

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน 18 ชนิดในเนื้อเยื่อสัตว์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

รติยากร ศรีโคตร และ วิชาดา จงมีวาสนา

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน จำนวน 18 ชนิดในเนื้อเยื่อสัตว์ โดยใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทน เริ่มจากการสกัดไขมันออกจากเนื้อหมูด้วย n-hexane แล้วนำมาสกัดต่อด้วย acetonitrile ที่อิ่มตัวด้วย n-hexane เพื่อแยกสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในไขมันและทำให้บริสุทธิ์ โดย liquid-liquid partition และ alumina column จากนั้นตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนทั้ง 18 ชนิดได้ในคราวเดียวกัน โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดไมโครอีซีดี (GC- μ ECD) จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่า ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วย % recovery ในช่วง 82-117% และความเที่ยง (precision) แสดงด้วย HORRAT มีค่า 0.2-1.2 ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับ และเมื่อทดสอบ trueness ของวิธีโดยการวิเคราะห์หีสอดอ้างอิงรับรอง BCR-430 ซึ่งเป็นไขมันหมูที่มีค่าอ้างอิงรับรองของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าอ้างอิงกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น การจำแนกชนิดสารสามารถถูกยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพดี น่าเชื่อถือ ดังนั้น วิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารดังกล่าวในเนื้อเยื่อสัตว์ทั้งในด้านการควบคุมคุณภาพอาหารและการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและสารพิษตกค้างยาวนานบางชนิดได้

บทนำ

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ตัวอย่างเช่น ดีดีที (DDT) เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและใช้อย่างกว้างขวางในการกำจัดแมลงทั้งในด้านการเกษตรและสาธารณสุขมาอย่างยาวนาน ถึงแม้ในปัจจุบันทั่วโลกจะยกเลิกการใช้สารส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้ เนื่องจากประชาคมโลกต่างตระหนักถึงปัญหาการตกค้างสารดังกล่าวที่มีความคงตัวสูง สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลายาวนาน และสามารถสะสมอยู่ในห่วงโซ่อาหารได้ จึงเกิดเป็นข้อตกลงระหว่างประเทศที่เรียก

ว่า อนุสัญญาสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษตกค้างยาวนาน เพื่อตอบสนองความต้องการปฏิบัติการร่วมระดับโลกอย่างเร่งด่วน ในการปกป้องสุขภาพอนามัยของคนและสิ่งแวดล้อมจากสารพิษตกค้างยาวนาน (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: POPs) โดยประเทศไทยได้ลงนามและเป็นสมาชิกโดยสมบูรณ์แล้วตั้งแต่วันที่ 2548⁽¹⁾ ซึ่งจะต้องมีพันธกิจในการจัดการสารมลพิษตกค้างยาวนานตลอดทั้งวงจร ตั้งแต่ผลิตไปจนถึงเป็นของเสียรวมทั้งหาทางเลือกอื่นทดแทน

ดังนั้น การติดตามตรวจสอบการตกค้างหรือสะสมของสารดังกล่าวในเนื้อสัตว์ที่คนเรานิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารนั้นจะเป็นข้อมูลสำคัญอย่างหนึ่งที่จะใช้ในการประเมินผลกระทบต่อสุขภาพของคนเราได้ จากข้อมูลของสมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออกของประเทศไทย รายงานว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542-2550 คนไทยบริโภคหมูเฉลี่ย 12 กิโลกรัมต่อคนต่อปี⁽²⁾ และจากรายงานการศึกษาสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับการบริโภคอาหาร พ.ศ. 2542-2546 ซึ่งในปี พ.ศ. 2542 และ 2543 ตรวจพบการตกค้างของ ดีดีที และ ลินเดน ในเนื้อหมูน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ⁽³⁾ แต่หลังจากนั้นยังไม่มีข้อมูลการตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในเนื้อหมูและเนื้อสัตว์อื่นที่จำหน่ายในตลาด จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เป็น multiresidues method และทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation)⁽⁴⁾ เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบปริมาณการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนทั้งที่เป็นสารมลพิษตกค้างยาวนานและสารอื่นจำนวน 18 ชนิดในเนื้อสัตว์โดยใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทน (representative matrix) และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยใช้เครื่อง GC- μ ECD ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีความไวสูงในการตรวจวัดสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และตรวจยืนยันชนิดสารโดยใช้ GC-MS เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีคุณภาพดีน่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพเนื้อสัตว์ให้เป็นไปตามกฎหมาย รวมทั้งสามารถใช้ตรวจหาปริมาณเพื่อทราบสถานการณ์การตกค้างและประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : n- hexane PG grade, acetonitrile PG grade, aluminium oxide 90 active (AR), sodium chloride และ sodium sulfate anhydrous (AR) granular ขนาด 12-60 mesh (เผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง)

สารมาตรฐาน : CRM; BCR-430 organochlorine pesticides in pork fat, organochlorine standards 18 ชนิด ได้แก่ aldrin, α -HCH, α -HCH (lindane), α -chlordane, γ -chlordane, oxy-chlordane, p,p'-DDE, p,p'-TDE, p,p'-DDT, dieldrin, endrin, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan-sulfate, heptachlor, trans-hept-epoxide, methoxychlor และ tetradifon สารทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดป่นอาหาร, ultra turrax T 25, เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง และ 5 ตำแหน่งสำหรับชั่งสารมาตรฐาน, micropipette ชนิด positive displacement, rotary evaporator, ตู้แช่แข็ง -15 องศาเซลเซียส, เครื่องเขย่า, ชุดกรอง Büchner funnel, suction flask, certified volumetric flask, certified measuring pipette, separatory funnel, Erlenmeyer flask, round-bottomed flask, glass funnel, glass column (10 mm id $\times$ 500 mm), GC- μ ECD; Agilent Technology 6890 N โดยใช้ analytical column: DB-5, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d., 0.25 μ m และ DB-1701, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d., 0.50 μ m ตามลำดับ และ GC-MS; Agilent Technology 6890 N-5973 inert โดยใช้ analytical column: DB-35 ms, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m

ตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อหมูน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม บดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดป่นอาหาร ซึ่งแบ่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม เพื่อเป็น analytical portions ซึ่งตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -15 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

การสกัด (Extraction)

ตัวอย่างเนื้อหมู 10 กรัม เติม sodium sulfate anhydrous ประมาณ 10 กรัม คลุกให้เป็นผงแห้ง เติม n-hexane 150 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย homogenizer, ultra turrax T 25 ความเร็วสูง นาน 2 นาที นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรองและ Büchner funnel สกัดเนื้อตัวอย่างซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติม n-hexane ครั้งละ 100 มิลลิลิตรนำไปปั่นด้วย homogenizer, ultra turrax T 25 ความเร็วสูง นาน 2 นาที กรองสารสกัดทั้งหมดรวม filtrate เก็บใน suction flask เตรียม round-bottomed flask ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปชั่งน้ำหนักแล้วบันทึกน้ำหนัก ถ่ายสารสกัดทั้งหมดจาก suction flask ลงใน round-bottomed flask ผ่านกรวยกรองที่อุดด้วยสำลี และมี sodium sulfate หนาประมาณ 2 เซนติเมตร นำ round-bottomed flask ไประเหย n-hexane ออกให้หมดด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อหาน้ำหนักไขมันในตัวอย่าง นำไขมันดังกล่าวมาละลายด้วย n-hexane 13 มิลลิลิตร สกัดแบบ liquid-liquid partition ใน separatory funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร ด้วย acetonitrile ที่อิ่มตัวด้วย n-hexane ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนที่ละลายในชั้น acetonitrile มาทำ liquid-liquid partition ต่อใน separatory funnel

ขนาด 1 ลิตร ด้วยการเติม n-hexane 100 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเกลืออิ่มตัว 40 มิลลิลิตร เพื่อลดการเกิด emulsion หลังจากเขย่าอย่างแรง 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บชั้น n-hexane ใน Erlenmeyer flask นำชั้นน้ำไป partition ซ้ำอีกครั้ง โดยการเติม n-hexane 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บชั้น n-hexane รวมกันล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทิ้งชั้นน้ำ (ล้าง 2 ครั้ง) ไซ้ชั้น n-hexane รวมกัน แล้วเติม sodium sulfate anhydrous จนเห็นว่าเป็นผงร่วน ถ่ายสารสกัดลงใน round-bottomed flask ผ่านกรวยกรองที่อุดด้วยสำลี และมี sodium sulfate หนาประมาณ 2 เซนติเมตร นำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จนเหลือปริมาตรประมาณ 3 - 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอด graduated โดยใช้ Pasteur pipette และปรับปริมาตรด้วย n-hexane เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์

การทำให้บริสุทธิ์ (Clean-up)

alumina column บรรจุ deactivated aluminium oxide ซึ่งเตรียมโดยการเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่ารวมกับ aluminium oxide 10 กรัม แล้วเทใน glass column ที่อุดปลายด้วยสำลี แล้วเททับผิวหน้าด้วย sodium sulfate anhydrous สูงประมาณ 1 เซนติเมตร เริ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยเติม n-hexane 1 มิลลิลิตร ลงใน column ตามด้วยการเติมสารสกัด 5 มิลลิลิตร แล้วชะด้วย n-hexane 100 มิลลิลิตร เก็บใน round-bottomed flask ระเหยลดปริมาตรและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย n-hexane เป็น 5 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดตัวอย่าง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ ชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือต่อไป

การตรวจวัดชนิดและปริมาณสารด้วยเครื่อง GC- μ ECD

การตรวจชนิดและปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน 18 ชนิด ด้วยเครื่องมือที่กำหนดสภาวะ ดังนี้

Inlet : Spitless at 250 °C

Oven: Initial temp. 70 °C hold 1 min, ramp 30 °C/min to 210 °C, ramp 2 °C/min to 250 °C and post-run 2 min at 260 °C Analytical column: DB-5, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m และ RTX-CL pesticides, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.5 μ m with constant flow at 1.5 mL/min

Detector : μ ECD with nitrogen make up 60 mL/min

การตรวจยืนยันชนิดสารด้วยเครื่อง GC-MS

การตรวจยืนยันชนิดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน 18 ชนิด ด้วยเครื่องมือที่กำหนดสภาวะ ดังนี้

Inlet: Spitless at 250 °C

Oven: Initial temp. 70 °C hold 1 min, ramp 50 °C/min to 250 °C, hold 14 min and post-run 2 min at 260 °C

Analytical column: DB-35ms, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m plus gap 5 m

Column flow: constant pressure at 11.0 psi

Detector: MS (single quadrupole) with Selected Monitoring Ions (SIM)

Transfer line : 280 °C, MS quadrupole: 150 °C, MS source: 230 °C

การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ความเข้มข้น 0.002, 0.005, 0.01, 0.015, 0.025, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน n-hexane นำสารละลายมาตรฐานไปฉีดด้วยเครื่อง GC- μ ECD สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient: r)

วิเคราะห์ Method blank และ Matrix blank

Method blank : สกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา โดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่าง

Matrix blank : สกัดตัวอย่างตามวิธีที่พัฒนา (6 ซ้ำ) โดยใช้เนื้อหมูที่ไม่มีการตกค้างของสารสนใจ ตรวจวิเคราะห์ method blank และ matrix blank เพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากสารเคมีหรืออุปกรณ์ที่ใช้หรือจากเนื้อตัวอย่างที่อาจมีผลกระทบต่อวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการจำแนกชนิดหรือคำนวณปริมาณสาร

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำๆ ค่า LOD เท่ากับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้พีคที่มีความสูงเท่ากับ 3 เท่า signal-to-noise ratio แล้วคำนวณเป็นความเข้มข้นต่อน้ำหนักของตัวอย่าง

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานที่ประมาณ 2 เท่า ของค่า LOD ลงในตัวอย่าง (blank sample) วิเคราะห์ 6 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery, % RSD และ HORRAT

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับ 0.005, 0.01, 0.015, 0.025, 0.050 และ 0.100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานที่ตรวจพบ กับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่า r

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision)

การทดสอบการกลับคืน (Recovery)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample)⁽⁵⁾ ที่ระดับ LOQ, $3 \times \text{LOQ}$ และ $5 \times \text{LOQ}$ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.015, และ 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery, % RSD และ HORRAT โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์กำหนดดังนี้

ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยค่าเฉลี่ย % recovery ในช่วงร้อยละ 70-120 ความเที่ยง (precision) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio) มีค่าน้อยกว่า 1.5

โดย HORRAT (Horwitz ratio) คำนวณจาก

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted RSD}} \quad \text{.....สมการที่ 1}$$

Predicted RSD_r หรือ predicts a standard deviation (σ_p)

สำหรับสารที่มีความเข้มข้น < 120 นาโนกรัมต่อกรัม คำนวณจาก Horwitz's equation ดังนี้

$$\sigma_p = \frac{0.22c}{mr} \quad \text{.....สมการที่ 2}$$

c = concentration

mr = dimensionless mass ratio, $1 \text{ ppm} = 10^{-6}$

การทดสอบ Trueness

ทดสอบ Trueness และความเที่ยงของวิธีโดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) ทำการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิง BCR-430 จำนวน 3 ซ้ำ ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าอ้างอิง โดยผลต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าอ้างอิง (Δ_m) จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับค่าความไม่แน่นอนขยายของผลต่างระหว่างค่าดังกล่าว (U_Δ) โดยค่าต่าง ๆ สามารถคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้⁽⁶⁾

ความแตกต่างระหว่างของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าอ้างอิง

$$\Delta_m = |c_m - c_{\text{CRM}}| \quad \text{.....สมการที่ 3}$$

Δ_m = absolute difference between mean measured value and certified value

C_m = mean measured value

C_{CRM} = certified value

ค่าความไม่แน่นอนของค่าความแตกต่างระหว่างของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าอ้างอิง

$$u_{\Delta} = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2} \quad \text{.....สมการที่ 4}$$

u_{Δ} = combined uncertainty of mean measured value and certified value

u_m = uncertainty of mean measured value

u_{CRM} = uncertainty of certified value

คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (U_{Δ}) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ coverage factor, $k=2$

$$U_{\Delta} = 2 \cdot u_{\Delta} \quad \text{.....สมการที่ 5}$$

การประเมินผล

ถ้า $\Delta_m \leq U_{\Delta}$ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ถ้า $\Delta_m > U_{\Delta}$ แสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง⁽⁷⁾ เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งปริมาณสารที่พบคำนวณจากการวิเคราะห์โดย GC- μ ECD และคำนวณผลโดยเทคนิค One point-External Standard Calibration จากสมการดังนี้

$$C_x = \frac{C_z}{C_y} \cdot \frac{A_y}{A_z} \cdot \frac{100}{R} \quad \text{.....สมการที่ 6}$$

C_x = ปริมาณ organochlorine ที่พบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

C_y = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (กรัมต่อมิลลิลิตร)

C_z = ความเข้มข้นของของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

A_y = พื้นที่ใต้พีคของตัวอย่าง

A_z = พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน

R = % recovery ของการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงเพื่อการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

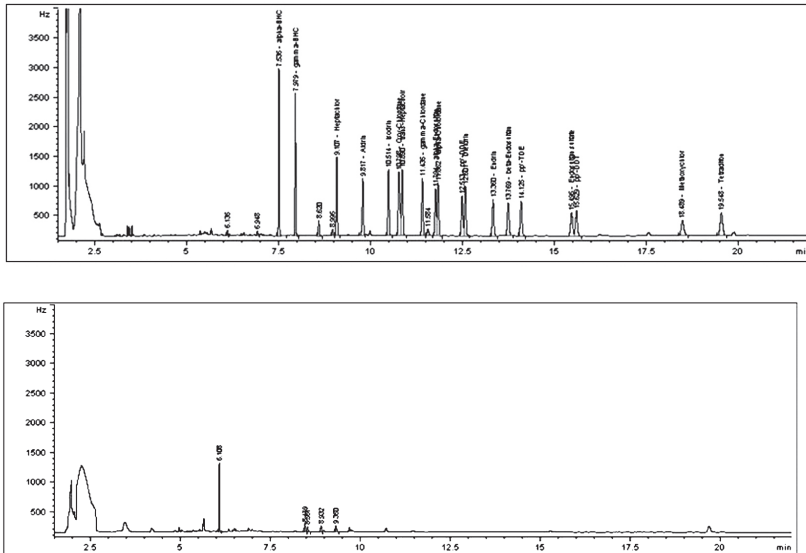
ผล

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน 18 ชนิด ได้แก่ aldrin, α -HCH, γ -HCH (lindane), α -chlordane, γ -chlordane, oxy-chlordane, p, p'-DDE, p, p'-TDE, p, p'-DDT, dieldrin, endrin, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan-sulfate, heptachlor, trans-hept-epoxide, methoxychlor และ tetradifon ด้วย GC- μ ECD ภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารดังกล่าวได้ในช่วง 0.005, 0.01, 0.015, 0.025, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า r ในช่วง 0.995 - 0.999 และเมื่อทำการวิเคราะห์ method blank และ reagent blank ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่อาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลวิเคราะห์

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการวิเคราะห์เนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐาน จำนวน 6 ซ้ำ มีค่าเฉลี่ยของสารทั้ง 18 ชนิด โดยมีค่าความแม่นยำจาก % recovery เฉลี่ยที่ระดับ LOQ ในช่วง 82 - 117% และความเที่ยงจาก HORRAT ในช่วง 0.2-1.2

(ภาพที่ 1) จาก Chromatogram การแยกสาร สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ในตัวอย่างเนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐาน 18 ชนิด เปรียบเทียบกับตัวอย่าง (blank sample) ที่วิเคราะห์

ด้วยเครื่องมือตามสภาวะที่กำหนดพบว่าสามารถ แยกพีคและวินิจฉัยสารทั้ง 18 ชนิดตาม retention time (RT) โดยใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 25 นาที ต่อตัวอย่าง



ภาพที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนด้วยเครื่องมือ GC- μ ECD และ capillary column: DB-5 (A) chromatogram ของเนื้อหมูเติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัม ต่อกรัม (B) chromatogram ของเนื้อหมู

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วง การวิเคราะห์ (Linearity and working range) พบว่าการวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม ออร์กาโนคลอรีน 18 ชนิดในเนื้อหมูมีความเป็น เส้นตรงในช่วง 0.005–0.10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีค่า r ในช่วง 0.958–0.995

เมื่อทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของ วิธีโดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง ที่ระดับ LOQ, $3 \times$ LOQ และ $5 \times$ LOQ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.015, และ 0.025 มิลลิกรัม ต่อกรัม ตามลำดับ พบว่าความแม่นยำที่ประเมิน จาก % recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ระดับอยู่ในช่วง 71–117 % และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย % RSD และ HORRAT ดังในสมการที่ 1 และ 2 จะอยู่ในช่วง

2.4–19.1 และ 0.1–1.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีจากการวิเคราะห์ วัสดุอ้างอิง BCR-430 พบว่าความแม่นยำที่ประเมิน จาก % recovery อยู่ในช่วง 88–110% (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่วิเคราะห์ ได้กับค่าอ้างอิง ตามสมการที่ 3–5 พบว่า ปริมาณ สาร α -HCH, γ -HCH, dieldrin, endrin, p, p'-DDT และ p, p'-DDE ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่ พัฒนาขึ้น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง นอกจากนั้น ได้เตรียมสภาวะเครื่องมือเพื่อตรวจยืนยันชนิด สารโดยใช้ GC-MS, Selected Ion Monitoring (SIM) ตรวจวิเคราะห์ quantified and confirm ions ของสารแต่ละชนิด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์เนื้อหมูเมื่อเติมสารมาตรฐาน 18 ชนิด ที่ระดับ 0.005 mg/kg (LOQ), 0.015 mg/kg (3 LOQ) และ 0.025 mg/kg (5 LOQ)

Compounds	RT (min)	Spiked level (mg/kg)	% Recovery (n=6)	% RSD	HORRAT
			mean $\pm$ SD		
Aldrin	9.81	0.005	84.0 $\pm$ 5.8	6.6	0.6
		0.015	86.0 $\pm$ 10.4	12.1	0.4
		0.025	99.8 $\pm$ 5.9	6.0	0.1
α -HCH	7.54	0.005	107.3 $\pm$ 3.7	3.5	0.3
		0.015	97.0 $\pm$ 11.8	12.1	0.4
		0.025	82.5 $\pm$ 13.2	16.0	0.3
γ -HCH (Lindane)	7.98	0.005	116.0 $\pm$ 4.9	4.2	0.4
		0.015	92.8 $\pm$ 11.8	12.7	0.4
		0.025	81.6 $\pm$ 15.6	19.1	0.4
α -chlordane	11.86	0.005	86.0 $\pm$ 4.2	6.6	0.6
		0.015	90.2 $\pm$ 12.6	13.9	0.4
		0.025	83.2 $\pm$ 5.4	6.5	0.1
γ -chlordane	11.44	0.005	85.7 $\pm$ 5.1	4.9	0.4
		0.015	95.5 $\pm$ 12.0	12.6	0.4
		0.025	84.7 $\pm$ 4.8	5.7	0.1
oxy- chlordane	10.80	0.005	97.3 $\pm$ 7.7	7.9	0.7
		0.015	99.6 $\pm$ 16.1	16.1	0.5
		0.025	95.5 $\pm$ 5.6	5.8	0.1
p, p'-DDE	12.51	0.005	81.7 $\pm$ 3.7	4.5	0.4
		0.015	80.2 $\pm$ 8.4	10.5	0.3
		0.025	100.8 $\pm$ 6.8	6.8	0.1
p, p'-TDE	14.12	0.005	96.0 $\pm$ 5.7	5.9	0.5
		0.015	92.5 $\pm$ 12.4	13.4	0.4
		0.025	79.8 $\pm$ 13.8	17.2	0.3
p, p'-DDT	15.63	0.005	95.7 $\pm$ 2.3	2.4	0.2
		0.015	91.2 $\pm$ 10.1	11.1	0.3
		0.025	79.8 $\pm$ 7.8	9.7	0.2
Dieldrin	12.60	0.005	97.3 $\pm$ 3.3	3.3	0.3
		0.015	92.5 $\pm$ 13.0	14.0	0.4
		0.025	91.3 $\pm$ 6.7	7.4	0.1
Endrin	13.36	0.005	111.3 $\pm$ 6.3	5.6	0.5
		0.015	92.8 $\pm$ 13.0	14.0	0.4
		0.025	104.8 $\pm$ 11.7	11.1	0.2
α -Endosulfan	11.79	0.005	95.7 $\pm$ 5.4	5.7	0.5
		0.015	93.0 $\pm$ 10.5	11.3	0.3
		0.025	100.5 $\pm$ 5.8	5.8	0.1
β -Endosulfan	13.77	0.005	98.7 $\pm$ 5.9	6.0	0.5
		0.015	99.5 $\pm$ 8.6	8.7	0.3
		0.025	71.2 $\pm$ 12.0	16.9	0.3
Endosulfan-sulfate	15.50	0.005	102.0 $\pm$ 13.0	12.8	1.2
		0.015	84.3 $\pm$ 13.4	15.8	0.5
		0.025	80.0 $\pm$ 13.5	16.9	0.3
Heptachlor	9.11	0.005	91.3 $\pm$ 4.3	4.7	0.4
		0.015	96.0 $\pm$ 14.2	14.8	0.4
		0.025	108.8 $\pm$ 3.9	3.5	0.1
trans-Hept-epoxide	10.89	0.005	99.7 $\pm$ 4.5	4.5	0.4
		0.015	100.8 $\pm$ 13.3	13.2	0.4
		0.025	88.2 $\pm$ 7.9	9.0	0.2
Methoxychlor	18.49	0.005	117.3 $\pm$ 8.2	6.9	0.6
		0.015	105.2 $\pm$ 13.3	12.6	0.4
		0.025	71.0 $\pm$ 12.1	17.1	0.3
Tetradifon	19.55	0.005	107.3 $\pm$ 5.7	5.3	0.5
		0.015	108.8 $\pm$ 14.3	13.1	0.4
		0.025	73.3 $\pm$ 12.3	16.8	0.3

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานอ้างอิง BCR-430 เปรียบเทียบระหว่างค่าอ้างอิงกับค่าที่ตรวจวัดจากวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิคการคำนวณผลแบบ One Point-External Standard Calibration

Compounds	Certified value $\pm U^*$ ($\mu\text{g/g}$)	Measured value $\pm U^*$ ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
α -HCH	0.140 ± 0.012	0.139 ± 0.020	99.3
γ -HCH	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.08	100.0
Dieldrin	0.124 ± 0.011	0.121 ± 0.015	97.6
Endrin	0.020 ± 0.004	0.022 ± 0.005	110.0
p, p'-DDT	3.40 ± 0.18	3.27 ± 0.74	96.2
p, p'-DDE	0.82 ± 0.06	0.72 ± 0.09	87.8

* The reported uncertainty is expanded uncertainty (U) with a level of confidence of 95%.

ตารางที่ 3 Selected ion groups of organochlorine pesticides in GC-MS confirmation analysis

Ion Groups	Compounds	Time (min)	Quantified ion (m/z) Target	Confirmed ion (m/z)	
				Q1	Q2
Group 1	α , β -HCH	5.00	181	219	183
	Heptachlor		272	274	100
	Aldrin		263	265	66
Group 2	Oxy-chlordane	6.50	115	187	387
	trans-Hept epoxide		353	355	351
Group 3	α , β -Chlordane	7.15	303	230	338
	α -Endosulfan		241	339	195
	p, p'-DDE		246	318	248
Group 4	Dieldrin	7.85	263	79	277
	Endrin		263	317	265
	p, p'-TDE		235	237	165
Group 5	β -Endosulfan	9.50	241	339	195
	p, p'-DDT		235	237	165
	Endosulfan sulfate		272	274	229
Group 6	Methoxychlor	11.50	227	228	308
	Tetradifon		159	227	356

GC- MS; Agilent Technology 6890 N-5973 inert & DB-35 ms, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d. $\times$ 0.25 μm

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาเพื่อให้เห็นถึงสายโซ่ของการสอบกลับได้ของการวัดนั้น ได้พิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสาร ดังแสดงในสมการที่ 6 ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความเข้มข้นของตัวอย่าง (C_y) และสารมาตรฐาน (C_z) ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ (Repeatability) ซึ่งจะครอบคลุมความไม่แน่นอนของพื้นที่ใต้พีคเมื่อตรวจวัดปริมาณด้วย GC ของทั้งตัวอย่าง (A_y) และสารมาตรฐาน (A_z) อยู่แล้ว นอกจากนี้ยังพิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่เกิดจากประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่ทำให้เกิด bias ของผลของการวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงนำค่าความไม่แน่นอนของ % recovery (R) จากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรวมด้วย จากตัวอย่างการรายงานและการ

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร p, p'-DDE ในเนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับประมาณ 0.015 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ พบว่าตรวจพบการตกค้างสาร p, p'-DDE 0.012 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4) และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ จะเห็นได้ว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารมากที่สุดจากมากไปหาน้อยได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision, 51%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 44%), ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (C_z , 3%) และความเข้มข้นของตัวอย่าง (C_y , 2%) (ภาพที่ 2)

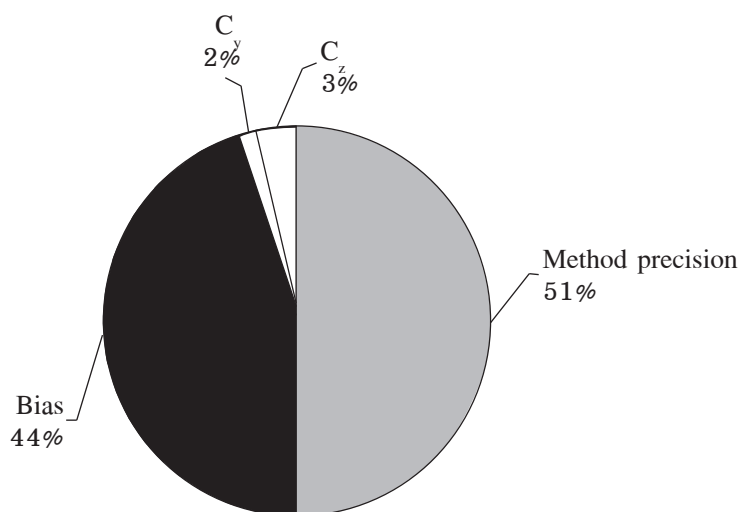
ตารางที่ 4 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ เนื้อหมูที่เติม p, p'-DDE

Component	Value, x	Standard uncertainty, u (x)	Relative standard uncertainty, u(x)/x
1. Concentration of sample (C_y)			
• Sample weight	10 g	0.00014 g	0.000014
– calibration (balance)	10 g	0.00015 g	0.000015
– precision (balance)			
• Taken volume			
– calibration (vol. flask)	5 mL	0.02041 mL	0.004082
– temperature (vol. flask)	5 mL	0.00242 mL	0.000485
• Final volume			
– calibration (vol. flask)	5 mL	0.02041 mL	0.004082
– temperature (vol. flask)	5 mL	0.00242 mL	0.000485
2. Concentration of standard (C_z)			
• Purity	98.5 %	0.25 %	0.00290
• <u>Stock standard</u>			
– calibration (balance)	0.0370 g	0.00014 g	0.003732
– precision (balance)	0.0370 g	0.00015 g	0.004049
– calibration (vol. flask)	50 mL	0.02449 mL	0.000490
– temperature (vol. flask)	50 mL	0.02425 mL	0.000485
• <u>Intermediate standard</u>			
– calibration (vol. flask)	0.10 mL	0.00041 mL	0.004082
– temperature (vol. flask)	0.10 mL	0.0005 mL	0.000485

ตารางที่ 4 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์เนื้อหุ้ที่เดิม p, p'-DDE (ต่อ)

Component	Value, x	Standard uncertainty, u (x)	Relative standard uncertainty, u(x)/x
- calibration (vol. pipette)	50 mL	0.02449 mL	0.000490
- temperature (vol. pipette)	50 mL	0.02425 mL	0.000485
• <u>Working standard</u>			
- calibration (vol. flask)	0.25 mL	0.00082 mL	0.003266
- temperature (vol. flask)	0.25 mL	0.00012 mL	0.000485
- calibration (vol. pipette)	25 mL	0.01633 mL	0.000653
- temperature (vol. pipette)	25 mL	0.01212 mL	0.000485
3. Method precision (Repeatability of A_y & A_z)	0.012 mg/kg	0.00040 mg/kg	0.000346
4. Bias (% recovery, R)	88.8 %	2.8 %	0.031179
Combined standard uncertainty			0.046814
Standard uncertainty (U), 0.046814×0.012 mg/kg			0.0016 mg/kg
Expanded uncertainty (U), $k = 2.78^*$, 2.78×0.0006 mg/kg			0.0006 mg/kg
Reported value of p, p'-DDE = 0.012 ± 0.002 mg/kg			

* Coverage factor, k based on V_{eff} at a level of confidence of 95%.



ภาพที่ 2 แหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ p, p'-DDE ในเนื้อหุ้ ปริมาณตรวจพบ 0.012 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (C_y : ความเข้มข้นของตัวอย่าง และ C_z : ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน)

วิจารณ์

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในเนื้อเยื่อสัตว์โดยใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนเนื้อสัตว์ที่คนนิยมบริโภคและเป็นวิธีวิเคราะห์แบบ multiresidues method สามารถทำการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนจำนวน 18 ชนิด ได้ในครั้งเดียวกัน โดยดัดแปลงวิธีสกัดจาก Pesticide Analytical Manual Section 304-E2⁽⁸⁾ ที่สกัดไขมันออกจากเนื้อเยื่อสัตว์ด้วยการใช้โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) แต่เนื่องจากปิโตรเลียม อีเทอร์มีความเป็นพิษอาจก่อให้เกิดมะเร็งในคนได้⁽⁹⁾ จึงปรับมาใช้ n-hexane เป็นตัวทำละลายแทนแต่อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนการสกัดและใช้ตัวทำละลายเหล่านี้ควรทำในตู้ดูดควัน (fume cupboard) เพื่อความปลอดภัยของผู้วิเคราะห์ในการรับสัมผัสสารดังกล่าว นอกจากนั้นในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จะใช้ aluminium oxide⁽¹⁰⁾ แทนการใช้ florisil ทั้งนี้เนื่องจากมีราคาถูกกว่าและสามารถดูดซับสารรบกวนต่าง ๆ ได้ดีเมื่อชะด้วยตัวทำละลาย n-hexane เพียงชนิดเดียว ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลา ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนครอบคลุมสาร 18 ชนิดได้ดี โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีช่วงความเข้มข้นตรงของการวิเคราะห์ 0.005 – 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อใช้วิธีนี้วิเคราะห์ตัวอย่างรับรอง BCR-430 ในการวิเคราะห์ α -HCH, γ -HCH, dieldrin, endrin, p, p'-DDT และ p, p'-DDE ที่ระดับการตกค้างในช่วง 0.020 – 3.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วพบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้

ไม่มีความแตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงถือได้ว่าวิธีดังกล่าวสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและสอบกลับได้ถึง SI unit ผ่านค่าอ้างอิง นอกจากนั้น ถ้าพิจารณาจัดสาร 18 ชนิดรวมเป็นกลุ่มสารตามชนิดและสารเมตาบอไลต์หรือสารไอโซเมอร์ของสารแต่ละชนิดนั้น สามารถจัดแบ่งได้เป็น 10 กลุ่ม ดังนี้ อัลดริน (aldrin), ดีลดริน (dieldrin), เฮกซ์เฮกซ์ (α -HCH, γ -HCH), เฮปทาคลอร์ (heptachlor & heptachlor epoxide), คลอร์เดน (α -chlordane, γ -chlordane & oxy-chlordane), ดีดีที (p, p'-DDE, p, p'-TDE & p, p'-DDT), เอนดริน (endrin), เอนโดซัลแฟน (α -endosulfan, β -endosulfan & endosulfan sulfate), เมโทกซีคลอร์ (metoxychlor) และเตตราโดฟอน (tetradifon) จะพบว่ามีการแบ่งกลุ่มจัดเป็นสารพิษตกค้างยาวนาน (POPs) และมีค่ากำหนดปริมาณการตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Extraneous Maximum Residue Limits, EMRLs) ในเนื้อและเครื่องในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตามพระราชบัญญัติอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 288 (พ.ศ. 2548) จำนวน 6 กลุ่ม ได้แก่ อัลดริน ดีลดริน คลอร์เดน ดีดีที เอนดริน และเฮปทาคลอร์ มีค่าไม่เกิน 0.2, 0.05, 5, 0.05 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งกำหนดปริมาณการตกค้างในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมของส่วนที่เป็นไขมัน (on fat basis)⁽¹¹⁾ ดังนั้นในการคำนวณปริมาณการตกค้างจะต้องทราบปริมาณไขมันที่มีในตัวอย่าง เช่น ถ้าตรวจพบว่าเนื้อหมูมีการตกค้าง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (on as is basis) และเนื้อหมูที่นำมาทดสอบมีปริมาณไขมัน 1 กรัมต่อเนื้อ 10 กรัม จะพบว่าการตกค้างของสาร 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของส่วนที่เป็นไขมัน (on fat basis) ซึ่งถ้าพิจารณาเปรียบเทียบกับค่า EMRLs ตามชนิดสาร ค่าดังกล่าวจะมีค่า

เท่ากับ EMRLs ของคลอร์เดนและเอนดริน แต่จะน้อยกว่าค่า EMRLs ของผลรวมอัลดรินและดีลดริน และของเฮปตาคลอร์ถึง 4 เท่า และน้อยกว่า EMRLs ของดีดีที ถึง 100 เท่า ดังนั้น วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจวัดเพื่อควบคุมคุณภาพเนื้อหุตามค่ากำหนดดังกล่าวได้ โดยต้องควบคุมให้ปริมาณไขมันที่ฉีดเข้าระบบการตรวจวิเคราะห์ด้วย GC มีค่าไม่น้อยกว่า 0.1 กรัม (ไขมัน) ต่อมิลลิลิตร และในกรณีที่ตรวจพบการตกค้างและคำนวณผลเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย GC- μ ECD แล้วนั้นต้องทำการตรวจยืนยันชนิดสารอีกครั้งโดยการวิเคราะห์ด้วย GC-MS เนื่องจากในการวิเคราะห์ด้วย GC- μ ECD อาศัยการเปรียบเทียบ retention time ของเวลาตรงกันระหว่างพีคของสารในตัวอย่างกับพีคของสารมาตรฐานในการวินิจฉัยชนิดสารเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจทำให้มีโอกาสรายงานผลผิดพลาดได้ แต่ถ้าทำการตรวจยืนยันโดยอาศัยสัดส่วนที่จำเพาะของ fragment ions ที่เกิดจากการแตกตัวของสารแต่ละชนิดเมื่อชนกับอิเล็กตรอน (electron impact) แล้วตรวจวัด quantified และ confirmed ions ตามแต่ละชนิดของสารด้วยแมสสเปกโตรมิเตอร์⁽¹²⁾ ทำให้ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวมีคุณภาพน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ถ้ามีวัตถุประสงค์ที่จะใช้วิธีนี้ในการตรวจวัดปริมาณสารให้ถูกต้องแม่นยำสูงขึ้น ผู้วิเคราะห์จะต้องพิจารณาและหาวิธีการลดค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งที่ส่งผลต่อการตรวจวัดปริมาณสารมากที่สุดซึ่งได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision) ที่มาจากค่าความเบี่ยงเบนของการทำซ้ำ (repeatability) และรองลงมาได้แก่ ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias) ที่เป็นผลมาจากประสิทธิภาพวิธี (% recovery) ที่เกิดการสูญเสียสารไปในขั้นตอนต่างๆ เช่นการสกัด การทำให้บริสุทธิ์ จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบบ External Standard Calibration ซึ่งสามารถปรับปรุง

วิธีวิเคราะห์ได้ เช่น การเพิ่มจำนวนซ้ำของการวิเคราะห์ เพื่อลดค่าความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ หรือเปลี่ยนไปใช้เทคนิคการวิเคราะห์แบบ Internal Standard Calibration โดยเลือกใช้สาร internal standard ที่เหมาะสมได้แก่ isodrin⁽¹³⁾ หรือ decachlorobiphenyl⁽¹⁴⁾ เพื่อลดค่าความไม่แน่นอนจาก bias ของวิธีทำให้สามารถรายงานผลได้อย่างแม่นยำและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

สรุป

วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนตกค้างในเนื้อหุได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดีเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารดังกล่าวในเนื้อสัตว์ที่นำมาบริโภคเป็นอาหารทั้งในด้านการควบคุมคุณภาพอาหารเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคและการตรวจหาปริมาณเพื่อการศึกษาผลกระทบต่อสุขภาพของคนไทยได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. http://dtm.go.th/vtl_upload_le//1179740340312/POPs.pdf (2 มีนาคม 2553)
2. <http://hypnos.cpportal.net/สถิติ/สถิติสุกรของโลก/การบริโภคเนื้อสุกรต่อคนต่อปี/tabid/299/articleType/ArticleView/articleId/.aspx> (5 มีนาคม 2553)
3. กนกพร อธิสุข ยุวดี เลิศเรืองเดช จิตผกา สันตัตรบ วิชาดา จงมีวาสนา ทองสุข ปายะนันท์ เฉลิพร ควรหา และรัตติยากร ศรีโคตร. สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับจากการบริโภคอาหาร พ.ศ. 2542-2546. ว กรม วิทย พ 2551; 50(3): 151-162.
4. Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to

- method validation and related topics. United Kingdom 1998. 61: 5-24.
5. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
 6. Application note 1: European Reference Materials, July 20
 7. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed. United Kingdom; 2000.
 8. McMahon BM, Wagner RF, editors. Pesticide Analytical Manual Volume I. 3rd ed. U.S. Food and Drug Administration. 1999; Section Section 304.
 9. http://msds.chem.ox.ac.uk/PE/petroleum_ether.html (10 มีนาคม 2553)
 10. Sission DJ, Telling GM, Usher CD. A rapid and sensitive procedure for the routine determination of organochlorine residues in vegetables. J. Chromatog. 1968, 33: 435-49
 11. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 288 (พ.ศ. 2548) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 122 ตอนพิเศษ 021 ง (ลงวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2548).
 12. Hong J, Kim H, Kim D, Seo J and Kim K. Rapid determination of Chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2004, 1038: 27-35
 13. Alawi MA. and Al-Hawadi JS. Organochlorine pesticides in sheep liver, kidney and adipose tissues in Jordan. Jordan Journal of Chemistry 2008, 3(2): 179-187
 14. Jager LS. and Andrews ARJ. Development of a rapid screening technique for organochlorine pesticides using solvent microextraction (SME) and fast gas chromatography (GC). Analyst 2000, 125: 1943-1948

Method Development of 18 Organochlorine Pesticides in Animal Tissue by Gas Chromatographic Technique

Rattiyakorn Srikote and Wischada Jongmevasna

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

ABSTRACT The determination of 18 organochlorine pesticides in animal tissue was developed and validated by using pork as a representative matrix. Initially, fat was extracted from pork with n-hexane and then pesticides were isolated from fat by acetonitrile saturated with n-hexane extraction. After that, organochlorine pesticides in sample were purified by liquid-liquid partition and alumina column. Finally, types and amounts of 18 compounds were identified and quantified by using gas chromatograph (GC) with μ ECD, simultaneously. As a result of method validation, limit of detection (LOD) was defined as 0.002 mg/kg and limit of quantitation (LOQ) was 0.005 mg/kg. The accuracy and the precision expressed as a percentage of recovery and HORRAT at LOQ level were found to be in acceptable ranges of 82–117% and 0.2–1.2, respectively. Moreover, the trueness of the method was evaluated by using the analytical result of certified reference material (BCR-430), pork fat with certified reference value of organochlorine pesticide residues. It was found that there was a non-statistically significant difference between reference and measured value obtained from the developed method. In order to improve the quality of analytical result, confirmation of residue identity could be certainly performed by gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). Consequently, the method performance for the determination of 18 organochlorine pesticide residues in animal tissue was found to be satisfactory to achieve the regulation of food quality and risk assessment of organochlorine pesticides or some persistent organic pollutants exposure.

Key words : Organochlorine pesticides, animal tissue, method validation, gas chromatograph (GC), mass spectrometer (MS)