

การพัฒนาวิธีทดสอบ และ การตรวจสอบความใช้ได้ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในไข่ด้วยเทคนิค GC-MS/MS

ทิพย์สุตา วรรณอินทร์ ธาविดา ม่วงไตรรัตน์

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบ และ การตรวจสอบความใช้ได้ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในไข่ ด้วยเทคนิค GC-MS/MS ได้ศึกษาวิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ พบว่าสามารถวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ทั้งหมด 9 ชนิด ทำการสกัดตัวอย่างโดยบดตัวอย่างไข่เข้ากับ Sodium sulfate และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ระหว่าง อัตราส่วนของ diethyl ether : hexane จากนั้นทำการวิเคราะห์ชนิดสารด้วย GC-MS/MS (Triple Quadrupole) และทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จากการศึกษพบว่าวิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้อัตราส่วนของ diethyl ether : hexane เท่ากับ 1 : 9 มีปริมาณไขมันคงเหลือหลังจากการสกัดน้อยที่สุด โดยมีค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ 70-120% และ %RSD น้อยกว่า 20% โดยวิธีมีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 1.0 – 80.0 µg/kg และมีค่า Limit of Detection (LOD) อยู่ที่ 1 µg/kg และ ค่า Limit of Quantification (LOQ) อยู่ที่ 3 µg/kg

คำสำคัญ: ออร์กาโนฟอสเฟส, ไข่, GC-MS/MS

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

Method Development and Validation of the Determination of Organophosphates in Egg by GC-MS/MS

Tipsuda Wanna-in Thawida Muangtrairat

Abstract

Method development and validation of Organophosphates in Eggs using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS/MS, Triple Quadrupole). A total of nine organophosphate analytes were targeted. Sample preparation involved homogenization with sodium sulfate and clean-up using different solvent of diethyl ether and hexane. The clean-up procedure employing a 9:1 (v/v) ratio of diethyl ether to hexane demonstrated the most efficient fat removal. Method validation results indicated recoveries within 70–120% and relative standard deviations (%RSD) below 20%. Calibration curves exhibited excellent linearity ($R^2 > 0.9900$) across the concentration range of 1.0–80.0 µg/kg. The method achieved a limit of detection (LOD) of 1 µg/kg and a limit of quantification (LOQ) of 3 µg/kg.

Keywords: Organophosphates, Egg, GC-MS/MS

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

การพัฒนาวิธีทดสอบ และ การตรวจสอบความใช้ได้ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในไข่ด้วยเทคนิค GC-MS/MS

ทิพย์สุดา วรรณอินทร์ ธาविดา ม่วงไตรรัตน์

บทนำ

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates, OPPs) เป็นสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมและกำจัดแมลง ศัตรูพืช และโรคพืชต่าง ๆ โดยมีกลไกการทำงานในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase) ที่สำคัญต่อการส่งสัญญาณประสาทในแมลง เมื่อสารนี้เข้าสู่ร่างกายของแมลง จะทำให้ระบบประสาททำงานผิดปกติ ส่งผลให้แมลงตาย สารกลุ่มนี้มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในการเกษตร เพื่อป้องกันและควบคุมศัตรูพืช แต่การใช้งานต้องมีความระมัดระวัง เนื่องจากสามารถเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงทำลายสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นแล้วการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม OPPs ในไข่ จึงเป็นปัญหาที่น่าสนใจและสำคัญต่อความปลอดภัยด้านอาหารมีการใช้ในปริมาณที่มากหรือไม่ถูกต้อง อาจทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมถึงไข่ได้

กรมปศุสัตว์มีแผนขยายการส่งออกไข่ไก่ไปยังประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปด้วย ซึ่งสหภาพยุโรปได้กำหนดให้หน่วยงานที่มีอำนาจในการกำกับ ดูแลและรับรองการส่งออกของประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์รวมทั้งไข่ไก่ไปยังประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ต้องมีการเฝ้าระวังสารตกค้างที่อาจมีในผลิตภัณฑ์ และได้กำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ (Maximum residue limits, MRLs) ในไข่ ดังตารางที่ 1 ตารางที่ 1 ค่า MRLs สารกลุ่ม Organophosphates ในไข่

Compound	MRLs (mg/kg)
Diazinon	0.01 Reg. (EU) No 899/2012
Chlorpyrifos methyl	0.01 Reg. (EU) No 2020/1085
Parathion methyl	0.01 Reg. (EU) No 899/2012
Pirimiphos methyl	0.01 Reg. (EU) No 2016/53
Fenitrothion	0.01 Reg. (EU) No 899/2012
Chlorpyrifos	0.01 Reg. (EU) No 2020/1085
Pirimiphos ethyl	0.01

Compound	MRLs (mg/kg)
	Reg. (EU) No 2016/53
Bromophos ethyl	0.01
	Reg. (EU) No 2015/868
Ethion	0.01
	Reg. (EU) No 310/2011

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีสำหรับทดสอบและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphates ; OPPs) ในไข่ด้วยเทคนิค GC-MS/MS ได้

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม OPPs ในไข่ ด้วยเทคนิค GC-MS/MS โดยทดสอบสารกลุ่ม OPPs ดังนี้

1. Diazinon
2. Chlopyriphos methyl
3. Parathion methyl
4. Pirimiphos methyl
5. Fennitrothion
6. Chlorpyriphos
7. Pirimiphos ethyl
8. Bromophos ethyl
9. Ethion

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1. ได้วิธีการสกัดสารและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม OPPs ในไข่ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS

3.2. เป็นข้อมูลสำหรับยื่นขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ในการทดสอบสารกลุ่ม OPPs ในไข่ด้วยเทคนิค GC-MS/MS

4. อุปกรณ์และสารเคมี

- 4.1. อุปกรณ์และเครื่องมือ
 - 4.1.1. Beaker ขนาดต่างๆ
 - 4.1.2. Centrifuge tube แก้ว ชนิดมีขีดบอกปริมาตร ขนาด 15 mL
 - 4.1.3. Column chromatography ขนาดประมาณ 1 cm ID

- 4.1.4. Cylinder ขนาด 25, 50 และ 100 mL
- 4.1.5. Pasture pipette
- 4.1.6. Volumetric flask, class A
- 4.1.7. Micropipette
- 4.1.8. Glass Vial ขนาด 2 mL สำหรับใช้กับ automatic injector ของเครื่อง GC-MS/MS
- 4.1.9. ช้อนตักสารชนิด (spatula)
- 4.1.10. ชามระเหยสาร (evaporating dish)
- 4.1.11. ชุดโม่บดสารแบบแก้วใส (glass mortar and pastel)
- 4.1.12. ชุดขาตั้งและที่ยึด glass column
- 4.2. เครื่องมือ
 - 4.2.1. เครื่อง GC-MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น TRACE 1310-TSQ 8000 Evo
 - 4.2.2. เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งสารเคมีและตัวอย่าง
 - 4.2.3. เตาเผาไฟฟ้า
 - 4.2.4. อุปกรณ์ลดปริมาตรสารละลายโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (N-Evap)
 - 4.2.5. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)
 - 4.2.6. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
 - 4.2.7. ตู้ดูดความชื้นชนิดทนความร้อน หรือ โถแก้วดูดความชื้น
- 4.3. สารเคมี
 - 4.3.1. Acetone (AR grade)
 - 4.3.2. Diethyl ether (AR grade)
 - 4.3.3. Florisil ขนาด 60-100 mesh (for residue analysis) ชนิดสำหรับใช้กับ column chromatography
 - 4.3.4. n-Hexane (AR grade)
 - 4.3.5. Iso-octane (PR grade)
 - 4.3.6. Sodium sulfate (anhydrous granular, AR grade)
 - 4.3.7. Octadecylsilane; C18
 - 4.3.8. Helium gas (Ultra high purity) 99.999% ใช้เป็นแก๊สพาสำหรับเครื่อง GC-MS/MS
 - 4.3.9. Argon gas (Ultra high purity) 99.999% ใช้เป็น collision gas สำหรับเครื่อง GC-MS/MS
 - 4.3.10. Nitrogen gas ชนิด Oxygen Free Nitrogen (OFN), 99.995% ใช้สำหรับระเหยสารด้วยเครื่อง N-Evap

4.4. สารมาตรฐาน

4.4.1. สารละลายมาตรฐานผสม Mixed 167 ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Cat No.18000167 ที่มีใบรับรองคุณภาพ กำหนดให้เป็น Stock standard solution ซึ่งมีสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่ม OPPs จำนวน 23 ชนิด ความเข้มข้น 10 µg/mL

4.4.2. สารละลายมาตรฐานผสม Mixed 168 ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Cat No.18000168 ซึ่งมีสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่ม OPPs จำนวน 17 ชนิด ความเข้มข้น 10 µg/mL

5. วิธีดำเนินการ

5.1. การสกัดสารตัวอย่าง

5.1.1. ชั่งตัวอย่างไข่โดยใช้เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง โดยก่อนชั่ง คนตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นนำโกร่งบดสารไปวางบนเครื่องชั่งแล้วกด Tare เป็น 0.000 กรัม จากนั้น ใช้ pasture pipette ดูดไข่และปล่อยลงในโกร่งบดสาร ให้ได้น้ำหนัก 1 ± 0.010 กรัม

5.1.2. เติม sodium sulfate 4 กรัม ลงในตัวอย่างไข่ในโกร่งบด แล้วบดให้เข้ากันจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2. การทำให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างที่บดกับ sodium sulfate จนละเอียดแล้วมาใส่ลงใน column ที่บรรจุ deactivated florisil 1% และเติม C18 1.0 กรัมลงด้านบนของ column โดยใช้ข้อตักสารตักบรรจุผ่านกรวยแก้วลงสู่ column เคาะ column เบา ๆ ด้วยลูกยาง เพื่อให้สารที่บรรจุอยู่ใน column แน่นขึ้น และนำ centrifuge tube ขนาด 15 mL รองรับสารที่ด้านล่างของ column

ใช้กระบอกตวงสารตัวทำละลายผสม diethyl ether : hexane ปริมาตร 25 mL เทลงในโกร่งบดสารประมาณ 12.5 mL เพื่อชะสารที่ติดอยู่ในโกร่งบดและข้อตัก จากนั้นค่อยเทสารละลายลงใน column ชะโกร่งบดและข้อตักอีกครั้งด้วยตัวทำละลายผสมส่วนที่เหลืออยู่ แล้วเทใส่ใน column ปิดด้านบนของ column ด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันการระเหยของสารและฝุ่นละอองที่ตกลงไป ปล่อยให้สารละลายหยดลงใน tube จนหมด

โดยอัตราส่วนของ diethyl ether : hexane แต่ละ condition ดังนี้

a. diethyl ether : hexane อัตราส่วน 1 : 9

b. diethyl ether : hexane อัตราส่วน 2 : 8

5.3. การตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัดไขมัน

ตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัดไขมันหลังขั้นตอนการ clean-up จากสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ ไขมันที่เหลือ} = \frac{(\text{น้ำหนักหลอดแก้ว} + \text{ไขมันที่อบแห้ง}) - \text{น้ำหนักหลอดแก้ว}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างไข่}} \times 100$$

5.4. การทดสอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

ตัวอย่างที่ระเหยแห้งปรับปริมาตรด้วย Iso-Octane เป็น 1 mL ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ตรวจสอบค่า % recovery และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD_r)

$$\text{โดย } \% \text{ recovery} = [\text{CF}/(\text{CU} + \text{CA})] \times 100$$

เมื่อ CF = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ใน spiked sample (conc found)

CU = ความเข้มข้นของสารใน sample blank (conc unspiked)

CA = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป ใน sample blank (conc added)

$$\% \text{RSD}_r = (\text{standard deviation (SD)} / \text{mean conc}) \times 100$$

5.5. ปรับตั้งสถานะของเครื่อง GC ดังนี้

ชนิดของ column	: DB-5MS UI
ขนาดของ GC column	: เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ความยาว 30 m ความหนาของฟิล์มเคลือบ 0.25 μm
ชนิดของ Carrier gas	: Helium ชนิด Ultra High Purity
Flow rate ของ Carrier gas	: 1.0 mL/min
ชนิดของ injection port	: PTV
อุณหภูมิของ injection port	: 290 °C
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 μL
อุณหภูมิของ Column oven	: 100 °C (0.50 min), 20.0 °C/min to 280 °C (1.50 min), 10.0 °C/min to 300 °C (3.00 min)

5.6. ปรับตั้งสถานะของเครื่อง MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSQ-8000Evo ดังนี้

Ion source	: EI
Source Temperature	: 250 °C
Transfer line Temperature	: 290 °C

6. ขั้นตอนการทดสอบความได้ของวิธีทดสอบ

6.1. ผลกระทบจากเมทริกซ์

ตรวจวัดสารมาตรฐาน OPPs โดยการทำให้ matrix standard solution เทียบกับ standard in solvent วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 µg/kg ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และประเมินผล matrix effect โดยคำนวณความแตกต่าง (% different) ของค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค (peak area) จากสูตร

$$\frac{|\text{peak area of standard in solvent} - \text{peak area of matrix standard}| \times 100}{\text{peak area of standard in solvent}}$$

โดยเกณฑ์กำหนด % different < 20% แสดงว่า matrix ไม่มีผลกับการทดสอบ

6.2. การหาค่า Instrument detection limit (IDL)

ฉีด Matrix matched standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/kg จำนวน 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC-MS/MS ตรวจค่าสัญญาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลของเครื่อง GC-MS/MS กำหนดเกณฑ์ยอมรับของ S/N ≥ 3

6.3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

ฉีด Matrix matched standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 µg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง GC-MS/MS และสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีค แล้วพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R²) ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า R² ≥ 0.9900

6.4. การทดสอบเพื่อหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

ทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 6 ซ้ำด้วยเทคนิค GC-MS/MS โดยเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า Standard deviation (S₀) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก 3S₀ และค่า LOQ จาก 10S₀

6.5. การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

ทำการทดสอบ spiked sample ตามค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณได้อย่างน้อยความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบค่า LOD โดยพิจารณาเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ S/N ≥ 3 ส่วนค่า LOQ นั้น พิจารณาเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ จากค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, MR) 70-120 % และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r) ไม่เกิน 20%

6.6. ความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (Trueness) ของการวิเคราะห์

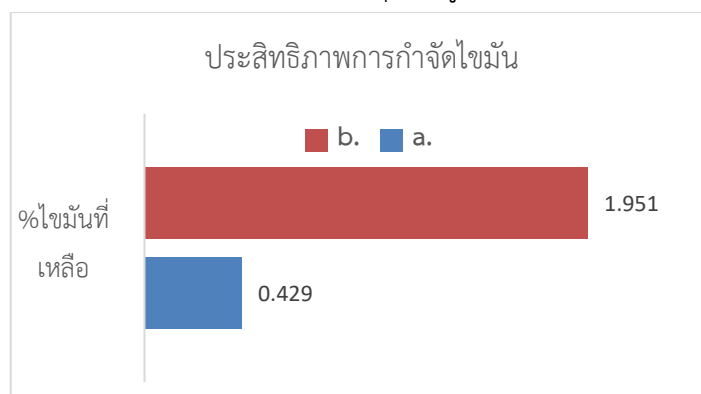
6.6.1. ความเที่ยง (Precision) ทดสอบตัวอย่าง Spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OPPs ระดับความเข้มข้น 3, 10, 20 µg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน พิจารณาความเที่ยงจาก %RSD เกณฑ์ที่ยอมรับคือ %RSD ≤ 20%

6.6.2. ความแม่นยำ (Trueness) ทดสอบตัวอย่าง Spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OPPs ระดับความเข้มข้น 3, 10, 20 µg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน พิจารณาความแม่นยำจาก %Recovery เกณฑ์ที่ยอมรับคือ 70-120%

7. ผลการทดลอง

7.1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดไขมัน

ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัดไขมัน พบว่า อัตราส่วนของตัวทำละลาย diethyl ether : hexane แต่ละ condition พบว่า condition a. diethyl ether : hexane อัตราส่วน 1 : 9 มีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันได้ดีที่สุด ดังรูปภาพที่ 1



รูปภาพที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดไขมันของแต่ละอัตราส่วนของตัวทำละลาย

ดังนั้นจึงเลือกใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง diethyl ether : hexane อัตราส่วน 1 : 9 ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

7.2. ผลกระทบจากเมทริกซ์

จากผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ พบว่าค่า %different ของสารทั้ง 9 สาร อยู่ในช่วง 1.36% – 94.03% ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ จึงใช้การชดเชยผลของเมทริกซ์ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานจาก matrix matched standard เพื่อความเหมาะสมในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลกระทบจากเมทริกซ์

Compound	%different						
	1 µg/kg	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	40 µg/kg	60µg/kg	80µg/kg
Diazinon	66.13	44.34	23.99	13.45	12.39	18.24	13.41
Chlorpyrifos methyl	19.45	3.41	20.45	25.14	33.42	28.21	30.28
Parathion methyl	50.68	25.12	19.97	2.12	34.66	1.41	8.42
Pirimiphos methyl	34.21	12.89	23.55	5.20	7.63	3.43	12.66
Fenitrothion	21.74	24.99	18.72	1.36	3.08	4.17	6.34
Chlorpyrifos	17.62	47.67	9.76	4.39	8.37	12.44	11.30
Pirimiphos ethyl	31.99	2.42	28.05	3.36	18.54	16.49	23.47
Bromophos ethyl	94.03	15.79	35.76	23.25	7.22	42.79	77.68
Ethion	94.03	15.79	35.76	23.25	7.22	42.79	77.68

7.3. การหาค่า Instrument detection limit (IDL)

จากการฉีด Matrix matched standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/kg จำนวน 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC-MS/MS พบว่า ค่า S/N ของทุกสารมีค่ามากกว่า 3 โดยค่า S/N เฉลี่ยของสารที่ต่ำสุดคือ Bromophos ethyl มีค่าเท่ากับ 17.05 แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะกำหนดให้เครื่องสามารถตรวจวัดได้คือ 1.0 µg/kg และที่ความเข้มข้นนี้ สามารถกำหนดให้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน (Lowest Calibration Level, LCL) ได้ เนื่องจากค่า S/N มีค่ามากกว่า 3 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า Instrument detection limit (IDL) ของเครื่อง GC-MS/MS ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/kg

Compound	signal to noise ratio			
	1	2	3	mean
Diazinon	11.29	13.49	34.34	19.71
Chlorpyrifos methyl	33.68	36.29	143.08	71.02
Parathion methyl	15.1	14.76	23.61	17.82
Pirimiphos methyl	303.14	57.63	234.68	198.48
Fenitrothion	390.53	364.68	243.3	332.84
Chlorpyrifos	160.36	266.47	118.83	181.89
Pirimiphos ethyl	964.18	502.97	415.45	627.53
Bromophos ethyl	24.15	10.15	16.84	17.05
Ethion	113.95	80.22	118.37	104.18

7.4. การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

ผลการทดสอบ Matrix matched standard ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ระดับความ 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 µg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง GC-MS/MS เมื่อพิจารณาค่า R^2 พบว่าสารที่ทดสอบทุกสารมีค่า R^2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับทุกสาร ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า Coefficient of determination, R^2 ของ Matrix matched standard ที่ทดสอบ

Compound	R^2
Diazinon	0.9903
Chlopyrifos methyl	0.9951
Parathion methyl	0.9911
Pirimiphos methyl	0.9908
Fenitrothion	0.99004
Chlorpyrifos	0.9901
Pirimiphos ethyl	0.9931
Bromophos ethyl	0.9908
Ethion	0.9909

7.5. การทดสอบเพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบ spiked sample ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 6 ซ้ำ สามารถคำนวณค่า LOD และ LOQ ได้ตั้งแต่ 1.02 – 3.77 และ 3.41– 12.58 µg/kg ตามลำดับ ดังตารางที่ 5 จึงทำการทดสอบยืนยันค่า LOD และ LOQ ที่ความเข้มข้น 1 และ 3 µg/kg ตามลำดับต่อไป

ตารางที่ 5 ผลทดสอบ Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

Compound	Conc. (µg/kg)					mean	SD	LOD (3S ₀)	LOQ (10S ₀)
	1	2	4	5	6				
Diazinon	8.190	8.186	8.592	9.370	8.176	8.503	0.516	1.55	5.16
Chlopyrifos methyl	8.856	8.328	8.903	8.601	8.109	8.559	0.341	1.02	3.41
Parathion methyl	7.808	8.324	8.014	8.668	7.932	8.149	0.347	1.04	3.47
Pirimiphos methyl	9.825	9.413	8.005	11.518	9.940	9.740	1.258	3.77	12.58
Fenitrothion	7.553	8.240	8.149	9.176	8.699	8.363	0.611	1.83	6.11
Chlorpyrifos	9.231	10.531	8.787	9.658	8.821	9.406	0.722	2.17	7.22
Pirimiphos ethyl	9.958	8.665	11.090	9.635	10.389	9.947	0.900	2.70	9.00

Compound	Conc. (µg/kg)					mean	SD	LOD (3S' ₀)	LOQ (10S' ₀)
	1	2	4	5	6				
Bromophos ethyl	8.446	8.534	9.941	8.541	7.579	8.608	0.847	2.54	8.47
Ethion	10.329	9.497	9.617	9.161	10.590	9.839	0.598	1.79	5.98

7.6. การยืนยันค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบ spiked sample ที่ความเข้มข้น 1 และ 3 µg/kg จำนวน 6 ซ้ำ เพื่อยืนยันค่า LOD และค่า LOQ พบว่า S/N ของค่า LOD มีค่า > 3 ส่วน LOQ นั้น %mean recovery อยู่ในช่วง 60-120%, %RSDr มีค่า ≤ 20% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทุกสาร ดังตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ผลทดสอบ การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ความเข้มข้น 1 µg/kg

Compound	Signal to noise						mean
	1	2	3	4	5	6	
Diazinon	155.64	286.2	174.34	159.03	183.9	377.3	222.74
Chlopyriphos methyl	198.87	189.5	123.72	311.1	183.33	184.57	198.52
Parathion methyl	53.69	44.8	37.51	54.18	40.23	39.84	45.04
Pirimiphos methyl	620.48	323.15	302.55	29.21	1146.96	368.2	465.09
Fennitrothion	337.32	308.23	177.84	391.17	35.65	303.41	258.94
Chlorpyriphos	69.57	152.27	64.43	90.16	135.15	108.82	103.4
Pirimiphos ethyl	538.62	255.25	615.31	393.13	414.33	513.94	455.1
Bromophos ethyl	318.02	252.18	513.46	123.69	393.14	481.46	346.99
Ethion	98.93	135.71	68.56	124.5	93.85	87.7	101.54

ตารางที่ 7 ผลทดสอบ การยืนยันค่า Limit of Quantification (LOQ) ความเข้มข้น 3 µg/kg

Compound	Spiked 3 µg/kg		
	%mean Recovery	SD	%RSD
Diazinon	98.57	0.162	5.49
Chlopyriphos methyl	96.54	0.181	6.26
Parathion methyl	68.20	0.137	6.72
Pirimiphos methyl	101.72	0.172	5.64
Fennitrothion	75.63	0.259	11.41

Compound	Spiked 3 µg/kg		
	%mean Recovery	SD	%RSD
Chlorpyrifos	94.89	0.290	10.18
Pirimiphos ethyl	99.32	0.124	4.17
Bromophos ethyl	96.26	0.318	11.03
Ethion	98.45	0.163	5.51

7.7. ความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (Trueness) ของการวิเคราะห์

7.7.1. การทดสอบความเที่ยง (Precision) โดยทดสอบตัวอย่าง Spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OPPs ระดับความเข้มข้น 3, 10, 20 µg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ พบว่า %RSD มีค่า $\leq 20\%$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทุกสาร ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 %RSD_r ของสารกลุ่ม OPPs ระดับความเข้มข้น 3, 10, 20 µg/kg

Compound	%RSD _r		
	3 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg
Diazinon	9.83	15.75	5.79
Chlorpyrifos methyl	3.47	8.46	2.97
Parathion methyl	6.08	5.68	9.25
Pirimiphos methyl	11.39	4.45	6.20
Fenitrothion	4.37	8.60	9.22
Chlorpyrifos	10.54	6.30	6.49
Pirimiphos ethyl	10.35	10.23	9.19
Bromophos ethyl	18.59	14.37	13.12
Ethion	3.58	4.84	6.48

7.7.2. การทดสอบความแม่นยำ (Trueness) โดยทดสอบตัวอย่าง Spike sample ที่มีความเข้มข้นของสารกลุ่ม OPPs ระดับความเข้มข้น 3, 10, 20 µg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ พบว่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 70-120% ทุกสาร ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 %Recovery (เฉลี่ย) ของสารกลุ่ม OPPs ระดับความเข้มข้น 3, 10, 20 µg/kg

Compound	%Recovery (เฉลี่ย)		
	3 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg
Diazinon	98.21	88.57	74.43
Chlorpyrifos methyl	107.27	106.00	107.16
Parathion methyl	97.78	114.06	104.39
Pirimiphos methyl	106.52	113.39	108.98
Fenitrothion	102.69	110.61	99.18
Chlorpyrifos	103.03	109.94	108.88
Pirimiphos ethyl	101.42	103.93	102.75
Bromophos ethyl	87.64	107.46	102.56
Ethion	106.87	112.39	105.49

8. สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในไข่ ด้วยเทคนิค GC-MS/MS มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 1.0 – 80.0 µg/kg มีค่าความแม่นยำของการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ 70 - 120% มีค่าความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ %RSD ≤ 20% โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจพบได้ (LOD) เท่ากับ 1.0 µg/kg และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถหาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 3.0 µg/kg

9. ข้อเสนอแนะ

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

10. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้รวมทั้งผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการงานเคมีอาหาร สารตกค้าง และสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งให้คำปรึกษาด้านวิชาการ เทคนิค อุปกรณ์ ตลอดจนความช่วยเหลืออื่นๆ จนจบโครงการ การพัฒนาวิธีทดสอบ และ การตรวจสอบความใช้ได้ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในไข่ด้วยเทคนิค GC-MS/MS

11. หนังสืออ้างอิง

1. 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.
2. CODEX Alimentarius International Food Standard (CXG 90-2017), 2017
3. P. Plaza Bolanos, A. Garrido Frenich, J.L.Martinez Vidal. Application of gas chromatography - triple quadrupole mass spectrometry in the quantification - confirmation of pesticides and polychlorinated biphenyls in eggs at trace levels. J Chromatography A; (2007) Vol.1167, Issue: 1, pp 9-17.