

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และโพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD

ทิพย์สุตา วรรณอินทร์ ธาวิตา ม่วงไตรรัตน์

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine ; OCPs), และโพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls ; PCBs) ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD สามารถวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารตกค้างกลุ่ม OCPs ได้ 16 ชนิด และ PCBs 7 ชนิด โดยการสกัดตัวอย่างไขมันด้วยเครื่อง Universal Trace Residue Extractor (UNITREX) ไขมันจะถูกกักอยู่ใน fractionation tube และถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 230 - 235°C นาน แก๊สไนโตรเจนจะผ่านเข้าไปนำพาเอาสารกลุ่ม OCPs และ PCBs แยกออกมาจากไขมัน โดยสารที่วิเคราะห์จะถูกเก็บอยู่ใน glass traps ที่บรรจุ sodium sulfate และ florisil ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที หลังจากนั้นทำการชะสารโดยใส่สารละลาย diethyl ether: n-hexane (1:9) ปริมาตร 12 mL แล้วนำไปประเหยเพื่อลดปริมาตรให้เหลือ 0.5 mL ด้วยเครื่อง N - EVAP แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 mL หลังจากนั้น นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-ECD โดยการทดสอบนี้ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานได้คือ 1.0 - 1,000 µg/kg มีช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบเท่ากับ 8.0 - 1,000 µg/kg มีค่าความแม่นยำของการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 8.0 µg/kg อยู่ในเกณฑ์ 60 -120% และที่ความเข้มข้น 20.0 - 2,000 µg/kg อยู่ในเกณฑ์ 70 -120% มีค่าความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ %RSD ≤ 20% โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจพบได้ (LOD) เท่ากับ 3.0 µg/kg และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถหาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 8.0 µg/kg

คำสำคัญ: ออร์กาโนคลอรีน, โพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล, ไขมันสัตว์, GC-ECD

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000; โทรศัพท์ 0-2967-9727

Method Validation of the Determination of Organochlorine in Animal Fat by GC- ECD

Tipsuda Wanna-in Thawida Muangtrairat

Abstract

Validation of the test method for organochlorine compounds (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in animal fats using the GC-ECD technique can analyze 16 types of OCPs and 7 types of PCBs. The extraction of fat samples was performed using a Universal Trace Residue Extractor (UNITREX), The fat is trapped in a fractionation tube and heated at 230 - 235°C for 30 minute and nitrogen gas is passed through to carry OCPs and PCBs compounds from the fat. The analyzed substances were collected in glass traps containing sodium sulfate and florisil, with an extraction time of 30 minutes. After that, the substances were eluted using a solution of diethyl ether: n-hexane (1:9) in a volume of 12 mL, which was then evaporated to reduce the volume to 0.5 mL using an N-EVAP machine, and the final volume was adjusted to 1 mL. Subsequently, the samples were analyzed using the GC-ECD technique. The test showed linearity of the standard from 1.0 to 1,000 µg/kg and can analyze substances in the concentration range from 8.0 to 1,000 µg/kg. %RSD of precision ≤ 20%. The accuracy at a concentration of 8.0 µg/kg is within the range of 60 - 120% and at a concentration of 20.0 – 2,000 µg/kg, it is within the range of 70 - 120%. The limit of Detection (LOD) was 3.0 µg/kg and the Limit of Quantification (LOQ) was 8.0 µg/kg.

Keywords: Organochlorine, Polychlorinated Biphenyls, Animal Fat, GC-ECD

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
Department of Livestock Development, Tivanont Road, Bangkadi Subdistrict, Muang District,
Pathum Thani Province, 12000; Tel. 0 2967 9727

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และโพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD

ทิพย์สุตา วรรณอินทร์ ธาวิตา ม่วงไตรรัตน์

บทนำ

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine ; OCPs) เป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ที่มีคาร์บอน(C) คลอรีน (Cl) ไฮโดรเจน (H) และ ออกซิเจน (O) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้ เป็นสารเคมีกำจัดแมลงที่ค่อนข้างเสถียร ไม่สลายตัวในดิน สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้นาน มีความเป็นพิษสูง มีผลต่อระบบประสาทของมนุษย์และสัตว์ โดยจะละลายได้ดีและสะสมในเนื้อเยื่อไขมัน นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มดังกล่าวตกค้างในพืช ผัก ผลไม้จากการที่เกษตรกรมีการใช้สารกลุ่มนี้เพื่อกำจัดแมลงและศัตรูพืช ปัจจุบันสารในกลุ่มนี้หลายชนิดจัดเป็น วัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 คือ ห้ามมิให้มีการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง

สารโพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls ; PCBs) หรือสารพีซีบีเป็นสารประกอบอินทรีย์ไฮโดรคาร์บอนที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (chlorinated hydrocarbon) ซึ่งประกอบด้วยคลอรีนตั้งแต่ 1 ถึง 10 อะตอมอยู่ในวงของ biphenyl ส่วนผสมของสารพีซีบีที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด มีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อย และยิ่งละลายได้น้อยลงเมื่อมี ปริมาณคลอรีนเพิ่มขึ้น สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ น้ำมัน และไขมัน ซึ่งหากมีคลอรีนมากก็จะมีลักษณะหนืดมากขึ้น สลายตัวได้ยาก และสามารถสะสมอยู่ได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม สารพีซีบีเข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจ ทางผิวหนัง และการกิน เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะสะสมอยู่ในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อไขมัน สารพีซีบีไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน แต่อาการจะเกิดขึ้นเมื่อรับสารพีซีบีเข้าไปสะสมไว้นานและมีปริมาณที่มากเกินไป มักแสดงอาการน้ำหนักลด ตับโต ก่อให้เกิดมะเร็งในตับและไต หรือระบบประสาทบกพร่อง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine ; OCPs), และ โพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls ; PCBs) ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD เป็นวิธีที่ใช้เพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบให้ได้มาตรฐาน และมีความถูกต้องเพื่อเป็นวิธีทดสอบของหน่วยงาน และขยายขอบข่ายการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ต่อไป

1.วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine ; OCPs), และ โพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls ; PCBs) ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD ได้

2.ขอบข่าย

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม OCPs 16 ชนิด และ PCBs 7 ชนิด ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD ได้แก่

- กลุ่ม OCPs จำนวน 16 ชนิด ได้แก่ Hexachlorobenzene (HCB), Hexachlorocyclohexane (alpha, beta & gamma isomer), Heptachlor, Heptachlor epoxide (trans isomer), Aldrin, Dieldrin, Endrin, p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Chlordane (cis & trans isomer) และ Oxychlordane

- กลุ่ม PCBs จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138 , PCB 153, PCB 180 และ PCB 118

โดยตรวจสอบพารามิเตอร์ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation, LOQ) ความเที่ยง (precision) ความแม่นยำ (trueness) ความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ (working range) เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบดังกล่าวถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ

3.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ในการทดสอบสารกลุ่ม OCPs, และ PCBs ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD ได้

4.อุปกรณ์และวิธีการ

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 4.1.1 Centrifuge tube แก้ว ขนาด 15 mL
- 4.1.2 Adjustable pipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L
- 4.1.3 Volumetric flask
- 4.1.4 Pasture pipette
- 4.1.6 กระบอกตวง ขนาดต่างๆ
- 4.1.7 Erlenmeyer flask ขนาดต่าง ๆ ชนิดมีจุกแก้วปิด
- 4.1.8 Vial ขนาด 2 mL สำหรับใช้กับ Automatic injector ของเครื่อง GC-ECD
- 4.1.9 เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ชนิด ECD detector ที่มี Ni^{63} เป็นแหล่งกัมมันตภาพรังสี
- 4.1.10 Universal Trace Residue Extractor (UNITREX) ยี่ห้อ SGE ซึ่งมีอุปกรณ์ประกอบ ได้แก่
 - Fractionation tubes
 - Insulation wedges
 - Glass traps
 - Reservoirs
 - Bubble flow meter
 - 1.2 mL syringe
- 4.1.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 4.1.10 เครื่องลดปริมาตรสารละลายโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (N-Evap)
- 4.1.11 ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
- 4.1.12 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 หรือ 0.001 กรัม
- 4.1.13 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.0001 หรือ 0.00001 กรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน

6.2 สารเคมีและสารมาตรฐาน

- 6.2.1 Acetone (AR grade)
- 6.2.2 Diethyl ether (AR grade)
- 6.2.3 Florisil ขนาด 60-100 mesh (for residue analysis หรือ column chromatography หรือเทียบเท่า)
- 6.2.4 Sodium sulfate ขนาด 12 – 60 mesh (anhydrous granular, AR grade)

- 6.2.5 Glass wool ชนิด silane treated
- 6.2.6 n-Hexane (AR grade)
- 6.2.7 n-Hexane (for residue analysis)
- 6.2.8 Iso-octane (for residue analysis)
- 6.2.9 Helium gas (ultra high purity) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.999\%$
- 6.2.10 Nitrogen gas (oxygen free nitrogen, OFN) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.995\%$
- 6.2.11 Nitrogen gas (ultra high purity, UHP) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.999\%$

6.3 สารมาตรฐาน

6.3.1 สารละลายมาตรฐานกลุ่ม OCPs เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง ยี่ห้อ AccuStandard ได้แก่ Hexachlorobenzene (HCB), Hexachlorocyclohexane (alpha, beta & gamma isomer), Heptachlor, Heptachlor epoxide (trans isomer), Aldrin, Dieldrin, Endrin, p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Chlordane (cis & trans isomer) และ Oxychlordane ละลายในตัวทำละลายผสม Hexane:Toluene (50:50) โดยมีความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดประมาณ 200 $\mu\text{g/ml}$

6.3.2 สารละลายมาตรฐานกลุ่ม PCBs เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer ได้แก่ PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 180 และ PCB 118 ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดประมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ ละลายใน Iso-octane

7. วิธีดำเนินการ

7.1 การสกัดสารตัวอย่าง

7.1.1 ตั้งอุณหภูมิ UNITREX โดยให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 230 - 235°C และรอให้อุณหภูมิคงที่

7.1.2 เปิดและปรับแก๊สไนโตรเจนชนิด OFN (ความบริสุทธิ์ $\geq 99.995\%$) โดยให้ความดันของแก๊สที่ส่งออกจากถังอยู่ประมาณ 50 psi.

7.1.3 ใส่ fractionation tube ที่ได้ตรวจสอบความแน่นของหัวและสภาพของ septum แล้วลงในช่องของเครื่อง UNITREX และต่อสาย silicone ที่ตัวเครื่องเข้ากับหัว fractionation tube

7.1.4 ต่อ Glass traps ที่มี sodium sulfate ประมาณ 1/4 และ florisil ประมาณ 3/4 ของความจุของ trap เข้ากับ fractionation tube และวัดอัตราการไหลของแก๊สที่ปลาย Glass traps ด้วย bubble flow meter โดยปรับอัตราการไหลให้ได้ 230 mL/min (ปล่อยให้ฟองอากาศวิ่งใน bubble flow meter 23 mL โดยใช้เวลา 6 วินาที) ทำเช่นเดียวกันทุกช่อง แล้วใส่แผ่นกันความร้อน (insulation wedge) เพื่อช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อน

7.1.5 ฉีดไขมันที่หาลอมแล้วปริมาตร 1.12 mL (1.00 ± 0.02 กรัม) ลงใน fractionation tube ผ่านทาง septum แล้วทำการล้างไขมันที่หลงเหลือใน syringe ด้วย n-hexane

7.1.6 เมื่อครบ 30 นาที ให้ดึง Glass traps ออกจาก fractionation tube แล้วไปต่อกับ Reservoir และทำการชะสารด้วยโดยใส่สารละลาย diethyl ether: n-hexane (1:9) 12 mL ลงใน Reservoir แล้วนำไปวางบนแท่นพลาสติกที่มี Centrifuge tube ขนาด 15 mL รองรับอยู่ด้านล่าง ปล่อยให้สารละลายหยดลงใน Centrifuge tube จนหมดแล้วนำไปประเหยเพื่อลดปริมาตรให้เหลือ 0.5 mL ด้วยเครื่อง N - EVAP ที่อุณหภูมิของ water bath ไม่เกิน 40°C แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 mL ด้วย Iso-octane

7.2 การทดสอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (Qualitative and Quantitative Analysis) ด้วยเครื่อง GC-ECD

7.2.1 นำตัวอย่างจากข้อ 7.2.6 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น Trace 1610

7.2.2 ปรับตั้งสถานะของเครื่อง ดังนี้

ชนิดของ column	: Stx -CLPesticides หรือเทียบเท่า
ขนาดของ GC column	: เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 mm, Film Thickness 0.5 μ m, ความยาว 30 m
ชนิดของ Carrier gas	: Helium ชนิด Ultra High Purity
Flow rate ของ Carrier gas	: 3.5 mL/min
ชนิดของ injection port	: Splitless
อุณหภูมิของ injection port	: 230 $^{\circ}$ C
ปริมาตรที่ฉีด	: 2 μ L
อุณหภูมิของ Column oven	: 120 $^{\circ}$ C (0.50 min), 15.0 $^{\circ}$ C/min to 230 $^{\circ}$ C (18 min)

7.3 การหาค่า Instrument detection limit (IDL)

ฉีด standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0 μ g/L จำนวน 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC-ECD ตรวจสอบค่าสัญญาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลของเครื่อง GC-ECD กำหนดเกณฑ์ยอมรับของ $S/N \geq 3$

7.4 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

ฉีด standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1,000 μ g/L ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง GC-ECD และสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีค แล้วพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า $R^2 \geq 0.990$

7.5 การทดสอบเพื่อหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

ทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างไขมันให้มีความเข้มข้น 8 μ g/kg จำนวน 6 ซ้ำด้วยเทคนิค GC-MS/MS โดยเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า Standard deviation (S_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S'_0$ และค่า LOQ จาก $10S'_0$

$$LOD = 3S'_0 \quad LOQ = 10S'_0$$

$$\text{เมื่อ } S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad \text{และ } S_0 = SD$$

n = The number of replicate observation averaged when reporting results where each replicate is obtain following the entire measurement procedure

7.6 การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

ทำการทดสอบ spiked sample ตามค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณได้อย่างน้อยความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบค่า LOD โดยพิจารณาจากค่าสัญญาณของสารที่ตรวจเทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) เกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ $S/N \geq 3$ ในส่วนของค่า LOQ นั้น ต้องมีค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, MR) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSDr) ตาม CODEX (2017)

7.7 ความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (Trueness) ของการวิเคราะห์

7.7.1 ความเที่ยง (Precision) ทำการทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ อย่างน้อยความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ โดยเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน พิจารณาความเที่ยงจาก %RSD เกณฑ์ที่ยอมรับคือ $\%RSD \leq 20\%$

7.7.2. ความแม่นยำ (Trueness) ทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OCPs , OPPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ อย่างน้อยความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ โดยเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน พิจารณาความแม่นยำจาก %Recovery ระดับความเข้มข้น 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เกณฑ์ที่ยอมรับคือ 60-120% และระดับความเข้มข้น 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เกณฑ์ที่ยอมรับคือ 70-120%

7.8 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ (working range)

ความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ (working range) ทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีค แล้วพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า $R^2 \geq 0.9900$

8. ผลการทดสอบ

8.1 ค่า Instrument detection limit (IDL)

จากการฉีด standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ จำนวน 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC-ECD พบว่า ค่า S/N ของทุกสารมีค่ามากกว่า 3 โดยค่า S/N ของสารที่ต่ำสุดคือ p,p'-DDD มีค่าเท่ากับ 96.13 แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะกำหนดให้เครื่องสามารถตรวจวัดได้คือ 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ และที่ความเข้มข้นนี้ สามารถกำหนดให้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน (Lowest Calibration Level, LCL) ได้ เนื่องจากค่า S/N มีค่ามากกว่า 3 ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า Instrument detection limit (IDL) ของเครื่อง GC-MS/MS ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/L

Compound	signal to noise ratio			
	1	2	3	mean
HCB	436.80	473.50	444.70	451.67
A-BHC	206.10	230.10	211.20	215.80
Lindane	218.30	241.30	219.20	226.27
B-BHC	138.90	152.90	140.70	144.17
Heptachlor	237.30	269.30	242.00	249.53
Aldrin	194.60	225.50	196.80	205.63
Oxychlordane	167.80	198.50	171.60	179.30
Hep. Epoxide	156.20	176.90	159.10	164.07
G-Chlordane	160.40	192.20	169.20	173.93
A-Chlordane	149.70	179.50	151.70	160.30
p,p'-DDE	136.00	161.00	135.80	144.27
Dieldrin	107.90	124.80	107.20	113.30
o,p'-DDT	79.10	95.10	79.20	84.47
Endrin	95.60	112.50	94.90	101.00
p,p'-DDD	56.70	67.60	55.90	60.07
p,p'-DDT	66.50	78.40	65.40	70.10
PCB28	132.50	149.90	135.40	139.27
PCB52	82.20	93.00	85.00	86.73
PCB101	103.70	121.20	104.20	109.70
PCB118	118.00	139.40	116.60	124.67
PCB153	104.70	127.10	105.00	112.27
PCB138	101.80	121.90	100.10	107.93
PCB180	98.50	118.10	93.10	103.23

8.2 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

ผลการทดสอบ standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ระดับความ 1, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/L ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง GC-ECD เมื่อพิจารณาว่า R² พบว่าสารที่ทดสอบทุกสารมีค่า R² อยู่ในเกณฑ์การยอมรับทุกสาร ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า Coefficient of determination, R² ของสารมาตรฐานที่ทดสอบ

Compound	R2
HCB	0.9940
A-BHC	0.9942
Lindane	0.9946
B-BHC	0.9988
Heptachlor	0.9941
Aldrin	0.9972
Oxychlordane	0.9980
Hep. Epoxide	0.9969
G-Chlordane	0.9981
A-Chlordane	0.9988
p,p'-DDE	0.9991
Dieldrin	0.9987
o,p'-DDT	0.9996
Endrin	0.9992
p,p'-DDD	0.9999
p,p'-DDT	0.9998
PCB28	0.9946
PCB52	0.9962
PCB101	0.9963
PCB118	0.9975
PCB153	0.9965
PCB138	0.9966
PCB180	0.9987

8.3 การทดสอบเพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบ spiked sample ที่ความเข้มข้น 8 µg/kg จำนวน 6 ซ้ำ สามารถคำนวณค่า LOD และ LOQ ได้ตั้งแต่ 0.792 – 2.449 และ 2.639– 8.165 µg/kg ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 จึงทำการทดสอบยืนยันค่า LOD และ LOQ ที่ความเข้มข้น 3 และ 8 µg/kg ตามลำดับต่อไป

ตารางที่ 3 ผลทดสอบ Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

Compound	Conc.(µg/kg)						Mean	SD	LOD	LOQ
	1	2	3	4	5	6				
HCB	8.1000	7.7000	7.8000	7.4000	7.4000	7.7000	7.6833	0.2639	0.792	2.639
A-BHC	7.8000	7.6000	7.5000	6.9000	7.1000	6.9000	7.3000	0.3847	1.154	3.847
Lindane	7.3000	7.3000	7.3000	6.1000	7.1000	6.3000	6.9000	0.5514	1.654	5.514
B-BHC	7.4000	7.7000	7.5000	6.4000	7.2000	6.0000	7.0333	0.6772	2.032	6.772
Heptachlor	6.2000	5.5000	5.3000	6.7000	5.5000	6.0000	5.8667	0.5317	1.595	5.317
Aldrin	9.6000	9.7000	8.4000	8.0000	8.3000	7.8000	8.6333	0.8165	2.449	8.165
Oxychlordane	7.4000	6.9000	6.9000	6.3000	6.9000	6.6000	6.8333	0.3670	1.101	3.670
Hep. Epoxide	8.9000	8.3000	8.0000	7.5000	8.0000	7.8000	8.0833	0.4792	1.438	4.792
G-Chlordane	7.8000	7.3000	7.2000	6.7000	7.2000	7.2000	7.2333	0.3502	1.051	3.502
A-Chlordane	9.0000	8.6000	7.9000	7.7000	7.9000	7.6000	8.1167	0.5565	1.669	5.565
p,p'-DDE	8.7000	7.6000	7.8000	7.2000	8.2000	7.5000	7.8333	0.5391	1.617	5.391
Dieldrin	8.8000	8.2000	8.2000	7.6000	8.6000	8.1000	8.2500	0.4183	1.255	4.183
o,p'-DDT	8.6000	7.6000	7.9000	7.0000	8.5000	7.5000	7.8500	0.6156	1.847	6.156
Endrin	8.3000	7.9000	7.6000	6.9000	7.9000	7.3000	7.6500	0.4970	1.491	4.970
p,p'-DDD	8.0000	7.3000	7.2000	6.2000	7.5000	6.9000	7.1833	0.6047	1.814	6.047
p,p'-DDT	7.4000	6.6000	6.8000	5.6000	7.2000	6.3000	6.6500	0.6504	1.951	6.504
PCB28	8.3000	7.9000	7.7000	7.3000	7.6000	7.7000	7.7500	0.3332	0.999	3.332
PCB52	7.0000	6.8000	5.0000	6.0000	6.1000	5.9000	6.1333	0.7146	2.144	7.146
PCB101	8.4000	7.8000	7.6000	7.2000	8.1000	7.4000	7.7500	0.4461	1.338	4.461
PCB118	9.0000	8.0000	8.1000	7.2000	8.6000	7.7000	8.1000	0.6387	1.916	6.387
PCB153	8.8000	7.7000	7.8000	6.8000	8.4000	7.4000	7.8167	0.7111	2.133	7.111
PCB138	8.7000	7.6000	7.8000	6.6000	8.3000	7.4000	7.733333	0.7312	2.194	7.312
PCB180	7.0000	6.3000	6.2000	5.1000	6.8000	5.7000	6.183333	0.7026	2.108	7.026

8.4 การยืนยันค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบ spiked fat sample ที่ความเข้มข้น 3 และ 8 µg/kg จำนวน 6 ซ้ำ เพื่อยืนยันค่า LOD และค่า LOQ พบว่า S/N ของค่า LOD มีค่า > 3 ส่วน LOQ นั้น มีค่า % mean recovery อยู่ในช่วง 60-120 % และ %RSDr มีค่า ≤ 20% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทุกสาร ดังตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5

ดังนั้นจึงสามารถกำหนดค่า LOD ของการทดสอบไว้ที่ 3 µg/kg และค่า LOQ ของการทดสอบไว้ที่ 8 µg/kg ได้

ตารางที่ 4 ผลทดสอบการยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ที่ความเข้มข้น 3 µg/kg

Compound	signal to noise ratio						mean
	1	2	3	4	5	6	
HCB	401.30	517.20	445.10	454.20	471.20	396.00	447.50
A-BHC	243.40	331.20	266.50	285.40	261.60	249.50	272.93
Lindane	343.10	472.20	422.20	415.70	407.60	356.50	402.88
B-BHC	117.30	158.30	145.40	144.40	138.50	122.80	137.78
Heptachlor	147.90	190.60	178.90	158.90	147.50	132.20	159.33
Aldrin	293.50	399.90	362.80	345.30	339.20	296.30	339.50
Oxychlorane	162.80	218.30	192.60	188.80	186.10	168.90	186.25
Hep. Epoxide	197.70	243.30	233.40	226.90	221.90	203.80	221.17
G-Chlordane	157.10	208.20	184.20	172.40	157.80	141.80	170.25
A-Chlordane	176.10	227.80	202.30	196.50	187.40	173.10	193.87
p,p'-DDE	195.70	256.30	221.30	217.80	210.00	190.00	215.18
Dieldrin	163.60	176.10	199.20	193.20	185.40	142.50	176.67
o,p'-DDT	101.90	137.80	126.70	117.30	117.50	101.10	117.05
Endrin	103.00	112.60	127.70	118.50	112.30	97.40	111.92
p,p'-DDD	96.40	117.90	102.80	96.40	87.90	81.40	97.13
p,p'-DDT	86.00	110.40	97.10	94.70	93.50	81.50	93.87
PCB28	111.30	145.40	131.40	128.80	124.70	107.80	124.90
PCB52	112.50	156.30	141.70	148.70	112.90	150.60	137.12
PCB101	82.90	118.40	102.80	99.10	95.30	90.00	98.08
PCB118	87.60	116.10	101.20	99.70	97.90	91.20	98.95
PCB153	110.40	134.70	124.30	115.60	112.70	103.00	116.78
PCB138	98.50	122.30	113.60	104.20	103.70	95.10	106.23
PCB180	97.50	118.50	101.90	96.10	95.50	82.60	98.68

ตารางที่ 5 ผลทดสอบการยืนยันค่า Limit of Quantification (LOQ) ที่ความเข้มข้น 8 µg/kg

Compound	LOQ 8 µg/kg		
	%Recovery (เฉลี่ย)	%RSDr	S/N (เฉลี่ย)
HCB	96.90	3.49	2082.67
A-BHC	86.10	3.34	1732.87
Lindane	92.70	3.36	2154.75
B-BHC	85.05	2.49	749.40
Heptachlor	86.80	2.93	1216.08
Aldrin	92.08	3.82	1633.87
Oxychlordane	94.45	6.03	881.13
Hep. Epoxide	90.15	3.55	1080.85
G-Chlordane	88.00	3.04	1046.25
A-Chlordane	91.15	4.12	1072.27
p,p'-DDE	85.28	3.52	1059.68
Dieldrin	91.20	2.10	808.78
o,p'-DDT	93.28	2.09	553.48
Endrin	93.43	2.73	481.42
p,p'-DDD	102.70	2.12	504.18
p,p'-DDT	90.70	2.32	498.95
PCB28	91.28	0.88	331.70
PCB52	103.60	6.68	178.30
PCB101	88.53	2.62	293.20
PCB118	92.00	1.71	347.70
PCB153	91.88	1.54	350.88
PCB138	84.93	3.48	321.70
PCB180	81.75	1.72	475.62

8.5 ความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (Trueness) ของการวิเคราะห์

8.5.1 การทดสอบความเที่ยง (Precision) โดยทดสอบตัวอย่าง Spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 µg/kg ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ พบว่า %RSD มีค่า $\leq 20\%$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทุกสาร ดังตารางที่ 6 ตารางที่ 6 %RSD (เฉลี่ย) ของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 µg/kg

Compound	%RSD (เฉลี่ย)							
	8 µg/kg	20 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	2000 µg/kg
HCB	3.49	6.65	4.25	4.88	6.33	3.81	1.50	3.16
A-BHC	3.34	7.78	5.58	3.14	11.37	3.50	3.87	3.68
Lindane	3.36	6.88	6.06	5.33	15.79	2.81	3.25	2.37
B-BHC	2.49	7.25	6.39	4.95	10.74	4.81	3.21	3.65
Heptachlor	2.93	4.25	6.64	4.46	16.85	8.74	4.88	7.72
Aldrin	3.82	7.84	4.56	5.93	10.07	5.78	2.36	2.01
Oxychlorane	6.03	8.25	3.75	6.53	8.56	4.81	4.08	5.10
Hep. Epoxide	3.55	6.10	5.58	6.51	11.21	4.70	3.61	2.87
G-Chlordane	3.04	7.20	6.33	8.44	11.18	5.49	3.08	3.10
A-Chlordane	4.12	5.21	6.33	7.64	10.63	6.32	2.37	3.97
p,p'-DDE	3.52	5.84	6.68	7.87	10.27	7.32	5.39	2.98
Dieldrin	2.10	5.93	7.81	5.33	13.19	6.59	3.42	4.53
o,p'-DDT	2.09	5.82	7.39	9.93	7.45	10.66	2.85	4.51
Endrin	2.73	6.44	7.49	8.64	9.31	6.10	5.08	4.33
p,p'-DDD	2.12	5.31	8.74	8.94	10.24	7.07	2.69	4.22
p,p'-DDT	2.32	5.32	6.14	5.56	10.38	8.20	4.70	5.01
PCB28	0.88	6.35	4.47	5.24	6.89	6.74	4.17	5.08
PCB52	6.68	9.80	5.18	7.23	3.90	8.83	7.02	7.49
PCB101	2.62	4.62	5.33	9.84	9.60	7.99	8.27	5.53
PCB118	1.71	4.53	6.60	7.49	11.35	7.43	6.39	4.68
PCB153	1.54	4.69	6.90	7.76	10.99	8.18	5.31	3.95
PCB138	3.48	4.33	7.85	12.15	11.09	7.15	7.95	6.43
PCB180	1.72	3.26	6.75	5.05	11.97	6.02	4.30	4.54

8.5.2 การทดสอบความแม่นยำ (Trueness) โดยทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 µg/kg ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ พบว่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับทุกสาร โดยระดับความเข้มข้น 8 µg/kg %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 60-120% และ ระดับความเข้มข้น 20,50,100,200,500,1000,2000 µg/kg %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 70-120% ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 %Recovery (เฉลี่ย) ของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 µg/kg

Compound	%Recovery (เฉลี่ย)							
	8 µg/kg	20 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg	2000 µg/kg
HCB	96.90	106.67	95.30	99.22	93.93	92.86	109.64	90.98
A-BHC	86.10	115.00	96.53	95.48	96.63	95.50	104.57	89.77
Lindane	92.70	112.58	94.97	98.37	94.95	95.07	109.08	99.20
B-BHC	85.05	106.00	90.80	98.93	101.44	91.06	102.13	95.64
Heptachlor	86.80	78.58	91.40	84.55	98.01	80.59	94.97	91.14
Aldrin	92.08	119.83	101.70	100.70	97.93	91.06	101.71	98.61
Oxychlordane	94.45	95.08	87.67	94.18	94.68	93.50	104.61	94.63
Hep. Epoxide	90.15	111.42	95.47	101.25	95.33	96.37	113.15	102.42
G-Chlordane	88.00	104.92	94.97	90.30	102.26	94.62	109.96	97.73
A-Chlordane	91.15	113.42	100.37	95.82	100.43	94.87	113.23	103.18
p,p'-DDE	85.28	110.50	97.73	93.70	101.13	96.23	112.15	103.64
Dieldrin	91.20	111.75	96.97	88.32	100.48	100.41	113.15	101.48
o,p'-DDT	93.28	104.08	89.47	88.85	95.54	88.41	105.45	94.84
Endrin	93.43	113.50	96.17	89.97	100.18	91.28	106.50	99.54
p,p'-DDD	102.70	111.75	95.43	88.13	99.70	81.29	107.92	98.41
p,p'-DDT	90.70	96.17	87.67	84.17	95.79	83.34	101.77	94.43
PCB28	91.28	108.67	98.73	102.37	99.75	98.31	106.36	95.46
PCB52	103.60	82.00	87.33	91.32	92.50	91.32	101.93	89.31
PCB101	88.53	116.08	92.43	97.55	105.19	81.83	105.21	95.47
PCB118	92.00	104.50	95.67	96.05	98.56	86.35	100.74	89.98
PCB153	91.88	105.08	97.23	95.35	99.77	82.79	107.67	98.33
PCB138	84.925	103.42	96.00	96.08	100.44	90.51	107.93	97.58
PCB180	81.75	86.17	87.07	85.40	100.325	81.64	98.83	82.98

*สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 8 µg/kg %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 60-120%

*สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 20,50,100,200,500,1000,2000 µg/kg %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 70-120%

8.6 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ (working range)

ทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R²) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกสาร ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R²) ของสารกลุ่ม OCPs และ PCBs ระดับความเข้มข้น 8, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg/kg

Compound	R ²
HCB	0.9930
A-BHC	0.9903
Lindane	0.9919
B-BHC	0.9912
Heptachlor	0.9916
Aldrin	0.9922
Oxychlordane	0.9921
Hep. Epoxide	0.9905
G-Chlordane	0.9904
A-Chlordane	0.9908
p,p'-DDE	0.9912
Dieldrin	0.9917
o,p'-DDT	0.9902
Endrin	0.9914
p,p'-DDD	0.9909
p,p'-DDT	0.9924
PCB28	0.9949
PCB52	0.9930
PCB101	0.9908
PCB118	0.9915
PCB153	0.9902
PCB138	0.9915
PCB180	0.9902

9. สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine ; OCPs), และ โพลีคลอรีเนตเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls ; PCBs) ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานได้คือ 1.0 – 1,000 µg/kg มีช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบเท่ากับ 8.0 – 1,000 µg/kg มีค่าความแม่นยำของการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 8.0 µg/kg อยู่ในเกณฑ์ 60 -120% และที่ความเข้มข้น 20.0 – 2,000 µg/kg อยู่ในเกณฑ์ 70 -120% มีค่าความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ %RSD ≤ 20% โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจพบได้ (LOD) เท่ากับ 3.0 µg/kg และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถหาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 8.0 µg/kg

10. ข้อเสนอแนะ

วิธีทดสอบที่ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ เป็นเพียงการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ ควรมีการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) หรือมีการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) เพื่อให้วิธีทดสอบนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้อง

11. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้รวมทั้งผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งให้คำปรึกษาด้านวิชาการ เทคนิค อุปกรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลืออื่นๆ จนจบโครงการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และโพลีคลอรีเนเต้ดไปฟีนิล ในไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-ECD

12. หนังสืออ้างอิง

1. CODEX Alimentarius International Food Standard (CXG 90-2017), 2017
2. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11312/2021.Supersedes Document No.SANTE/2019/12682. Implemented by1/01/2022.