การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มโพลีคลอริเนเต็ดไบฟีนิล (PCBs) และออร์กาโนคลอรีน (OCPs) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS

ศิริวัฒน์ รายณะสุข วรัญญา แก้วทิพย์ เอกชา ตนานนท์ชัย
สุนีย์ คณาพิพัฒน์ นัดดา โพธิ์ขาว ภาณุพันธุ์ สว่างวงษ์

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มโพลีคลอริเนเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls; PCBs) และออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine Pesticides; OCPs) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ตามแนวทางของ SANTE (11312/2021) โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยอะซิโตไนไตรล์ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพาหะ และใช้การแตกตัวเป็นไอออนด้วยอิเล็กตรอน (Electron Ionization; EI) ในโหมดไอออนบวก ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบพบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 5 - 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) ของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs อยู่ในช่วง 0.9950-0.9997 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ ของสารกลุ่ม PCBs เท่ากับ 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ OCPs มีค่าเท่ากับ 2 และ 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยประเมินจากค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน (%Recovery) พบว่าตัวอย่างที่เติมสารกลุ่ม PCBs ที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 75.53-118.28 และ OCPs ที่ระดับความเข้มข้น 8, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 74.49-117.45 สำหรับการทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (%RSD_r) ของสารกลุ่ม PCBs ที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 1.74-18.70 และ OCPs ที่ระดับความเข้ม 8, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 1.01-19.92 และการทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (%RSD_R) ของสารกลุ่ม PCBs ที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 1.44-17.20 และ OCPs ที่ระดับความเข้มข้น 8, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 1.53-19.89 จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ จึงสรุปได้ว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ในช่วงความเข้มข้น 5–300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ : สารกลุ่มโพลีคลอริเนเต็ดไบฟีนิล (PCBs) และออร์กาโนคลอรีน (OCPs), การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for determination of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Organochlorine Pesticides (OCPs) in animal feed by GC-MS/MS

Siriwat Rainasuk Warunya Kaewthip Aekkacha Tananonchai
Sunee Kanapipat Nadda Phokhaw Panupan Swangwong

Abstract

An in-house method for the determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorines pesticide (OCPs) in animal feed using GC-MS/MS was validated in accordance with the SANTE (11312/2021) guidelines. The samples were extracted with acetonitrile. The analysis was carried out using GC-MS/MS with helium as the carrier gas and using electron ionization (EI) in positive ion mode. The results of the method validation showed good linearity of the calibration curves over the concentration range of 5–300 µg/kg, with coefficients of determination (R^2) ranging from 0.9950 to 0.9997 for PCBs and OCPs. The limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were 2 and 5 µg/kg, respectively, for PCBs, and 2 and 8 µg/kg, respectively, for OCPs. The mean recoveries of PCBs at spiking level of 5, 50 and 100 µg/kg ranged from 75.53 -118.28% and OCPs at spiking level 8, 50 and 100 µg/kg ranged from 74.49-117.45%.

The relative standard deviations for repeatability (%RSDr) of PCBs at spiking level 5, 50 and 100 µg/kg ranged from 1.74-18.70% and OCPs at the spiking level 8, 50 and 100 µg/kg ranged from 1.01-19.92%. The relative standard deviations for with-in laboratory reproducibility ($\%RSD_R$) of PCBs at spiking levels of 5, 50 and 100 µg/kg ranged from 1.44-17.20% and OCPs at spiking level 8, 50 and 100 µg/kg ranged from 1.53-19.89%. All evaluated performance characteristics were within the established acceptance criteria. Therefore, the developed method was considered suitable for the determination of PCBs and OCPs in animal feed at concentrations ranging from 5 to 300 µg/kg.

Keywords : Florfenicol, method validation, animal feed

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of livestock Development

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่มโพลีคลอริเนเต็ดไบฟีนิล (PCBs) และออร์กาโนคลอรีน (OCPs) ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS

ศิริวัฒน์ รายณะสุข วรัญญา แก้วทิพย์ เอกชา ตนานนท์ชัย
สุนีย์ คณาพิพัฒน์ นัดดา โพธิ์ขาว ภาณุพันธุ์ สว่างวงษ์

บทนำ

สารกลุ่มโพลีคลอริเนเต็ดไบฟีนิล (Polychlorinated Biphenyls; PCBs) เป็นสารเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ที่มีความเสถียรสูง ไม่ติดไฟ และมีคุณสมบัติเป็นฉนวนไฟฟ้าที่ดี สารดังกล่าวเป็นสารก่อมะเร็ง และสารพิษที่ตกค้างในร่างกายระยะยาว ส่งผลเสียต่อระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกัน และฮอร์โมน ปัจจุบันสารชนิดนี้ถูกห้ามผลิตและนำเข้าในหลายประเทศทั่วโลก ส่วนออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine Pesticides; OCPs) เป็นสารเคมีสังเคราะห์ประเภทไฮโดรคาร์บอนคลอริเนต (Chlorinated Hydrocarbon) มีโมเลกุลประกอบไปด้วยคาร์บอน (C) คลอรีน (Cl) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีความคงทนไม่สลายตัวและไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในน้ำมัน อีกทั้งยังเป็นสารกลุ่มที่มีการสลายตัวช้า ซึ่งพบว่ามีการสะสมอยู่ตามดินและตามแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงพบว่ามีสารกลุ่มนี้เข้าไปสะสมอยู่ในพืชผักและผลไม้ได้ หากพืชผักผลไม้ดังกล่าวเพาะปลูกอยู่ในดินที่มีสารชนิดนี้สะสม นอกจากนั้นอาจพบสารกลุ่มดังกล่าวตกค้างในพืชผัก ผลไม้จากการที่เกษตรกรมีการใช้สารกลุ่มนี้เพื่อกำจัดแมลงและศัตรูพืชด้วย

เนื่องจาก PCBs และ OCPs มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมและสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิต สารดังกล่าวจึงสามารถเข้าสู่ร่างกายสัตว์เศรษฐกิจ โดยเฉพาะโค สุกร แกะ และแพะ ผ่านการได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อน เช่น หญ้าสด หญ้าหมัก หญ้าแห้ง หรือจากการปล่อยสัตว์ให้แทะเล็มในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในดินและสิ่งแวดล้อม (Foods., 2024, 13, 528) ซึ่งอันตรายของสารกลุ่ม OCPs ต่อร่างกายมนุษย์ เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะไปสะสมอยู่ในไขมันตามส่วนต่างๆ ของร่างกายผ่านการกิน และหายใจ และสามารถทำให้เกิดอาการพิษทั้งแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2012) ได้แก่ ความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อ ความเสียหายต่อระบบประสาท การกดภูมิคุ้มกัน โรคมะเร็ง และการเสียชีวิต สำหรับ PCBs ด้วยคุณสมบัติความคงทนต่อการสลายตัวและความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ทำให้สารกลุ่มนี้สามารถเกิดการสะสมทางชีวภาพ และการเพิ่มความเข้มข้นตามห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศได้ รวมถึงสามารถสะสมในเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์และสัตว์ การได้รับ PCBs อาจเกี่ยวข้องกับผลกระทบต่อระบบประสาทและพฤติกรรม ระบบต่อมไร้ท่อ ระบบภูมิคุ้มกัน และการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ การได้รับ PCBs บางชนิดในระหว่างช่วงพัฒนาการอาจส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของระบบประสาทในทารกและเด็ก (L. Peivasteh-roudsari et al., 2023)

จากคุณสมบัติด้านความคงทน การสะสมในสิ่งแวดล้อม และความสามารถในการเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs การเฝ้าระวังและตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในอาหารสัตว์จึงมีความสำคัญต่อการควบคุมความปลอดภัยของอาหารสัตว์และการป้องกันการถ่ายทอดสารตกค้างเข้าสู่ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล จึงต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่ม

PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ โดยอ้างอิงแนวทางการทดสอบจาก Monitoring of pesticide residues from fish feed, fish and vegetables, Helilyon7 (2021) และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) เพื่อแสดงว่าวิธีทดสอบดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์การใช้งาน

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลทดสอบที่น่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

พัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิธีทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS
2. ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017

4.วิธีดำเนินการ

ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน ช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (working range) และผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ดังนี้

4.1.1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve) และการหาช่วงที่ใช้งาน (working range)

4.1.1.1 ทดสอบสารมาตรฐานกลุ่ม PCBs และ OCPs จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve, SCC) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกลุ่ม PCBs และ OCPs และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า coefficient of determination (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 (U.S. FDA, 2023)

4.1.1.2 ทดสอบ spiked sample ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (matrix-matched calibration curve, MCC) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample ของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า coefficient of determination (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 (U.S. FDA, 2023)

4.1.2 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ทำการเปรียบเทียบและประเมิน %matrix effect (ME) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ (MCC) กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย (SCC) ซึ่งค่าการยอมรับไม่เกิน ±20% SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

$$\%ME = \left(\frac{\text{Slope of MCC}}{\text{Slope of SCC}} - 1 \right) \times 100$$

4.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ดังนี้

4.2.1 ทดสอบ spiked sample ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ที่ระดับเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ ทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS/MS นำผลทดสอบคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) แล้วคำนวณค่า LOD และค่า LOQ จากสูตร ดังนี้ (EURACHEM guide, 2025)

$$LOD = 3S'_0 \quad \text{และ} \quad LOQ = 10S'_0$$

$$S'_0 = \frac{S0}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ S_0 = Standard deviation จากการทดสอบซ้ำ
n = จำนวนทดสอบซ้ำในงาน routine
S'_0 = standard deviation สำหรับคำนวณค่า LOD และ LOQ

4.2.2 ทำการยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ spiked sample ของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วประเมินว่าค่า Signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.2.3 ทำการยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ spiked sample ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ของสารที่คำนวณได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำความเข้มข้นของสารที่ทดสอบได้ มาประเมินความแม่นและความเที่ยงว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐานของ SANTE /11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) หากไม่ได้ให้ยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

4.3 การทดสอบหาความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ ดังนี้

4.3.1 ทดสอบความแม่นและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ spiked sample ของสารกลุ่ม PCBs) 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5(LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสารกลุ่ม OCPs จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 8(≤MRL), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.2 ทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (with-in laboratory reproducibility) ของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ทดสอบต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน แต่ละวันจะทำการทดสอบ spiked sample ของสารกลุ่ม PCBs จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5(LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ

สารกลุ่ม OCPs จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 8 (≤MRL), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

4.3.3 ประเมินความแม่น โดยการคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนได้ (%mean recovery) ของแต่ละความเข้มข้นต้องอยู่ในช่วง 70 - 120% ตามมาตรฐาน SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

4.3.4 ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ($\%RSD_r$) ของความเข้มข้นสารที่ทดสอบได้ ซึ่งต้องไม่เกิน ≤ 20% SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

4.3.5 ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ($\%RSD_R$) ของความเข้มข้นสารที่ทดสอบได้ ซึ่งต้องไม่เกิน ≤ 20% SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

4.4 การทดสอบ Selectivity และ Specificity

4.4.1 เตรียมตัวอย่าง reagent blank และ sample blank จำนวนละ 3 ซ้ำ

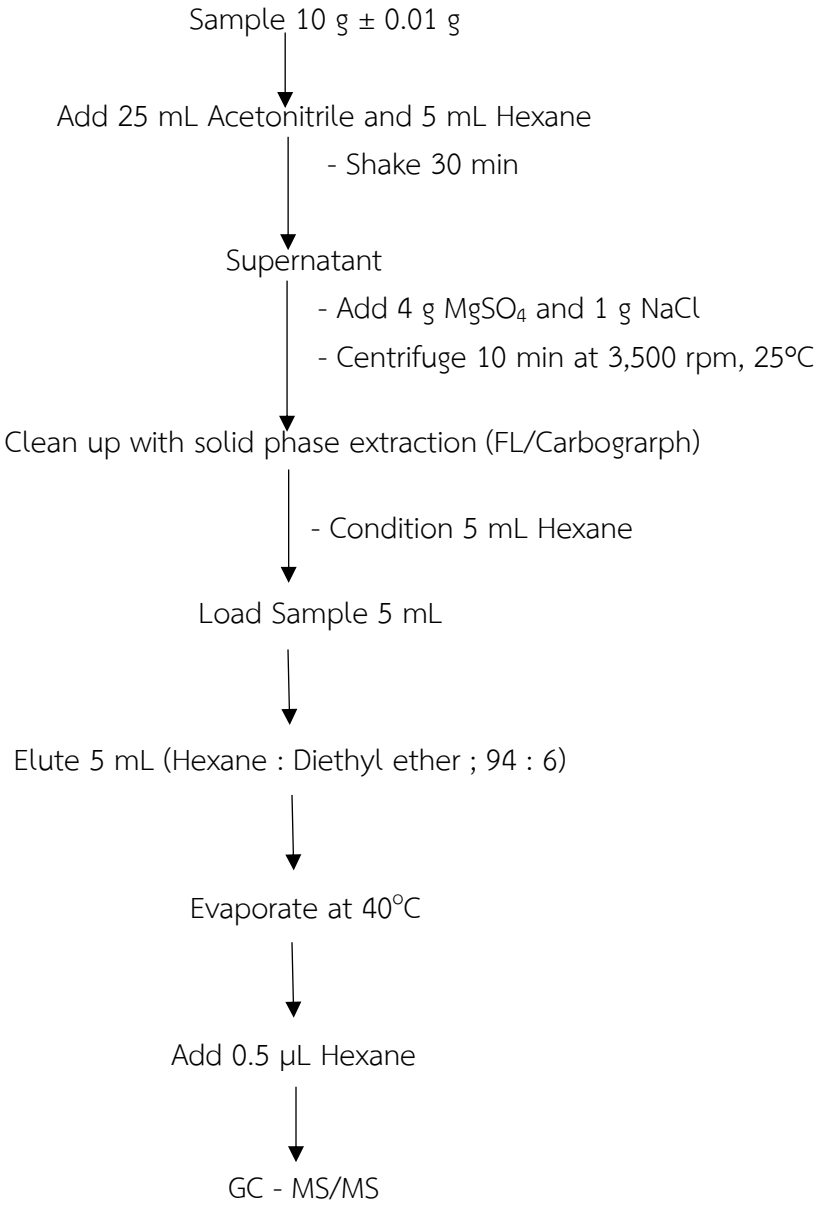
4.4.2 เตรียมตัวอย่าง spiked sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารกลุ่ม PCBs ความเข้มข้นที่ระดับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสารกลุ่ม OCPs ความเข้มข้นที่ระดับ 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนละ 3 ซ้ำ

4.4.3 นำตัวอย่างข้อ (4.4.1 - 4.4.2) ทำการทดสอบด้วยวิธีทดสอบสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS

4.4.4 เปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank (ข้อ 4.4.1) และ spiked sample (ข้อ 4.4.2) เพื่อตรวจสอบสัญญาณรบกวน โดยพิจารณาจากพีคของสารที่ปรากฏใน reagent blank และ sample blank ต้องไม่พบพีค หรือถ้าพบพีคที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ใกล้เคียงกับ standard ต้องมีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ส่วน spiked sample ต้องมีค่า RT แตกต่างจาก standard ไม่เกิน ±0.1 นาที และมีค่า m/z ตรงกับ standard และมีค่า ion ratio แตกต่างจากสารมาตรฐานไม่เกิน 30% จึงถือว่าวิธีมีความจำเพาะปราศจากสารรบกวน ตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

แผนผังขั้นตอนการทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ก่อนทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS/MS



5. ผลการทดลอง

5.1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน ช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบ (working range) และผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

กราฟมาตรฐานสารกลุ่ม PCBs และ OCPs จำนวน 25 ชนิด แบบ SCC และ MCC มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5 – 300 µg/kg มีค่า r^2 มากกว่า 0.995 ทุกสาร ตามตารางที่ 1 และเมื่อนำค่า slope ของ SCC และ MCC มาคำนวณค่า %ME พบว่ามีค่าตั้งแต่ -3.36% (PCB 138) ถึง -92.55% (2,4-DDE) โดยมีเพียง 4 สารที่มีค่า %ME น้อยกว่า ±20% ได้แก่ PCB101, PCB138, PCB153 และPCB 180 ดังนั้น จึงต้องใช้การชดเชยผลกระทบจากเมทริกซ์ ด้วยสร้างกราฟมาตรฐานแบบ MCC ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดังตารางที่ 1

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยทดสอบ spiked sample ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในช่วงความเข้มข้น 5 -300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และจากการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ spiked sample และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; r^2) พบว่า มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.995$) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่า ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในช่วง 5 - 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงดี เหมาะสมในการใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังตารางที่ 1

5.2 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

5.2.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก $LOD=3S'_0$ และ $LOQ=10S'_0$ (EURACHEM, 2014) มีค่าดังตารางที่ 2

5.2.2 ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD) ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ที่ระดับ LOD พบว่า มีค่า S/N < 3 และผลต่างร้อยละของ ion ratio ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) จึงทำการปรับค่า LOD เป็น 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยัน พบว่า มีค่า S/N ≥ 3 และผลต่างร้อยละของ ion ratio เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) ดังนั้นค่า LOD ของสารสารกลุ่ม PCBs และ OCPs มีค่าเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 2

5.2.3 ผลการยืนยันความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ) ของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ที่ระดับ LOQ พบว่า ค่า %Recovery ไม่อยู่ในช่วง 70 - 120 และ %RSD ไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) จึงทำการปรับค่า LOQ สารกลุ่ม PCBs และ OCPs เป็น 5 และ 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 70 - 120 เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ SANTE 11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) ดังนั้นค่า LOQ

ของสารกลุ่มPCBs และ OCPs มีค่าเท่ากับ 5 และ 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงมีความเหมาะสมสำหรับวิธีทดสอบนี้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ค่า Coefficient of determination, r^2 และ Matrix effect

Compounds	SCC		MCC		%ME
	calibration curve	r^2	calibration curve	r^2	
PCB 28	y=10444x-9536	0.9982	y=6198.3x-2441.5	0.9985	-40.65
PCB 52	y=3276.1x-2356	0.9988	y=1424.8x-2384.3	0.9992	-28.08
PCB 101	y= 3685.7x-9334.1	0.9993	y=2697x-2379.3	0.9994	-17.67
PCB 118	y= 6020.3x-11921	0.9991	y=4290x.1-5778.3	0.9997	-28.74
PCB 138	y=4110x-10465	0.9993	y=3971.8x-1193.2	0.9994	-3.36
PCB 153	y=3685.7x-9334.1	0.9993	y=3559.2x-1067.4	0.9995	-3.43
PCB 180	y=3324x-8586.3	0.9993	y=3181.1x-3468.2	0.9997	-4.30
2,4-DDD	y=14943x-43171	0.9993	y=4499.2x-11875	0.9990	-69.89
2,4-DDE	y = 23054x - 4789.5	0.9975	y=716.62x+1985.8	0.9950	-92.55
2,4-DDT	y=15468x-78461	0.9991	y=4635.7x-26184	0.9983	-70.03
4,4-DDD	y=15611x-79011	0.9991	y=4665.4x-27448	0.9983	-70.11
4,4-DDE	y=3446.2x-4077.9	0.9990	y=1826x-2891.1	0.9995	-47.01
4,4-DDT	y=12211x-77315	0.9989	y=5140x-31550	0.9987	-57.91
Aldrin	y=869.42x-1059.7	0.9991	y=412.71x-2267.3	0.9977	-52.53
cis-Chlordane	y=1282.2x-4351.4	0.9993	y=416.17x-2128	0.9989	-67.50
tran-Chlordane	y=579.29-2106.3	0.9993	y=194.74x-1528.9	0.9989	-66.38
Dieldrin	y=573.28-2251.5	0.9994	y=160.85x-1435.9	0.9981	-71.94
Endosulfan sulfate	y=759.29x-2237.4	0.9993	y=237.24x-906.62	0.9982	-68.76
Endrin	y=227.58x-1129.1	0.9993	y=76.598x-785	0.9976	-66.34
alpha-HCH	y=1333x-5105.6	0.9990	y=142.73x-1035.2	0.9979	-89.29
beta-HCH	y=1525.1x-3480	0.9989	223.71x-1918.1	0.9973	-85.33
delta-HCH	y=1288x-4437.5	0.9988	y=232.52x-2434.2	0.9973	-81.94
gamma-HCH	y=1277x-4677.8	0.9991	y=135.27x-801.84	0.9987	-89.40
Heptachlor	y=2656.6x-1898.9	0.9989	y=821.35x-6790.2	0.9968	-69.08
Heptachlor epoxide	y=894.12x-2767	0.9993	y=225.66x-2185.2	0.9976	-74.76

ตารางที่ 2 ผลทดสอบ LOD, LOQ และยืนยันค่า LOD, LOQ

Compounds	Spiked sample 20 µg/kg (n=10)			LOD (n=10)		LOQ (n=10)		
	S'0	LOD ($3S'_0$)	LOQ ($10\ S'_0$)	spiked conc. (µg/kg)	S/N (mean)	spiked conc. (µg/kg)	%MR (mean)	%RSD (%)
PCB 28	0.34	1.01	3.37	2	15905780	5	84.62	14.79
PCB 52	0.48	1.44	4.81	2	4213967	5	88.40	10.25
PCB 101	0.69	2.08	6.92	2	2862380	5	92.18	12.34
PCB 118	1.16	3.47	11.57	2	1128782	5	80.34	16.82
PCB 138	0.19	0.57	1.89	2	9743529	5	107.02	11.34
PCB 153	0.56	1.69	5.64	2	8713319	5	89.26	10.09
PCB 180	1.28	3.83	12.77	2	7369484	5	76.38	16.19
2,4-DDD	0.72	2.16	7.19	2	216.7	8	83.44	9.94
2,4-DDE	1.42	4.26	14.2	2	2102587.5	8	71.89	16.59
2,4-DDT	0.38	1.15	3.84	2	207.5	8	81.03	13.83
4,4-DDD	1.02	3.07	10.25	2	193.4	8	83.01	13.08
4,4-DDE	0.88	2.63	8.78	2	4995016.1	8	70.73	7.85
4,4-DDT	0.92	2.77	9.24	2	212.7	8	84.51	4.92
Aldrin	0.17	0.52	1.74	2	452.5	8	92.79	11.04
cis-Chlordane	0.52	1.55	5.16	2	1068443.6	8	83.25	10.04
tran-Chlordane	0.51	1.53	5.11	2	479276.5	8	75.75	13.18
Dieldrin	0.58	1.74	5.82	2	41.2	8	84.79	9.74
Endosulfan sulfate	0.65	1.95	6.5	2	564286	8	86.73	19.25
Endrin	0.59	1.77	5.89	2	29.1	8	87.08	14.34
alpha-HCH	0.37	1.1	3.66	2	424565.5	8	73.15	11.50
beta-HCH	0.48	1.45	4.83	2	511468.8	8	72.58	13.99
delta-HCH	0.41	1.22	4.07	2	566289.2	8	79.43	16.70
gamma-HCH	0.39	1.18	3.93	2	408565.5	8	74.25	9.22
Heptachlor	0.34	1.45	14.14	2	2367012.9	8	85.78	11.03
Heptachlor epoxide	0.57	1.70	5.68	2	522987.4	8	93.16	16.88

5.3.2 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ fortified sample ของสารกลุ่ม PCBs 3 ระดับ คือ 5(LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสารกลุ่ม OCPs 3 ระดับ คือ 8 (LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD_r) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตาม SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) ดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

5.3.3 จากการทดสอบความเที่ยงการทำซ้ำได้ โดยทดสอบ fortified sample ของสารกลุ่ม PCBs 3 ระดับ คือ 5(LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสารกลุ่ม OCPs 3 ระดับ คือ 8 (LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD_R) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตาม SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026) ดังตารางที่ 4 และตารางที่ 5 จากการทดสอบความเที่ยงการทวนซ้ำได้ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำของสารกลุ่มโพลีคลอริเนเต็ดไบฟีนิล (PCBs)

Compounds	Spiked conc. (µg/kg)	Repeatability (%RSD_r)				Within-laboratory Reproducibility (%RSD_R) (n=10)	
		Day 1 (n=5)		Day 2 (n=5)			
		%MR	%RSD_r	%MR	%RSD_r	%MR	%RSD_R
PCB 28	5	111.64	12.30	91.40	12.88	85.68	9.27
	50	99.91	15.73	93.57	13.31	90.39	16.36
	100	86.17	15.08	98.01	9.38	113.97	4.79
PCB 52	5	113.70	3.97	112.72	2.60	89.76	9.02
	50	105.25	13.70	97.05	14.31	98.31	17.20
	100	100.01	12.68	101.81	12.36	115.61	3.59
PCB 101	5	117.56	2.41	114.10	2.36	82.64	10.16
	50	94.96	17.33	75.53	10.71	112.82	6.90
	100	81.16	18.70	96.52	3.87	78.06	1.44
PCB 118	5	96.49	11.70	94.44	11.41	84.56	6.38
	50	105.77	6.85	103.09	13.36	105.55	9.55
	100	107.95	7.07	91.00	9.01	87.11	4.44
PCB 138	5	116.68	1.87	118.28	1.74	113.36	2.70
	50	81.98	10.83	81.05	12.56	107.86	3.12
	100	75.89	15.21	83.15	8.43	104.87	6.03
PCB 153	5	115.04	4.40	110.43	7.03	107.20	7.45
	50	88.18	11.87	87.75	13.79	108.70	5.44
	100	84.01	15.67	90.51	8.91	107.40	1.58
PCB 180	5	111.06	6.25	113.52	4.79	85.44	6.22
	50	92.30	13.07	89.64	13.07	106.44	2.78
	100	88.89	11.82	90.90	3.36	105.90	1.45

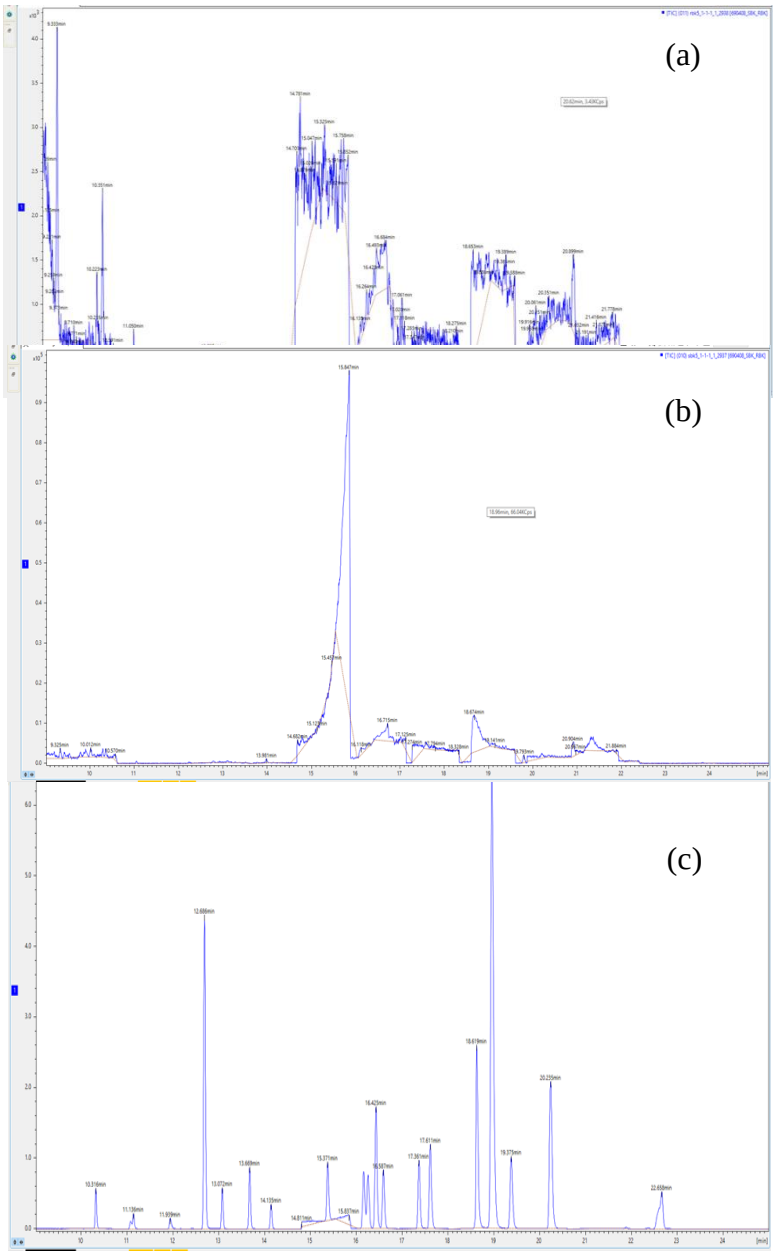
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) แบบการทวนซ้ำของสารออร์กาโนคลอรีน (OCPs)

Compounds	Spiked conc. (µg/kg)	Repeatability (%RSD_r)				Within-laboratory Reproducibility (%RSD_R) (n=10)	
		Day 1 (n=5)		Day 2 (n=5)			
		%MR	%RSD_r	%MR	%RSD_r	%MR	%RSD_R
2,4-DDD	8	91.58	3.13	76.13	12.05	87.49	12.96
	50	80.63	7.27	106.35	10.13	93.5	1.53
	100	90.2	18.37	108.3	5.51	109.8	7.73
2,4-DDE	8	105.98	3.25	93.28	10.13	79.23	12.09
	50	76.6	9.67	107.79	11.09	93.43	2.64
	100	86.43	18.41	106.33	4.41	88.43	17.2
2,4-DDT	8	115.93	1.81	116.08	1.99	82.53	9.68
	50	81.64	6.64	109.25	10.33	94.74	15.65
	100	92.2	17.97	115.23	2.95	106.44	6.82
4,4-DDD	8	108.5	4.81	105.13	10.38	81.29	10.39
	50	79.8	7	109.28	11.47	91.76	19.89
	100	93.82	18.71	113.79	4.12	108.32	6.82
4,4-DDE	8	85.75	2.64	77.14	11.33	89.84	6.67
	50	74.54	5.03	98.87	11.32	94.4	17.78
	100	89.5	17.31	96	9.37	107.75	6.43
4,4-DDT	8	116.05	4.22	99.75	9.68	81.35	3.04
	50	109.9	8.8	96.51	14.77	94.68	15.65
	100	103.91	10.3	111.29	6.41	105.06	2.86
Aldrin	8	116.7	14.31	105.97	7.54	89.18	7.7
	50	109.88	18.3	88.58	10.18	75.77	5.99
	100	100.4	16.78	103.23	6.97	111.72	5.56
cis-Chlordane	8	94.53	4.14	83.52	10.8	75.53	10.25
	50	79.08	12.1	106.12	16.22	113.26	4.1
	100	87.27	19.47	109.15	3.85	90.88	16.05

tran-Chlordane	8	104.85	4.47	96	8.2	84.5	12.75
	50	74.49	9.07	104.16	11.81	102.2	6.42
	100	79.82	12.64	106.19	3.7	94.05	8.15
Dieldrin	8	94.1	9.27	84.46	11.04	73.22	5.05
	50	78.56	7.91	109.18	10.37	110.04	3.23
	100	91.68	15.85	117.38	1.29	103.66	2.12
Endosulfan sulfate	8	97.05	3.43	88.82	14.91	85.9	10.46
	50	99.24	13.14	87.6	18.04	105.3	9.6
	100	97.61	16.91	106.29	15.62	109.25	4.99
Endrin	8	117.45	1.01	107.86	4.84	87.98	7.86
	50	105.66	12.04	90.89	15.43	103.26	10.46
	100	96.99	17.09	103.68	15.9	109.42	6.1
alpha-HCH	8	92.78	7.23	79.06	13.27	82.95	11.86
	50	103.7	13.69	95.48	17.53	113.96	4.9
	100	97.29	19.62	110	4.95	107.87	3.75
beta-HCH	8	97.95	8.45	77.57	16.98	80.98	10.73
	50	104.44	11.76	95.74	15.79	105.16	7.38
	100	96.09	16.96	114.72	2.67	113.58	2.32
delta-HCH	8	96.2	10.91	92.45	9.24	79.95	9.96
	50	104.78	12.41	99.3	14.94	105.02	9.14
	100	100.87	16.78	113.26	3.01	114.05	2.97
gamma-HCH	8	90.7	8.09	77.95	13.17	84.66	10.66
	50	104	13.62	92.02	17.17	111.3	2.5
	100	91.15	10.65	111.83	7.62	109.66	3.8
Heptachlor	8	114	4.47	94.2	19.92	99.4	6.63
	50	103.37	13.79	91.99	14.64	111.72	2.86
	100	99.39	17.78	106.7	5.24	99.48	7.31
Heptachlor epoxide	8	115.5	2.96	107.98	7.09	87.78	9.44
	50	74.76	7.12	109.64	10.26	112.74	4.05
	100	80.08	13.5	96.67	15.94	106.7	8.26

5.4 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity

5.4.1 จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ reagent blank และ sample blank พบว่า ไม่พบสัญญาณเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ fortified sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานกลุ่ม PCBs และ OCPs และไม่พบ Retention time ตรงกับของสารที่สนใจแสดงว่า ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน matrix ของ sample ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลการทดสอบ Selectivity และ Specificity ของสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ; (a): reagent blank, (b): sample blank และ (c): fortified sample

6. สรุปผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ โดยเทคนิค GC-MS/MS พบว่า ผลการทดสอบ linearity และ working range โดยการทดสอบ fortified sample ของสารกลุ่ม PCBs ที่ระดับความเข้มข้น 5 (LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสารกลุ่ม OCPs ที่ระดับความเข้มข้น 8 (LOQ), 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยค่า coefficient of determination (r^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 มีค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่า limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 5 และ 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับมีค่าความแม่นและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน SANTE/11312/2021 v2026 (European Commission, 2026)

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้แสดงว่ามีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับทดสอบสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ในอาหารสัตว์ ที่ช่วงความเข้มข้น 5 - 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นและเที่ยงยิ่งขึ้น และควรให้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารในสารกลุ่ม PCBs และ OCPs ตัวอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อเป็นการเฝ้าระวังสารปนเปื้อนในระบบการผลิตสินค้าปศุสัตว์ต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายจิรภัทร อินทร์สุข ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และกลุ่มบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ ที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุอุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารตกค้าง) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

Matiur Rahman, Md. Sazedul Hoque, Shuva Bhowmilk, Shahnila Ferdousi, Meera Probha Kabiraz, Martin L. van Brakel. Monitoring of pesticide residues from fish feed, fish and vegetables in Bangladesh by GC-MS using the QuEChERS method. Heliyon7, 2021.

European Commission. 2026. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE 11312/2021 v2026). Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2026

EURACHEM Guide. 2025. The Fitness for Purpose of Analytical Method A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd edition

U.S. Food and Drug Administration (2023) Methods, method verification and validation, laboratory manual, ORA laboratory procedure, volume II, ORA-LAB.5.4.5.

Marija Sedak, Bruno Calopek, Ivana Kmeti, Teuta Murati, Darija Vratari and Nina Bilandzic. Distribution of Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Food of Animal Origin in Croatia. Foods 2024, 13, 528.

Leila Peivasteh-roudsari, Raziyeh Barzegar-bafrouei, Kurush Aghbolagh Sharifi, Shamime Azimisalim, Marziyeh Karami, Solmaz Abedinzadeh. Origin, dietary exposure, and toxicity of endocrine-disrupting food chemical contaminants: A comprehensive review., L. Peivasteh-roudsari et al, Heliyon 9 (2023).

สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, สารกำจัดแมลงและศัตรูพืช กลุ่มออรกาโนคลอรีน (Organochlorine), 2012.