หลักการโดยสังเขปของวิธี Onley คืออาหารจะถูกทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยการปั่นกับสารผสมของตัวทำละลาย ได้แก่ acetone, acetonitrile, dioxane และ diethyl ether แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C กรองของแข็งออกด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดที่ได้ไปทำ liquid - liquid extraction ด้วยน้ำ RO ผสมน้ำเกลืออิ่มตัวปริมาณมากและ n-hexane เพื่อกำจัด co - extractive แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Florisil column โดยใช้ตัวทำละลายเป็น CH_2Cl_2 , CH_3CN และ n - hexane ก่อนการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC

ผล

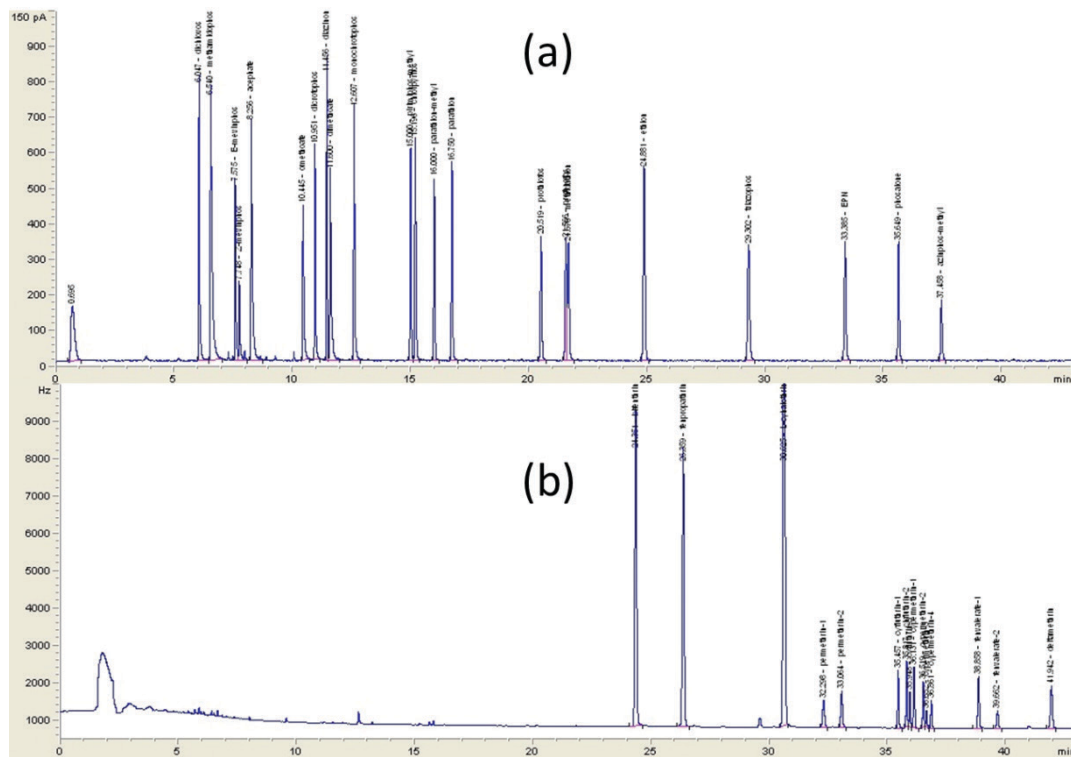
พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ขั้นตอนการสกัดที่อ้างอิงจากวิธี AOAC 2007.01 แต่เนื่องจากตัวอย่างอาหารที่ศึกษามีองค์ประกอบที่แตกต่างจากเอกสารอ้างอิง จึงศึกษาประสิทธิภาพของการทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวดูดซับของแข็งแบบกระจาย (d - SPE) ชนิดต่างๆ แสดงผลดังภาพที่ 1 เป็นโครมาโทแกรมจากเครื่อง GC - ECD ของการสกัดนมโคแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารผสมของตัวดูดซับแบบกระจายทั้งสามชนิด ประสิทธิภาพการทำให้บริสุทธิ์แสดงด้วย Peak Area Sum ซึ่งเป็นผลรวมของพื้นที่ใต้พีคทั้งหมดของการทำให้บริสุทธิ์ชนิดนั้นๆ ซึ่งเห็นว่าการใช้ส่วนผสมของ MgSO_4 , PSA, GCB และ C18 ให้ Peak Area Sum น้อยที่สุด หรือกล่าวได้ว่ามีปริมาณ co - extractive น้อยที่สุดและได้โครมาโทแกรมที่สะอาดที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม interference peaks ที่พบส่วนมากพบที่ retention time (RT) ที่ช่วงต้นเวลาของการวิเคราะห์หรือที่ RT น้อยๆ และอยู่นอก RT ของการวิเคราะห์สารกลุ่ม SPs

เลือกใช้ d - SPE ที่เป็นส่วนผสมของ MgSO_4 + PSA + C18 สำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในที่นี้ไม่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ d - SPE จากเครื่อง GC - FPD เนื่องจากเครื่องมือดังกล่าวไม่ให้โครมาโทแกรมที่มี interference peaks เลย

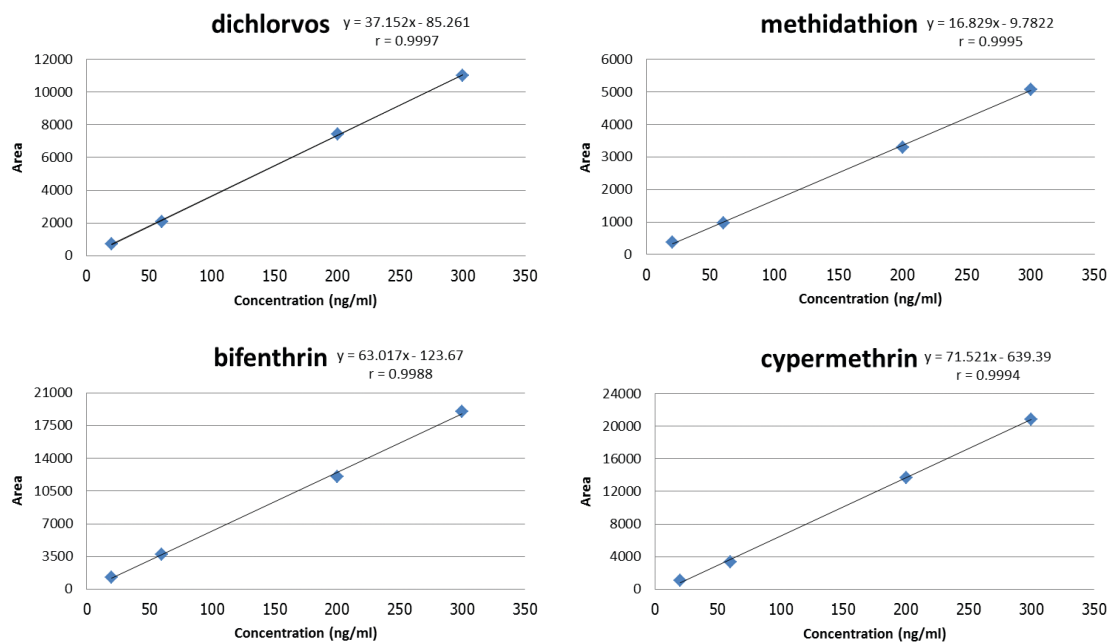


ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC - ECD ของการสกัดนมโคด้วยวิธี AOAC 2007.01 แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย (A) MgSO_4 + PSA + C18 + GCB (B) MgSO_4 + PSA + GCB และ (C) MgSO_4 + PSA + C18 และแผนภูมิแสดง Peak Area Sum ของการทำให้บริสุทธิ์แบบต่างๆ

การวิเคราะห์ method blank และ sample blank ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน สามารถแยกพีคและตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2) และสามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้ในช่วง 20 ถึง 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 3) โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า r สูงกว่า 0.995 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารทุกชนิดเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($S/N > 3$) แต่ไม่สามารถตรวจวัด azinphos - methyl ได้ โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีในตารางที่ 1 แสดงความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ, 3xLOQ และ 10xLOQ ที่ 10, 30 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ของการวิเคราะห์สารกลุ่ม OPs และ SPs ในนมโคชนิดเต็มมันเนย ความแม่นยำ (%recovery) ที่ระดับ LOQ มีค่าระหว่าง 63.6 - 99.8% และความเที่ยงจาก RSD มีค่าระหว่าง 1.1 - 15.0% ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงใน matrix อื่นๆ ได้แก่ นมผง นำนมถั่วเหลือง และไข่ไก่ ที่ระดับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีสารจำนวนมากที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีแล้วอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC⁽¹⁵⁾ ทั้งนี้หากพิจารณาใช้เกณฑ์จากเอกสารอ้างอิง SANCO (2015)⁽¹⁶⁾ ที่กำหนดเกณฑ์ยอมรับขยายเพื่อใช้ในงาน routine (recovery 50 - 150%) สารเกือบทุกชนิดในทุก matrix จะผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ในกรณีของไข่ไก่และนมผงจะมีจำนวนสารที่ไม่สามารถสกัดออกมาได้หลายชนิด ได้แก่ acephate, omethoate, dimethoate, EPN, phosalone และ azinphos - methyl จะสังเกตได้ว่าสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นกรด/เบสสูง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความเที่ยงสูงสังเกตได้จากค่า RSD ที่มีค่าน้อยมาก



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารกำจัดศัตรูพืชของสารละลายมาตรฐานที่ระดับ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (a) จากเครื่อง GC - FPD ของสารกลุ่ม OPs 21 ชนิด (b) จากเครื่อง GC - ECD ของสารกลุ่ม SPs 8 ชนิด



ภาพที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน (calibration curves) ของสารกลุ่ม OPs (dichlorvos และ methidathion) และของสารกลุ่ม SPs (bifenthrin และ cypermethrin)

ตารางที่ 1 ความแม่นยำและความเที่ยง (average %recovery, RSD) ของการวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (OPs) และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (SPs) ในนมโค

Pesticides	10 µg/kg (n = 6)		30 µg/kg (n = 6)		100 µg/kg (n = 6)	
	Recovery (%)	RSD	Recovery (%)	RSD	Recovery (%)	RSD
dichlorvos	70.3	7.8	69.1	4.3	72.0	3.4
methamidophos	71.1	10.5	68.5	4.7	73.9	5.1
acephate	72.3	9.4	65.3	4.7	64.6	7.5
omethoate	78.3	13.3	87.3	8.0	67.0	7.9
diazinon	83.0	6.5	88.3	2.9	89.8	2.1
dicrotophos	72.9	12.1	87.4	4.2	83.5	3.7
dimethoate	74.6	15.0	88.5	6.5	72.7	6.5
monocrotophos	80.2	11.1	91.2	5.0	80.2	3.3
pirimiphos - methyl	78.4	4.3	90.7	2.1	88.8	2.7
chlorpyrifos	77.1	3.1	83.7	3.6	84.2	2.4
parathion - methyl	84.9	7.0	88.9	1.1	80.8	2.8
parathion	83.7	4.4	88.6	2.1	86.6	2.8
prothiophos	63.6	3.2	70.8	1.5	68.9	3.9
methidathion	78.8	3.1	83.0	2.3	74.2	2.9
profenofos	67.9	2.5	79.5	2.7	68.1	8.8
ethion	67.2	5.7	76.3	1.5	68.7	2.8
triazophos	71.1	8.9	78.5	2.3	66.2	3.5
EPN	73.0	6.6	70.1	6.7	63.1	3.1
phosalone	99.8	14.3	73.7	9.7	67.2	3.6
mevinphos	77.6	10.6	80.9	5.1	86.1	1.9
azinthos - methyl	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
bifenthrin	86.6	2.0	65.2	5.2	75.0	4.4
fenpropathrin	99.6	1.9	69.6	2.2	85.4	3.8
L - cyhalothrin	73.9	6.3	63.5	6.1	69.8	2.9
permethrin	82.0	13.1	66.6	11.7	76.0	2.0
cyfluthrin	85.6	4.0	67.5	13.1	65.4	3.2
cypermethrin	75.7	5.3	75.5	9.0	74.1	10.5
fenvalerate	65.9	10.3	65.5	4.3	66.3	3.6
deltamethrin	68.7	14.5	85.1	7.3	65.0	6.4

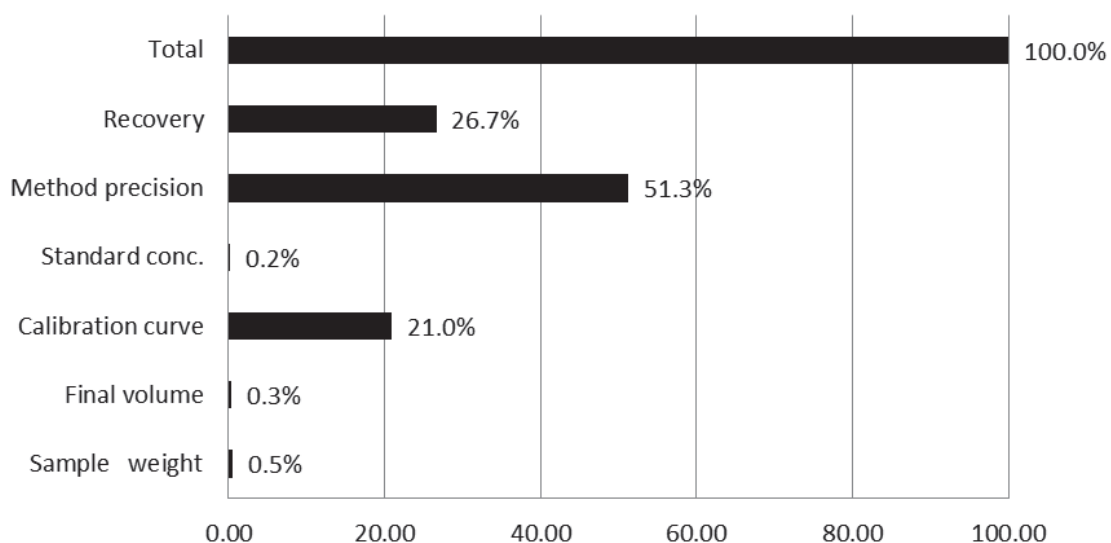
ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (RSD) ของการวิเคราะห์สารกลุ่ม OPs และกลุ่ม SPs ในนมผง นํ้านมถั่วเหลือง และไข่ไก่ ที่ความเข้มข้น 30 µg/kg ($n = 6$)

Pesticides	นมผง		นํ้านมถั่วเหลือง		ไข่ไก่	
	Recovery (%)	RSD	Recovery (%)	RSD	Recovery (%)	RSD
dichlorvos	59.4	5.0	87.5	10.4	77.8	30.4
methamidophos	57.7	8.4	73.6	5.8	58.1	17.6
acephate	81.5	8.3	75.0	17.1	ND*	ND
omethoate	ND	ND	ND	ND	ND	ND
diazinon	90.2	4.9	73.2	14.2	157.6	7.6
dicrotophos	108.9	13.9	85.0	28.7	108.2	21.6
dimethoate	113.0	5.0	78.7	24.0	ND	ND
monocrotophos	115.5	16.7	79.1	24.6	133.3	11.2
pirimiphos-methyl	76.9	15.0	70.1	10.8	158.1	10.3
chlorpyrifos	72.5	9.0	63.5	10.8	117.7	8.8
parathion-methyl	89.3	5.1	73.9	15.1	107.5	18.4
parathion	81.5	9.6	75.4	9.9	173.8	6.8
prothiophos	59.4	7.3	63.9	13.8	112.5	13.4
methidathion	106.1	6.6	90.1	15.9	140.8	9.1
profenofos	93.9	21.9	66.2	21.5	105.5	18.0
ethion	74.3	8.3	66.4	18.4	165.6	6.8
triazophos	95.9	19.4	73.0	28.4	125.0	3.2
EPN	ND	ND	72.4	5.2	ND	ND
phosalone	ND	ND	ND	ND	ND	ND
mevinphos	70.3	7.2	76.7	18.5	64.6	3.6
azinthos-methyl	ND	ND	ND	ND	ND	ND
bifenthrin	66.4	3.8	75.7	7.1	81.7	11.7
fenpropathrin	106.7	6.7	69.2	6.8	60.4	8.4
L-cyhalothrin	79.1	6.0	60.5	6.7	25.5	8.9
permethrin	73.9	12.8	112.8	3.8	34.3	2.5
cyfluthrin	89.8	4.9	67.6	14.9	ND	ND
cypermethrin	62.8	5.9	70.8	5.7	ND	ND
fenvalerate	68.7	10.3	63.2	7.5	ND	ND
deltamethrin	98.7	7.7	75.5	3.1	30.4	10.2

* ND หมายถึง not detected, เลขตัวหนาแสดงถึงค่าที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (recovery 60 - 120%, และ RSD $\leq$ 20%)

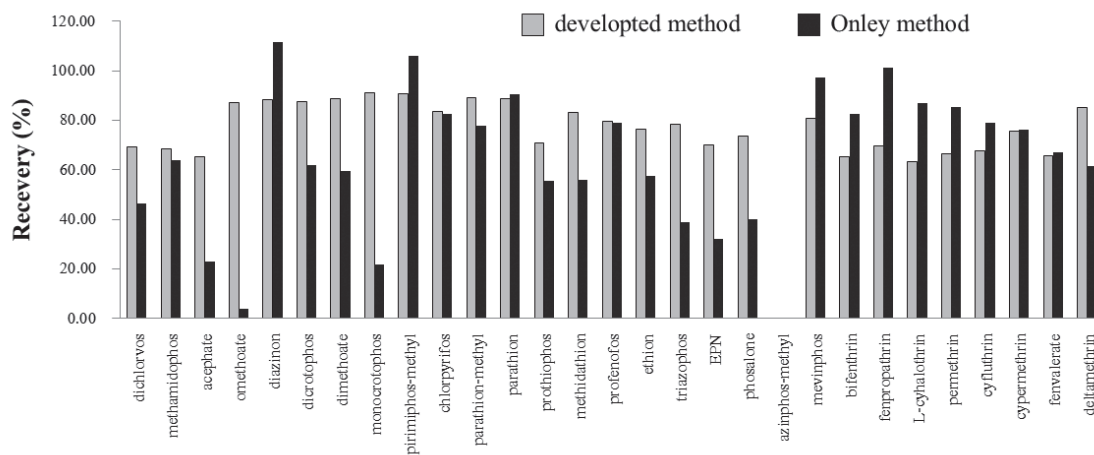
วิธีนี้สามารถวิเคราะห์สารได้ตรงตามวัตถุประสงค์โดยสามารถใช้ตรวจสอบทุกชนิดที่ทำการทดสอบในนมโคและน้ำมันถั่วเหลืองได้ ยกเว้นสาร azinphos - methyl เพียงชนิดเดียว แต่ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจสอบสาร dichlorvos methamidophos omethoate prothiophos EPN phosalone และ azinphos - methyl ในนมผง สำหรับไข่ไก่ควรใช้วิธีนี้ตรวจสอบเฉพาะสาร dichlorvos dicrotophos chlorpyrifos parathion - methyl prothiophos profenofos mevinphos bifenthrin และ fenpropathrin เท่านั้น และเมื่อพิจารณาข้อกำหนดทางกฎหมายของประเทศไทยที่กำหนดค่า Maximum Residue Limit (MRL) ของสารเกือบทุกชนิดที่ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีล้วนมีค่าสูงกว่าค่า LOQ ของวิธี เพียงแต่มีสาร methidathion (MRL = 5 µg/kg) เพียงชนิดเดียวที่มีค่า MRL ต่ำกว่า LOQ ของวิธี นั้นแสดงว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์แบบคัดกรอง (screening) สารกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่ทำการทดสอบได้ ทั้งนี้สามารถหาปริมาณสารพิษตกค้างที่มีได้ในอาหาร สำหรับวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ไม่ได้กำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (MRL) หรือ ดีฟอลต์ลิมิต (default limit)⁽¹⁾ ได้อีกด้วย

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach หรือ Bottom - up Approach ซึ่งเป็นแนวทางที่เข้มงวดและมีรูปแบบการคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ชัดเจน จึงเหมาะสมกับวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ เป็นแนวทางที่ช่วยให้ห้องปฏิบัติการพิจารณาและตรวจสอบแนวทางการพัฒนาจากปริมาณแต่ละแหล่งของค่าความไม่แน่นอน ผลจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนพบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุดคือ method precision (51.3%) รองลงมาคือ bias (26.7%) และ calibration curve (21.0%) ส่วนแหล่งที่มาอื่น ๆ นั้นถือเป็นองค์ประกอบที่น้อยมากแหล่งละไม่เกินร้อยละ 1 ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนที่มีผลต่อการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับความไม่แน่นอนทั้งหมดแสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละ

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารกลุ่ม OPs และ กลุ่ม SPs ในนมโคที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 6 ซ้ำ ($n = 6$) ประเมินจากความแม่นยำ (%recovery) ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเดิมที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่ (Onley method) แสดงในภาพที่ 5 บ่งชี้ว่าเมื่อสกัดตัวอย่างด้วยวิธีใหม่ สารทุกชนิด ยกเว้น azinphos - methyl มี recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (60 - 120%) มีความเที่ยงของการวิเคราะห์ ($RSD \leq 20\%$) และมีความสม่ำเสมอ (consistency) ของการวิเคราะห์สูง ในขณะที่วิธี Onley ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีในสารบางชนิดเท่านั้น เช่น สารกลุ่ม SPs แต่มีสารจำนวนหนึ่งในกลุ่ม OPs ที่มี recovery ต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับ แสดงถึงข้อจำกัดของการใช้วิธีเดิมที่มีการทำ liquid - liquid extraction จากการศึกษาเปรียบเทียบข้างต้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าวิธีที่พัฒนานี้มีขอบข่าย (scope) ของการวิเคราะห์กว้างกว่าวิธีที่ใช้อยู่เดิม



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารกลุ่ม OPs และ กลุ่ม SPs ในนมโคที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($n = 6$) ประเมินจากความแม่นยำ (%recovery) ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี Onley

วิจารณ์

ระหว่างขั้นตอนการสกัดจะสังเกตเห็นชั้นไขมันในลักษณะแผ่นฟิล์มบาง ๆ ระหว่างรอยต่อของ acetonitrile ที่ใช้ในการสกัดกับชั้นของเหลวตัวอย่าง เนื่องจากไขมันไม่สามารถละลายใน acetonitrile ได้ ด้วยสาเหตุนี้สารกำจัดศัตรูพืชที่ละลายได้ดีในไขมันจึงไม่สามารถถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารที่มีขั้วต่ำในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (OCs) จึงไม่เหมาะสมกับวิธีที่พัฒนาขึ้น ในทางตรงกันข้ามสารเคมีที่เป็นขั้วปานกลางถึงสูงจะถูกดึงออกจากตัวอย่างได้ดีกว่าและอัตราการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทั้งนี้เมื่อไขมันในตัวอย่างมีปริมาณสูงขึ้น สารที่มีขั้วปานกลางจะละลายอยู่ในชั้นไขมันมากขึ้น วิธีที่ใช้ acetonitrile ในการสกัดนี้จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันค่อนข้างต่ำเท่านั้น จากตารางที่ 2 สังเกตได้ว่าผลการวิเคราะห์ความแม่นยำและความเที่ยงของการสกัดตัวอย่างนมผงและไข่ไก่จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการสกัดนมโคและน้ำนมถั่วเหลือง และมีจำนวนสารที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับน้อยกว่าซึ่งปริมาณไขมันในนมโค น้ำนมถั่วเหลือง นมผง และไข่ไก่ คือร้อยละ 4.19, 2.5, 26.76 และ 8.76 ตามลำดับ⁽¹⁷⁾ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไขมันในตัวอย่างกับ recovery ของการวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากค่า partitioning coefficients ของ analyte แต่ละชนิดระหว่างชั้นไขมันที่มีลักษณะเป็นฟิล์มกับ

ชั้น acetonitrile ค่าสัมประสิทธิ์นี้สามารถคำนวณได้จากค่า octanol-water coefficient (K_{ow}) หาได้จากสมการที่ 1

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{water}} \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

ค่าคงที่ดังกล่าวยากต่อการวัดและการประเมินค่าและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องของสารชนิดหนึ่งๆ ให้ค่าที่แตกต่างกันมาก⁽¹⁸⁾ เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง recovery กับ K_{ow} ของสารกำจัดศัตรูพืชแล้วไม่สามารถอธิบายปรากฏการณ์นี้ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามสามารถใช้ความสามารถในการละลายน้ำหรือความมีขั้วของสารแต่ละชนิดมาใช้อธิบายและกำหนดขอบข่าย (scope) ของสารที่จะสามารถใช้วิธีนี้ได้⁽¹⁹⁾ จากสมการที่ 2

$$\log K_{ow} = a \log \left(\frac{1}{C_w^{sat}} \right) + b \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

ดังนั้นการวิเคราะห์สารกลุ่มที่มีขั้วต่ำและละลายได้ดีในไขมันควรใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเป็นตัวสกัด เช่น n - hexane เป็นต้น การวิเคราะห์แบบนี้มีข้อจำกัดคือ n - hexane จะละลายไขมันออกมา และจะทำให้เกิดปัญหาในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์หากไม่มีการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหรือกำจัดไขมันไม่เพียงพอ เมื่อไขมันเข้าสู่ analytical column จะเข้าไปทำลายระบบการวิเคราะห์ของเครื่องมือและประสิทธิภาพก็จะต่ำลง

ถึงแม้ว่าไขมันในอาหารจะสามารถละลายปะปนมาใน acetonitrile ได้ในปริมาณน้อยมากแต่ก็ต้องมีการกำจัดไขมันเหล่านี้ออกก่อนการนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC เนื่องจากเมื่อไขมันเหล่านี้เข้าไปสะสมจะรบกวน column และจะส่งผลถึงความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์ สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม OPs ใช้ FPD เป็นตัวตรวจวัดนั้น detector ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสารสนใจค่อนข้างสูง ดังนั้นพีครบกวน (interference peak) ที่ปรากฏอยู่ใน chromatogram จึงมีจำนวนน้อยหรือไม่มีเลย แต่ใน detector ชนิด ECD กลับพบว่าหากไม่มีการกำจัดไขมันออกก่อนการวิเคราะห์จะได้ chromatogram ที่ยากต่อการวิเคราะห์ผล (interpretation) และทำให้ sensitivity ค่อยๆ ลดต่ำลงเรื่อยๆ พร้อมๆ กับระยะเวลาการใช้งานของเครื่อง ในกรณีของการวิเคราะห์ผักและผลไม้ในขั้นตอนการ clean up ที่ใช้ $MgSO_4$ และ PSA ก็สามารถกำจัด interference peak ได้โดยไม่ทำให้ recovery ลดลง⁽²⁰⁾ ในตัวอย่างที่มีรงควัตถุ (pigment) ปริมาณมากๆ มีการเพิ่ม graphite carbon black (GCB) สามารถดูดซับที่มีสีเหล่านี้ออกได้ดีแต่กลับทำให้ recovery ของสารที่มีลักษณะเป็น planar - ring ลดลง ในขณะที่การใช้ octadecylsilane (C18) เพื่อดูดซับไขมันไม่มีรายงานว่าทำให้ recovery ลดต่ำลงแต่อย่างใด อาหารที่เลือกเป็นตัวแทนของอาหารที่มีไขมันต่ำไม่มี pigment เป็นองค์ประกอบหรือมีน้อยมาก จึงเลือกใช้ dispersive SPE ชนิดสำเร็จรูปเพื่ออาหารที่มีไขมัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสาร co - extractive ด้วย d - SPE ชนิดต่างๆ โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC - ECD แสดงให้เห็นว่า $MgSO_4$ + PSA + C18 ยังคงมีพีคของ matrix เหลืออยู่ปริมาณมากกว่า $MgSO_4$ + PSA + GCB และ $MgSO_4$ + PSA + GCB + C18 และแผนภาพแสดง Peak Area Sum บ่งชี้ว่าการเติม GCB ลงไปจะสามารถทำให้สารสกัดมี co - extractive น้อยกว่า ทั้งนี้ถ้าสังเกต interference peak ที่ยังคงพบอยู่จะอยู่ในช่วงต้นของโครมาโทแกรมซึ่งไม่ซ้อนทับหรือใกล้เคียงกับสารกลุ่ม SPs ที่ปรากฏอยู่ช่วงปลายของโครมาโทแกรม (ภาพที่ 2) เมื่อพิจารณาประเมินความเหมาะสมแล้ว แม้การเติม GCB จะให้โครมาโทแกรมที่สะอาดกว่าแต่การงานศึกษาหลายชิ้นชี้แล้วว่าอาจมีผลกระทบต่อ recovery ได้ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ d - SPE ที่มี GCB เป็นส่วนผสมในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ อนึ่ง วิธี Onley ใช้ตัวทำละลายในการทำโปรตีนและไขมันไขมันในตัวอย่างเสียสภาพกลายเป็นของแข็งและตกตะกอนแล้วนำสารละลายส่วนใสไปผ่านขั้นตอน liquid - liquid

extraction เพื่อกำจัดสารที่สามารถละลายในน้ำได้ออกไป ในขั้นตอนนี้เองที่ทำให้การสกัดสารที่มีขั้วสูงหรือมีความเป็นกรดเบสสูงด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วมีประสิทธิภาพต่ำ จึงไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวเป็น universal method ที่ใช้สกัดสารกำจัดศัตรูพืชแบบ multiresidue method ได้ แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีหลากหลายกว่าจึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมกว่าสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ

สรุป

วิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในอาหาร ได้แก่ นมโค นมผง นํ้านมถั่วเหลือง และไข่ไก่ ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ dispersive SPE ชนิดที่เป็นสารผสมของ $MgSO_4$, PSA และ C18 ในการทำให้บริสุทธิ์เป็นวิธีที่มีคุณลักษณะเหมาะสมกับการใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้วิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม OPs และกลุ่ม SPs สำหรับตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นไปตามค่ากำหนดทางกฎหมายที่ระบุในพระราชบัญญัติอาหาร ปี พ.ศ. 2522 เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และมีประสิทธิภาพสูง สามารถประยุกต์ใช้วิธีนี้กับตัวอย่างอาหารอื่นๆ และสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามนักวิเคราะห์ควรคำนึงถึงคุณสมบัติทางเคมีของสารกำจัดศัตรูพืชและอาหารที่จะนำไปใช้งานด้วยและต้องทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีก่อนนำไปประยุกต์ใช้เสมอ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางนิภาภรณ์ ลักษณะสมยา ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร สำหรับคำแนะนำ ข้อเสนอแนะทางวิชาการและการทบทวนต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560).
2. ยวดี เลิศเรืองเดช, อรรพรรณ พัฒนกิจจารักษ์. วิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มสารประกอบคลอรีนในนม โดยแก๊สโครมาโทกราฟี ชนิดไมโครฮีซีดี. ว กรมวิทย พ 2551; 50(3): 185-96.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 350 (พ.ศ. 2556) เรื่องนมโค. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 87 ง (วันที่ 24 กรกฎาคม 2556).
4. Holsteg DM, Scharberg DL, Tor ER, Hart LC, Galey FD. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues. J AOAC Int 1994; 77(5): 1263-74.
5. Bennett DA, Chung AC, Lee SM. Multiresidue method for analysis of pesticides in liquid whole milk. J AOAC Int 1997; 80(5): 1065-77.
6. Sheridan RS, Meola JR. Analysis of pesticide residues in fruits, vegetables, and milk by gas chromatography/tandem mass spectrometry. J AOAC Int 1999; 82(4): 982-90.
7. Lehotay SJ, Lightfield AR, Harman-Fetcho JA, Donoghue DJ. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem 2001; 49(10): 4589-96.
8. Schenck FJ, Wagner R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. Food Addit Contam 1995; 12(4): 535-41.

9. Di Muccio A, Pelosi P, Camoni I, Attard Barbini D, Dommarco R, Generali T, et al. Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. *J Chromatogr A* 1996; 754(1-2): 497-506.
10. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003; 86(2): 412-31.
11. Lehotay SJ, de Kok A, Hiemstra M, Van Bodegraven P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J AOAC Int* 2005; 88(2): 595-614.
12. Koesukwiwat U, Lehotay SJ, Mastovska K, Dorweiler KJ, Leepipatpiboon N. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts, and doughs. *J Agric. Food Chem* 2010; 58(10): 5950-8.
13. Onley JH. Rapid method for chlorinated pesticide residues in fluid milk. *J AOAC* 1964; 47(2): 317-21.
14. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC guide quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom: EURACHEM; 2000.
15. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. [Online]. 2002 [cited 2016 Nov 12]; [38 screens]. Available from: [URL: http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf](http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf).
16. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. [Online]. 2015 [cited 2017 Nov 13]; [46 screens]. Available from: https://www.accredia.it/app/uploads/2015/12/6215_plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf.
17. กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. กรดไขมันและคอเลสเตอรอลในอาหารไทย. [ออนไลน์]. 2556 [สืบค้น 12 พย. 2556]; [170 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : [URL: http://nutrition2.anamai.moph.go.th/images/design2016/กรดไขมันและคอเลสเตอรอลในอาหารไทย.pdf](http://nutrition2.anamai.moph.go.th/images/design2016/กรดไขมันและคอเลสเตอรอลในอาหารไทย.pdf).
18. Sangster J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *J Phys Chem Ref Data* 1989; 18(3): 1111-227.
19. U.S. Department of Agriculture/Agricultural Marketing Service. Acceptability Criteria of Process Control and Fortification Recoveries, PDP-QC-04. [Online]. 2002 [cited 2016 Nov 12]. Available from: [URL: www.ams.usda.gov/science/pdp/Qc04.pdf](http://www.ams.usda.gov/science/pdp/Qc04.pdf).
20. Lehotay SJ, Lee CH. Evaluation of a fibrous cellulose drying agent in supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of diverse pesticides. *J Chromatogr A* 1997; 785: 313-27.

Method Development of Simultaneous Determination of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticide Residues in Some Food by Gas Chromatographic Technique

Weerawut Wittayanan and Thoranit Chaimongkol

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT Separation of pesticides residues from food matrices prior to subsequent steps in the analytical process remains a challenging issue, and much effort has been invested to further improve methods. The present study was aimed to develop a simple multiresidue method modified from AOAC 2007.01 extraction method for the determination of 21 organophosphorus (OPs) and 8 synthetic pyrethroid (SPs) pesticide residues in some food matrices, including milk, milk powder, soy milk and egg. Gas chromatography coupled with flame photometric detector (GC - FPD) and electron capture detector GC - ECD) were simultaneously used for identification and quantification steps. The calibration curve and working range for the analytes of interest were linear over the concentration ranges of 20 - 300 ng/ml and 10 - 150 µg/kg, respectively, with excellent correlation coefficients (r) ranging from 0.995 to 0.999. For all of the tested pesticides in four matrices, the mean recoveries at three fortification levels (10, 30 and 100 µg/kg) ranged from 25.5 and 173.8% with RSD ranging from 1.1 to 30.4% but some pesticides could not be determined. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) of the method were 5 and 10 µg/kg, respectively. Comparing with Onley method, currently used in laboratories, the developed method is fast, inexpensive and suitable for the determination of the target pesticides. In addition, this method can be easily extended to other compounds and matrices. The protocol developed is also useful for routine analysis and rapid detection of a large number of samples.

Keywords: GC - FPD/GC - ECD, multiclass pesticides, AOAC 2007.01, fatty food