

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ด้วยวิธี gas chromatography-tandem mass spectrometry

วิภาดา สิริสมภพชัย^{1*} สราวุธ ชูกระชั้น²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์จำนวน 14 ชนิด ในไขมันสัตว์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS โดยได้ดำเนินการเปรียบเทียบประสิทธิภาพขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ระหว่างวิธี liquid-liquid extraction กับวิธี QuEChERS ผลการศึกษานี้พบว่าวิธี QuEChERS ที่ทำการสกัดตัวอย่างด้วยอะซีโตนไตรล์ที่อิ่มตัวด้วย n-hexane และผ่านการ freezing out เพื่อตกตะกอนไขมันด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที และทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ด้วย PSA 250 mg + C₁₈ 500 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + MgSO₄ 300 mg มีปริมาณไขมันคงเหลือกับผลรวมของพื้นที่ใต้พีคน้อยที่สุด โดยมีค่า recovery อยู่ในเกณฑ์ 70-120% และ RSD < 20% วิธี QuEChERS นี้มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็วกว่าวิธี liquid-liquid extraction จึงถูกเลือกไปพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ตามแนวทางของ SANTE/12682/2019 ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีพบว่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 1-2,000 µg/L ในตัวทำละลายและในเมทริกซ์ มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R²) มากกว่า 0.990 การประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์พบว่าสารไพรีทรอยด์ทุกชนิดในสารสกัดเมทริกซ์ให้สัญญาณสูงกว่าในตัวทำละลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 8 ชนิดสาร (cyfluthrin, cypermethrin, etofenprox, fenvalerate, fluvalinate, deltamethrin, tetramethrin และ flucythrinate) ที่มีค่าผลกระทบจากเมทริกซ์ตั้งแต่ 24.6-44.2% วิธีนี้ให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจหาเชิงปริมาณในแต่ละชนิดสารเท่ากับ 1 และ 5 µg/kg ตามลำดับ ผลการทดสอบที่ระดับปริมาณสารตกค้าง 5, 10, 100 และ 3,000 µg/kg มีความแม่นยำที่แสดงด้วยค่า %recovery ได้ค่าตั้งแต่ 80.3-118.4% ความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ที่แสดงด้วย %RSD_i มีค่าตั้งแต่ 0.6-14.2% และความเที่ยงแบบการทำซ้ำที่แสดงด้วย %RSD_j มีค่าตั้งแต่ 1.2-13.2% จากการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธี พบว่ามีค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ตั้งแต่ 7.6-34.5% ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่น้อยกว่า 50% วิธีวิเคราะห์ที่ได้พิสูจน์ความใช้ได้นี้มีความสอดคล้องกับเกณฑ์ SANTE/12682/2019 และสามารถนำไปตรวจสอบสารตกค้างสารกลุ่มไพรีทรอยด์ในตัวอย่างไขมันสัตว์ตามแผนผังการวัดสารตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ได้ตรงตามวัตถุประสงค์

คำสำคัญ : ไพรีทรอยด์ การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ไขมันสัตว์ GC-MS/MS

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0304-025

¹ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง ปทุมธานี 12000

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน ตำบลทิวัง อำเภอทุ่งสง นครศรีธรรมราช 80110

*ผู้รับผิดชอบ, E-mail : wipdld@yahoo.com

Method development and validation for the determination of pyrethroid pesticide residues in animal fat by gas chromatography-tandem mass spectrometry

Wiphada Sirisomphobchai^{1*} Sarawut Chookrachun²

Abstract

The aim of this study was to develop and validate analytical method of 14 pyrethroid residues in animal fat by GC-MS/MS. The efficiency of liquid-liquid extraction and QuEChERS method for sample extraction and purification was compared. The results of this study showed that the sample was extracted with acetonitrile saturated with n-hexane and precipitated fat by freezing out with centrifugation at 10,000 rpm, -20°C for 15 min, then purified with PSA 250 mg + C18 500 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + MgSO₄ 300 mg, had the lowest residual fat content and total of the peak area. Recovery was in the range of 70-120% and RSD <20% with the QuEChERS method. The results indicated that QuEChERS method was more efficiency, convenient and faster than the liquid-liquid extraction; therefore, the QuEChERS method was selected to be validated in accordance with the guidelines of SANTE/12682/2019. The linearities of all compounds with the coefficient of determination (R^2) more than 0.990 were demonstrated in the range of 1-2,000 µg/L in solvent and in matrix extract. All of the pesticides had higher sensitivity in matrix extract than in solvent. Especially 8 pesticides (cyfluthrin, cypermethrin, etofenprox, fenvalerate, fluvalinate, deltamethrin, tetramethrin and flucythrinate) had more signal matrix effect than in solvent about 24.6-44.2%. The limit of detection and the limit of quantitation of each analyte was 1 and 5 µg/kg, respectively. The mean recoveries at fortification levels (5, 10, 100 and 3,000 µg/kg) ranged from 80.3-118.4%, repeatability precision (RSD_r) ranged from 0.6-14.2% and intermediate precision (RSD_i) ranged from 1.2-13.2%. In addition, the relative expanded uncertainty ranged from 7.6-34.5%, which was in the ranged of the 50%. The results of validation met criteria of SANTE/12682/2019. This analytical method was applied to national residue monitoring program of Department of Livestock Development for detection and quantitation of pyrethroids pesticide residues in animal fat, which fulfils the objective of this study.

Keywords : pyrethroid, method development and validation, animal fat, GC-MS/MS

Registered No : 65(2)-0304-025

¹ Bureau of Quality Control of Livestock Products, Tivanont Road, Bangkadi, Muang, Pathumthani 12000

² Veterinary Research and Development Center (Upper Southern Region), Tiwang, Thungsong, Nakhonsithammarat 80110

*Correspondence author, E-mail : wipdld@yahoo.com

บทนำ

ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) เป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์เลียนแบบไพรีทรินส์ (pyrethrins) ใช้แพร่หลายในการป้องกันและกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูของพืชและสัตว์ (pesticides) เช่น กำจัดยุง แมลงตามบ้านเรือน แมลงวันคอกสัตว์ รวมทั้งการชุบเครื่องนอน เครื่องนุ่งห่มในพื้นที่ที่มีอากาศร้อนมาก มีการประยุกต์ใช้ในทางสัตวแพทย์ ได้แก่ หยอดหู เทราด ฟัน จุ่ม และยังใช้เป็นแชมพูเพื่อกำจัดเห็บ หมัด ไร ที่ตัวสัตว์ สารไพรีทรอยด์ไม่ดูดซึมได้ง่ายที่ผิวหนัง แต่ดูดซึมผ่านลำไส้และปอด ซึ่งการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายของสารเหล่านี้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร เช่น โดยสัตว์ทำความสะอาดซึ่งกันและกัน หรือโดยปนเปื้อนในอาหารสัตว์หรือน้ำประปา (Akre and MacNeil, 2006)

กรมปศุสัตว์ (2563) ได้มีการกำหนดบัญชีรายชื่อวัตถุอันตรายประเภทป้องกัน กำจัด ทำลาย ควบคุม แมลง หรือศัตรูของสัตว์ (ยกเว้นปรสิตรภายในตัวสัตว์) ซึ่งมีสารกลุ่มไพรีทรอยด์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เช่น bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, etofenprox, lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate เป็นต้น สารกลุ่มไพรีทรอยด์มีลักษณะโครงสร้างที่ไม่มีขั้ว ละลายได้ดีในไขมัน สามารถสะสมได้ในเนื้อเยื่อสัตว์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงร้ายแรงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้น จึงมีการกำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่สามารถมีได้ (maximum residue limits, MRL) ของสารกลุ่มนี้ในสินค้าปศุสัตว์ เช่น เนื้อ ตับ ไต ไข่ นม และไขมันสัตว์ เนื่องจากสารกลุ่มไพรีทรอยด์ละลายได้ดีในไขมัน ค่า MRL ในไขมันจึงสูงกว่าในเนื้อสัตว์ สามารถใช้เป็นข้อมูลการตรวจสอบการตกค้างในสินค้าเนื้อสัตว์ได้เช่นเดียวกัน กรมปศุสัตว์ (2549) ได้มีประกาศเรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์ กำหนดค่า MRL ในไขมันสัตว์ปีกและสุกรไว้ ได้แก่ cypermethrin, deltamethrin และ permethrin รวมทั้งระบุว่ากรณีประเทศผู้นำเข้าสินค้าปศุสัตว์ได้กำหนดมาตรฐานชนิดของสารตกค้างและปริมาณสารตกค้างที่แตกต่างจากประกาศฉบับนี้ ให้ถือตามมาตรฐานของประเทศผู้นำเข้านั้น ๆ สำหรับสหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบที่ EC 396/2005 (European Union, 2005) ซึ่งเป็นกฎหมายฉบับหลักที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดค่า MRL ของสารพิษตกค้าง (pesticide residues) แต่ละชนิดในสินค้าพืชและสัตว์ที่บังคับใช้ในสหภาพยุโรป และคณะกรรมการการยุโรปจะมีการปรับปรุงหรือกำหนดค่า MRL สารบางชนิดเพิ่มเติมออกมาและประกาศออกมาเป็นกฎระเบียบแทน นอกจากนี้ ได้กำหนดค่า MRL ของสาร pesticides ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active substances) และอนุญาตให้ใช้เป็นสารกำจัดปรสิตรภายนอกตัวสัตว์ไว้ในกฎระเบียบที่ EC 37/2010 (European Union, 2010) เช่น cyfluthrin, lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, permethrin ซึ่ง MRL ของบางสารจะมีค่าต่ำกว่าที่อ้างอิงของ EC 396/2005 ตัวอย่างการกำหนดค่า MRL สารกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ ดังตารางในภาคผนวก

เนื้อสัตว์ปีกของไทยเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญไปยังประเทศต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เป็นต้น โดยกรมปศุสัตว์เป็นหน่วยงานที่มีอำนาจในการกำกับ ดูแลและรับรองการส่งออกผลิตภัณฑ์สัตว์ไปยังประเทศคู่ค้า ซึ่งสหภาพยุโรปได้กำหนดให้ประเทศที่มีการส่งสินค้าเนื้อสัตว์ไปยังสหภาพยุโรปต้องมีการเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีที่มีในผลิตภัณฑ์ไว้ใน Council Directive 96/23/EC (European Union, 1996) สารกลุ่มไพรีทรอยด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่ถูกระบุอยู่ในกลุ่ม B2c ใน Council Directive 96/23/EC ที่ต้องมีการเฝ้าระวังในสินค้าเนื้อสัตว์ปีก สุกร โค กระบือ และห้องปฏิบัติการที่ทำการวิเคราะห์สารตกค้างต้องดำเนินการตามระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025

สารกลุ่มไพรีทรอยด์เป็นสารที่มีสภาพขั้วต่ำและสามารถระเหยกลายเป็นไอได้ จึงนิยมใช้เทคนิควิเคราะห์เพื่อแยกสารด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD) มาใช้ในการทดสอบ และสามารถตรวจยืนยันชนิดสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด mass spectrometer (MS) หรือใช้เครื่อง GC-Tandem Mass Spectrometer (MSⁿ) ที่สามารถวิเคราะห์และยืนยันผลได้ สารไพรีทรอยด์ตกค้างใน

ตัวอย่างประเภทไขมันสัตว์ ต้องมีขั้นตอนสกัดสารที่จะวิเคราะห์ (analyte) และขั้นตอนการ clean-up เพื่อให้สารที่สกัดได้สะอาดขึ้น มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาการวิเคราะห์สารกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ไว้ เช่น การสกัดสารไพรีทรอยด์ 8 ชนิด ในไขมันโคแบบ liquid-liquid extraction (LLE) และขจัดสิ่งรบกวนในสารละลายสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยมีการเปรียบเทียบวิธีขั้นตอนการสกัดและขจัดสิ่งรบกวนกับวิธีการทดสอบตาม USDA/FSIS แล้ววิเคราะห์สารด้วย GC-ECD พบว่าวิธี SPE ให้ผลวิเคราะห์ดีกว่า โดยได้ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of Detection, LOD) ตั้งแต่ 8-15 µg/kg และขีดจำกัดของการตรวจหาเชิงปริมาณ (limit of Quantitation, LOQ) ตั้งแต่ 20-50 µg/kg (Akre and MacNeil, 2006) การสกัดแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ด้วยการคลุกสาร florisil กับไขมันแล้วใส่ลงใน disposable column และ clean-up ร่วมกับ SPE ชนิด C18 ในลักษณะการต่อกันแบบ tandem SPE แล้ววิเคราะห์สารด้วย GC-ECD พบว่าได้ค่า detection limit ตั้งแต่ 3~181 µg/kg (Sun, et al., 2003) ซึ่งค่า LOD และ LOQ ของรายงานข้างต้นสูงกว่าค่า MRL ของสารบางชนิดในตารางของภาคผนวก และเทคนิค gel permeation chromatography (GPC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลขนาดต่างกันในสารละลาย เหมาะสมกับสารไม่มีขั้วและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น กลุ่มออร์แกโนคลอรีน แต่ไม่เหมาะสมกับสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง เช่น deltamethrin ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 505.21 g/mol เนื่องจากได้ถูกชะออกมาพร้อมกับไขมัน ทำให้ได้ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ตั้งแต่ 7-37% (Castillo, et al., 2011) ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์

วิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) เป็นเทคนิคการสกัดและ clean-up โดยใช้หลักการ dispersive solid phase extraction (dSPE) กับสารวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักผลไม้ที่มีความชื้นสูงและไขมันต่ำ (Anastassiades, et al., 2003) มีการดัดแปลงหรือปรับปรุงให้ใช้วิเคราะห์กับอาหารที่มีไขมันสูงด้วย รวมทั้งการวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้าง สารพิษจากเชื้อราในอาหารต่างๆ (Rejczak and Tuzimski, 2015) แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดกับเมทริกซ์ที่ซับซ้อน และการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีกับตัวตรวจวัดแบบดั้งเดิม เช่น ECD, NPD, FPD เป็นต้น (Rahman, et al., 2017) Castillo, et al. (2011) ได้ศึกษาการใช้ dSPE กับสารตัวอย่างไขมันสัตว์ พบว่าสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ที่วิเคราะห์จำนวน 4 ชนิด ได้ค่า %recovery ในช่วง 80-124% และมีพิศสารรบกวนในช่วงที่วิเคราะห์สาร cypermethrin, cyfluthrin และ permethrin ด้วย GC-MS ในโหมด selected ion monitoring (SIM) สารรบกวนเหล่านี้เป็น co-extractives lipid ที่มาจากขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ซึ่งจะต้องปรับปรุงวิธีเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำได้

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อให้ได้วิธีการเตรียมและวิเคราะห์สารกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ได้ที่เหมาะสม จึงดำเนินการศึกษา พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ด้วยวิธี GC-MS/MS ชนิด triple quadrupole โดยมีสารที่ใช้กำจัดปรสิตรภายนอกตัวสัตว์จำนวน 6 ชนิด ตามที่สหภาพยุโรปกำหนดใน EC 37/2010 (European Union, 2010) ได้แก่ สาร cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate และ permethrin และสารที่ใช้ป้องกันควบคุมกำจัดแมลง อีก 8 ชนิด ได้แก่ สาร bifenthrin, cyphenothrin, etofenprox, fenpropathrin, flucytrinate, tau-fluvalinate, phenothrin และ tetramethrin รวมเป็น 14 ชนิด เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้ครอบคลุมหรือเท่ากับค่า MRLs ของสหภาพยุโรปที่กำหนดไว้ดังแสดงไว้ที่ภาคผนวก โดยใช้ตัวอย่างไขมันไก่เป็นตัวแทนไขมันสัตว์ ในการพัฒนาวิธี ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี คือ วิธี LLE ที่สามารถสกัดสารที่ละลายได้ดีในไขมัน โดยดัดแปลงจากวิธี AOAC 970.52 (AOAC, 2019) กับวิธี QuEChERS ที่เป็นวิธีที่รวดเร็ว เมื่อได้วิธีการเตรียมตัวอย่างกับสถานะที่เหมาะสมของการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS/MS แล้ว นำไปพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ SANTE/12682/2019 โดยทดสอบพารามิเตอร์ ได้แก่ ความจำเพาะ (selectivity) ความเป็นเส้นตรง

ของกราฟมาตรฐาน ช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (working range) LOD, LOQ ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) และความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility หรือ intermediate precision) และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ และตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งานที่กำหนดไว้ วิธีที่พิสูจน์ความใช้ได้แล้วจะถูกนำไปใช้ในตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไขมันสัตว์สำหรับการเฝ้าระวังสารตกค้าง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ (Equipments)

เครื่อง GC-MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น TRACE 1310-TSQ 8000 Evo เครื่องลดปริมาตรสารละลายโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (N-Evap) เครื่องระเหยสารชนิด rotary vacuum evaporator เครื่องเขย่าแนวตั้ง เครื่องชั่งความละเอียด 0.00001 กรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐานและหาปริมาณไขมันคงเหลือ เครื่องชั่งความละเอียด 0.01/0.001 กรัม สำหรับชั่งสารเคมีและตัวอย่าง ตู้อบความร้อนเตาเผา อ่างน้ำร้อน เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน vortex mixer และ micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ 10-100, 20-200, 100-1000 และ 500- 5000 μL

2. สารเคมีและสารมาตรฐาน

ตัวทำละลายอินทรีย์ : acetonitrile (ACN, AR grade), ethyl acetate (AR grade), n-hexane (AR และ PR grade), iso-octane (for residue analysis) ยี่ห้อ RCI Labscan

ตัวดูดซับ (sorbents) :

- Z-sep และ Z-sep⁺ (plus) ยี่ห้อ Supelco
- Primary Secondary Amine (PSA) และ octadecylsilane (C18) ยี่ห้อ Vertical, magnesium sulfate (MgSO_4), anhydrous (AR grade) ยี่ห้อ RCI Labscan
- Florisil, 60-120 mesh for residues grade ยี่ห้อ J.T. Baker : เตรียมเป็น 1% deactivated florisil (DOF) โดย เพา florisil ที่อุณหภูมิ $650 \pm 20^\circ\text{C}$ เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง และเก็บไว้ใน desiccator จนกระทั่งอุณหภูมิของ florisil ลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง ชั่ง florisil ที่เย็นแล้ว ปริมาณ 99 กรัม ใส่ขวด เติมน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว 1 mL ปิดจุก เขย่านาน 15 นาที นำไป equilibrate ไว้ใน desiccator อย่างน้อย 12 ชั่วโมง หรือทิ้งค้างคืน และเขย่าอีกครั้งก่อนใช้งาน
- Sodium sulfate (Na_2SO_4), anhydrous granular, 10-60 mesh (AR grade) ยี่ห้อ Macron อบที่อุณหภูมิ $130 \pm 10^\circ\text{C}$ อย่างน้อย 16 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน

แก๊ส : ฮีเลียมและอาร์กอน ชนิด Ultra high Purity (UHP) ความบริสุทธิ์ 99.999% ใช้กับเครื่อง GC-MS/MS และแก๊สไนโตรเจนความบริสุทธิ์ 99.995% ใช้กับเครื่อง N-Evap

สารมาตรฐาน (standards) เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง : bifenthrin (Bifen), cyfluthrin (Cyflu), lambda-cyhalothrin (Cyha), cypermethrin (Cyper), cyphenothrin (Cyphe), cis-deltamethrin (Delta), etofenprox (Eto), fenpropathrin (Fenpro), fenvalerate (Fenva), flucythrinate (Flucy), tau-fluvalinate (Fluva), permethrin (Perme), phenothrin (Pheno) และ tetramethrin (Tetra) ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer สารทั้งหมดมีความบริสุทธิ์ระหว่าง 95.0 - 99.73%

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน : ชั่งน้ำหนักและละลายสารมาตรฐานบริสุทธิ์ในตัวทำละลาย iso-octane ความเข้มข้นประมาณ $400 \mu\text{g/mL}$ (กำหนดเป็น stock standard solution) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม 14 ชนิด ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/mL}$ ใน iso-octane โดยปิเปต stock standard solution แต่ละชนิด ประมาณ 120-500 μL จาก stock standard ลงในขวดวัดปริมาตร 5 mL เพื่อทำเป็น mixed intermediate standard

solution สารละลายที่เตรียมได้เก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C และเตรียม mixed working standard solution ก่อนใช้งาน ความเข้มข้น 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/L}$ ใน iso-octane และในสารสกัดตัวอย่างไขมัน (matrix extract) ปริมาตรอย่างละ 1 mL

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างไขมันสัตว์ ได้แก่ ไขมันไก่ ไขมันเป็ด ไขมันสุกร ไขมันโค ซึ่งบดสับให้ละเอียด ใส่ขวดแก้ววางในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งมีลักษณะเป็นน้ำมัน คูดใส่ขวดแก้วขนาดเล็กและเก็บรักษาไขมันที่ได้จากการหลอมไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -5°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-MS/MS

ทดสอบหาสภาวะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS เพื่อให้เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไพรีทรอยด์ 14 ชนิด โดยใช้เครื่อง GC ที่มีส่วนฉีดสารตัวอย่าง (injector) ชนิด splitless และ capillary column ชนิด DB – 5MS UI เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์มเคลือบ 0.25 ไมโครเมตร ซึ่งต่อกับ guard column ยาว 5 เมตร เครื่อง MS ที่มีแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) เป็นชนิด electron ionization (EI) และมีส่วนแยกมวล (mass analyzer) เป็นชนิด triple quadrupole ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ เช่น อัตราการไหล (flow rate) ของแก๊สฮีเลียมความบริสุทธิ์ 99.999% ที่ถูกใช้เป็นแก๊สพา (carrier gas) สารเข้าสู่คอลัมน์ อุณหภูมิของ GC oven เพื่อให้สารที่วิเคราะห์แยกกันได้ดีที่สุด อุณหภูมิ injection port, transfer line และ ion source โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มไพรีทรอยด์ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/L}$ ใน iso-octane ปริมาตร 1 μL เข้าเครื่อง GC-MS/MS ในโหมด full scan (100-550 m/z)

เมื่อได้สภาวะของเครื่อง GC-MS/MS ที่เหมาะสมเรียบร้อยแล้ว ตรวจสอบเวลาที่สารถูกชะและแยกออกจาก GC column (retention time, RT) ของสารแต่ละชนิดโดยการเปรียบเทียบ mass spectrum กับฐานข้อมูล NIST Library และเลือกไอออนที่จะใช้เป็นไอออนของสารตั้งต้น (precursor ion, PI) ในการแตกตัวรอบที่สอง (MS^2)

ทำการหา product ions หรือ transition ions ที่ให้ขนาดสัญญาณ (intensity) ของ product ions สูงสุดอย่างน้อย 3 ion จาก PI ที่เลือกไว้ โดยปรับตั้งค่า CE ในช่วง 5-50 eV แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มไพรีทรอยด์ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/L}$ ในโหมด product ion scan เมื่อได้ข้อมูลแล้วจึงเลือกค่า CE ที่เหมาะสมสำหรับสารแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4.2 การหาค่า Instrument detection limit (IDL)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มไพรีทรอยด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 $\mu\text{g/L}$ ใน iso-octane และในเมทริกซ์ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/L}$ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC-MS/MS ตรวจสอบค่าสัญญาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลของเครื่อง GC-MS/MS กำหนดเกณฑ์ยอมรับของ $\text{S/N} \geq 3$

4.3 การพัฒนาวิธีการสกัดและการ clean-up

4.3.1 วิธีที่ 1 liquid-liquid extraction (LLE)

การสกัด

เติมไขมันไก่ที่เป็น sample blank (SB) ที่ได้จากการหลอม 1 กรัม ใส่ในกรวยแยกขนาด 250 mL จำนวน 6 ใบ กำหนด 3 ใบแรก เป็น SB1-SB3 ใบที่ 4-6 เป็น spiked fat (SP1-SP3) โดยเติมสารมาตรฐานไพรีทรอยด์ผสมลงไปในการแยกให้มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/kg}$ ในไขมัน แล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ

5 นาที ทำการสกัดไขมันในกรวยแยกด้วย n-hexane (AR grade) ปริมาตร 50 mL เขย่าให้ไขมันละลายใน n-hexane เติม ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane ปริมาตร 25 mL ปิดจุกเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง เป็นเวลา 2 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นนานอย่างน้อย 10 นาที ถ่ายสารที่สกัดได้ในชั้นล่าง (ชั้น ACN) ใส่ใน round bottom flask (RBF) สกัดซ้ำด้วย ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane ปริมาตร 25 mL อีก 2 ครั้ง ระเหยสารในขวด RBF ในเครื่อง rotary vacuum evaporator ให้เหลือสารสกัดประมาณ 3 mL

- ตัวอย่าง SB1 ถ่ายสารและชะภายในขวดด้วย ACN ใส่ในหลอดแก้วที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ได้จากอบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเมื่อหลอดเย็นแล้ว) และระเหยสารในหลอดด้วยเครื่อง N-Evap ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40°C จนแห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นลง ชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณไขมันที่เหลืออยู่

- ตัวอย่าง SB2, SB3, SP1-SP3 ถ่ายสารและชะภายในขวดด้วย ACN ใส่ในหลอดแก้ว ระเหยสารในหลอดด้วยเครื่อง N-Evap ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40°C จนเกือบแห้ง เติมน้ำ n-hexane (PR grade) 1 mL ให้ได้ปริมาตร 1 mL แล้ว vortex นำไปทำการ clean-up

การ Clean-up

ถ่ายสารสกัด SB2, SB3 และ SP3-SP5 ลงใน florisil glass column โดยแต่ละคอลัมน์มี 1% DOF ประมาณ 8 กรัม และ Na₂SO₄ ที่ด้านล่างและด้านบนของ florisil ด้านละ 0.5 กรัม แล้วชะสารใน tube ด้วย ethyl acetate : n-hexane, PR grade (50:50) ปริมาตร 5 mL vortex และเทลง column ชะซ้ำและถ่ายใส่ column อีกครั้ง แล้วปล่อยให้สารไหลออกลงสู่หลอดแก้วสะอาดที่วางรองรับสารใต้คอลัมน์ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง N-Evap

- หลอด SB2 หาปริมาณไขมันคงเหลือเช่นเดียวกับ SB1
- หลอด SB3, SP1-SP3 ปรับปริมาตรด้วย iso-octane ปริมาตร 2 mL นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS ด้วยโหมด full scan และในโหมด selected reaction monitoring (SRM) เพื่อทดสอบสารรบกวนที่เหลือจากการ clean-up และค่า %recovery

4.3.2 วิธี 2 QuEChERS

4.3.2.1 ศึกษาวิธีสกัดกับการทำให้ตกตะกอนไขมันด้วยวิธี freezing out

(1) เตรียมตัวอย่างและตัวทำละลายสกัดใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL จำนวน 4 ชุด ๆ ละ 3 หลอด ดังนี้

- ชุดสกัดที่ 1 ไขมัน 1 กรัม เติมน้ำ 1% DOF 5 กรัม คนให้เข้ากัน และสกัดด้วย ACN ปริมาตร 20 mL (แบบที่ 1)
- ชุดสกัดที่ 2 ไขมัน 1 กรัม เติมน้ำ 1% DOF 5 กรัม คนให้เข้ากัน และสกัดด้วย ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane ปริมาตร 20 mL (แบบที่ 2)
- ชุดสกัดที่ 3 ไขมัน 1 กรัม สกัดด้วย ACN ปริมาตร 20 mL (แบบที่ 3)
- ชุดสกัดที่ 4 ไขมัน 1 กรัม สกัดด้วย ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane ปริมาตร 20 mL (แบบที่ 4)

(2) เขย่าผสมไขมันกับตัวทำละลายให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 1 นาที แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าแนวตั้ง นาน 5 นาที แต่ละชุดวิธีสกัดจะถูกทดสอบการทำให้ตกตะกอนไขมันด้วยวิธี freezing out ดังนี้

- (a) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี A)
- (b) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเข้าตู้แช่ที่อุณหภูมิ -25°C เป็นเวลา 1 คืน (วิธี B)

(c) นำเข้าตู้แช่ที่อุณหภูมิ -25°C เป็นเวลา 1 คืน และนำออกมาปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี C)

(3) เทส่วนใสที่ได้จากการทำ freezing out ใส่หลอดแก้ว ระบายแห้ง นำไปหาปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ วิธีการเช่นเดียวกับวิธี LLE

4.3.2.2 ศึกษาวิธีการ clean-up ด้วยการใช dSPE

(1) ชั่งตัวอย่างไขมันใส่ centrifuge tube ขนาด 50 mL จำนวน 8 ชุด แต่ละชุดประกอบ SB 2 หลอด (SB1, SB2) และ SP 3 หลอด (SP1-SP3) เติมสารมาตรฐานไพรีทรอยด์ผสม 14 ชนิด ให้มีปริมาณ $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ ในหลอด SP แล้ว vortex 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนนำไปทำการสกัดและ freezing out กับวิธีในข้อ 4.3.2.1(1) – 4.3.2.1(2) ที่มีปริมาณไขมันเหลือน้อยที่สุด

(2) ปิเปตส่วนใสที่ได้จากการ freezing out ปริมาตร 10 mL ใส่ในหลอดที่มี dSPE ดังนี้

- PSA 400 mg + C_{18} 400 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 125 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 125 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + C_{18} 125 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 125 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + C_{18} 250 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 125 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + C_{18} 500 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 250 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + C_{18} 500 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 500 mg + Z-Sep⁺ 500 mg + C_{18} 500 mg + MgSO_4 300 mg
- PSA 500 mg + Z-Sep 500 mg + C_{18} 500 mg + MgSO_4 300 mg

(3) หลังจากนั้น เขย่าแรงๆ ประมาณ 1 นาที ด้วย vortex mixer แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 15 นาที

- ปิเปตส่วนใสของหลอด SB1 ปริมาตร 10 mL ใส่ในหลอดแก้วที่ทราบน้ำหนักนำไปหาปริมาณไขมันคงเหลือ

- ปิเปตส่วนใสของหลอด SB2, SP1-SP3 ปริมาตร 10 mL ใส่ในหลอดใหม่ ระบายจนแห้งด้วยเครื่อง N-Evap ปรับปริมาตรด้วย iso-octane ปริมาตร 1 mL และนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS ด้วยโหมด full scan และ SRM เพื่อทดสอบสารตกค้างที่เหลือจากการ clean-up และค่า %recovery

4.3.3 ตรวจสอบปริมาณไขมันคงเหลือ

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

4.3.4 ตรวจสอบค่า %recovery และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ของการทดสอบ spiked sample โดยที่

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

เมื่อ CF = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ใน spiked sample (conc found)

CU = ความเข้มข้นของสารใน sample blank (conc unspiked)

CA = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป sample blank (conc added)

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

4.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพการสกัดกับการทำให้บริสุทธิ์กับไขมันชนิดต่างๆ

ทำการสกัดตัวอย่างไขมันไก่ ไขมันเป็ด ไขมันสุกร ไขมันโคกับวิธีสกัดและ clean-up ที่มีปริมาณไขมันคงเหลือน้อยที่สุด เปรียบเทียบปริมาณไขมันคงเหลือในขั้นตอนสุดท้ายจากลักษณะ interference ของไขมันแต่ละชนิด

5. การพิสูจน์ความใช้ได้วิธี

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ตามเกณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการยืนยันประสิทธิภาพของวิธีโดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

5.1 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

วิเคราะห์ method blank กับ sample blank เทียบกับสารมาตรฐานไพรีทรอยด์ 14 ชนิด เพื่อตรวจสอบการรบกวน โดยพิจารณาสัญญาณสารที่ปรากฏใน sample blank ที่มี retention time (RT) กับมวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับพีคสารที่วิเคราะห์ในสารมาตรฐานไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ถ้าปรากฏว่ามีใน sample blank จะต้องน้อยกว่า 30 % ของสัญญาณสารใน spiked sample ที่ระดับ LOQ

5.2 การตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) และช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (Linearity of calibration curve)

ฉีดสารมาตรฐานไพรีทรอยด์ในตัวทำละลายกับในสารสกัดไขมันสัตว์ (เมทริกซ์) จำนวน 11 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 และ 2000 µg/L ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC-MS/MS เมื่อได้ผลทดสอบ สร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิดโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีค ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($y = mx + c$) และ ประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) กำหนดเกณฑ์การยอมรับของค่า $R^2 \geq 0.990$ แล้วทำการเปรียบเทียบและประเมิน %matrix effect (ME) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย ซึ่งค่าการยอมรับไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE/12682/2019)

$$\%ME = \left(\frac{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย}} - 1 \right) \times 100$$

5.3 การทดสอบ Limit of Detection (LOD) & Limit of Quantitation (LOQ)

หาค่า LOD และ LOQ โดยประมาณด้วยการวิเคราะห์ spiked fat sample ที่เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างไขมันให้มีความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 5 ซ้ำ แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS และหาค่าความเข้มข้นเทียบกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นใน spiked fat sample ที่วิเคราะห์ได้ และค่า LOD และค่า LOQ จากสูตรตามแนวทาง Eurachem (Magnusson and Örnemark, 2014)

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

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

n = จำนวนซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบในงานประจำ ($n = 1$)

เมื่อได้ค่า LOD และ LOQ โดยประมาณแล้ว วิเคราะห์ spiked fat sample ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เพื่อเป็นการยืนยันค่า LOD และ LOQ โดยแต่ละความเข้มข้นทดสอบภายในวันเดียวกัน

- คำนวณค่า S/N กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่า LOD ที่ความเข้มข้นให้ค่า $S/N \geq 3$ และค่า LOQ ที่ความเข้มข้นให้ค่า $S/N \geq 10$
- คำนวณค่าเฉลี่ย ค่า SD ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความเข้มข้นที่วัดได้ ค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, MR) ของความเข้มข้นที่ LOQ โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับ %MR อยู่ในช่วง 70-120% ค่า RSD มีค่า $\leq 20\%$

5.4 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำการสกัด spiked fat sample 4 ความเข้มข้น ที่ระดับ LOQ, 2xLOQ, 100 และ 3,000 $\mu\text{g/kg}$ ความเข้มข้นละ 2 ชุด แต่ละชุดทำต่างวันกัน วิเคราะห์ spiked fat sample ด้วยเครื่อง GC-MS/MS เทียบกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ที่ครอบคลุมกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในสารสกัดตัวอย่าง

- ประเมินความแม่นยำและความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability precision) โดยคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ค่า SD และค่า %RSD_r และค่า %MR ของความเข้มข้นใน spiked fat sample แต่ละชุด/ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ เกณฑ์ยอมรับ %recovery และ %RSD_r เช่นเดียวกับค่า LOQ
- ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (intermediate precision) โดยคำนวณค่าเฉลี่ย ค่า SD และค่า %RSD_i ของ spiked fat sample ทั้ง 2 ชุดในแต่ละความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ เกณฑ์ยอมรับความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ จากค่า %RSD_i $\leq 20\%$

5.5 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Working range)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ โดยการวิเคราะห์ spiked fat sample ที่ความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 3,000 $\mu\text{g/kg}$ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีค (แกน y) คำนวณหาค่า R^2 กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่า $R^2 \geq 0.990$

5.6 การทดสอบความคงตัว (Stability)

ทดสอบสารละลาย spiked fat sample ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/kg}$ ซ้ำ หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18°C เป็นเวลา 7 วัน กับกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ ตรวจสอบค่า %MR และ %RSD_r กำหนดเกณฑ์ยอมรับ %MR อยู่ในช่วง 70-120% ค่า RSD_r มีค่า $\leq 20\%$

5.7 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการวิเคราะห์สารกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ที่ระดับ LOQ โดยใช้วิธีการของ EURACHEM (2014) ซึ่งคำนวณรวมจากทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน แล้วคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U_E) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) = 2 ประเมินค่าความไม่แน่นอนในรูป relative expanded uncertainty (%RU)

$$\%RU = \frac{\text{ค่าความไม่แน่นอนขยาย}}{\text{ปริมาณที่ทดสอบได้ใน spiked sample (LOQ)}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ตัวอย่างไขมันไก่ 10 ตัวอย่าง ไขมันเป็ด 3 ตัวอย่าง และไขมันสุกร 5 ตัวอย่าง ของกิจกรรมเฝ้าระวังสารตกค้าง และไขมันโค 2 ตัวอย่าง ที่ได้ซื้อจากตลาดสดในเขตจังหวัดปทุมธานี รวม 20 ตัวอย่าง ซึ่งในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ทำการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ภายในด้วย spiked sample ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 2 ซ้ำ sample blank, method blank อย่างละ 1 ซ้ำ และ duplicate sample 10% ของจำนวนตัวอย่างทดสอบ ตรวจสอบ %recovery ของ spiked sample ต้องอยู่ในเกณฑ์ 70-120% และ %relative percent difference (RPD) ของการทำซ้ำ ไม่เกิน 20% กรณีที่พบสารที่สงสัยว่าเป็นสารตกค้างที่วิเคราะห์ ทำการยืนยันชนิดสารที่พบด้วย ion intensities ratio (IR) ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัวใน อยู่ในช่วง ±30% ของ IR เฉลี่ยของสารมาตรฐานตามเกณฑ์ SANTE/12682/2019

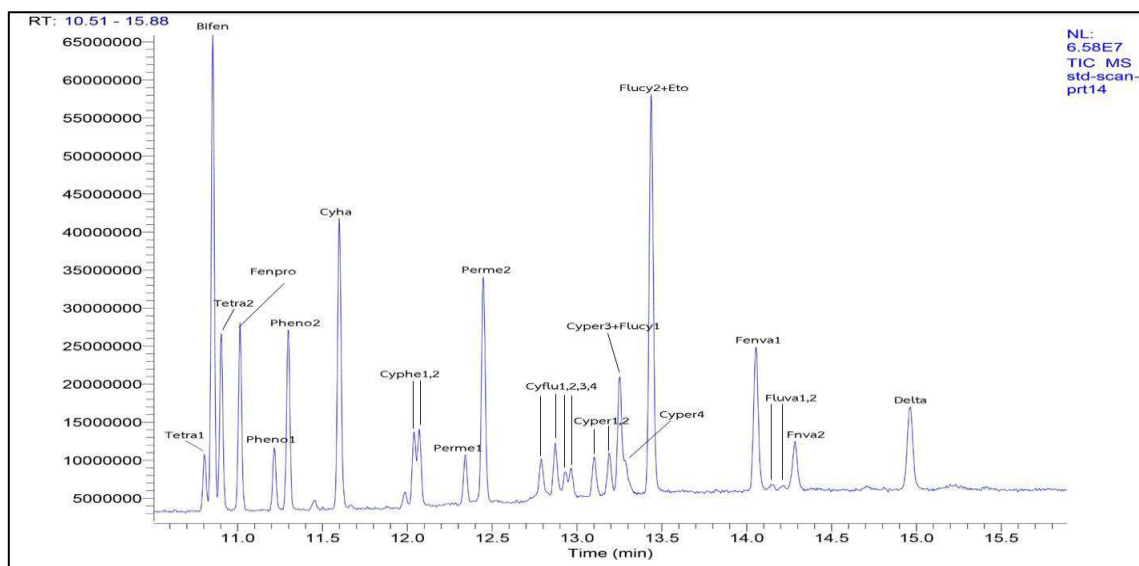
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-MS/MS

เครื่อง GC-MS/MS triple quadrupole ได้ถูกทดสอบหาสภาวะเพื่อวิเคราะห์สารในกลุ่มไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้น 1000 µg/L เข้าสู่ capillary GC column ชนิด DB-5MS UI ที่มี stationary phase เป็น 5% Phenyl-Methylpolysiloxane และสามารถใช้งานที่อุณหภูมิสูงถึง 325 -350°C เลือกแหล่งกำเนิดไอออนชนิด EI เพื่อให้สารแตกตัวเป็นไอออนในโหมด full scan ในช่วง 100-500 m/z เพื่อให้ได้ RT และเลือกไอออนของสารตั้งต้น (precursor ion, PI) ของแต่ละสารที่มีสัญญาณสูงสุด ซึ่งจากการทดลองได้โปรแกรมอุณหภูมิของ GC oven สำหรับแยกสารที่ดีที่สุด โดยเริ่มต้นที่ 100 °C (นาน 0.50 นาที) แล้วเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 20.0°C/min เป็น 280°C (นาน 1.50 นาที) และอัตรา 10°C/min ขึ้นเป็น 300°C (นาน 3 นาที) อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียมสำหรับการพาสารเข้าสู่คอลัมน์เพื่อการแยกสารคือ 1.0 mL/min อุณหภูมิ injection port 290°C, transfer line 290°C และ ion source 250°C การตั้งอุณหภูมิของ transfer line และ ion source จะใกล้เคียงกันกับอุณหภูมิระดับสุดท้ายที่สูงสุดของ GC oven เพื่อเป็นการป้องกันโอเวอร์เฮาส์ที่เคลื่อนออกมาจากคอลัมน์แยกสารผ่านเข้าสู่ส่วนของ MS ควบแน่นกลายเป็นของเหลว ทำให้ความไวของเครื่องลดลงและลักษณะของพีคสารที่ได้มีหางพีคเกิดขึ้น จากสภาวะส่วนนี้ สารไพรีทรอยด์แต่ละชนิดจะถูกชะออกจาก column มีลักษณะการแยกของพีคสารในโหมด full scan ดังภาพที่ 1 และได้ตรวจสอบ m/z จาก NIST Library พบว่าการแยกสารกลุ่มไพรีทรอยด์ด้วยสภาวะข้างต้น มีสาร cypermethrin isomer 3 กับ flucythrinate isomer 1 และ etofenprox กับ flucytrinate isomer 2 ถูกชะออกออกจากคอลัมน์ที่ RT เดียวกัน แต่สามารถระบุแยกชนิดสารออกจากกันได้ด้วย MS เนื่องจากสารที่มี RT เดียวกัน แต่มีค่า m/z ที่แตกต่างกัน จึงได้เลือก PI ของสารไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ที่มีสัญญาณสูงสุดเพื่อนำไปกำหนดหา product ions

การหา product ions ที่ให้ความเข้มสูงสุดอย่างน้อย 3 ไอออนกับค่า CE ที่เหมาะสมในโหมด product ion scan เพื่อกำหนด product ion ตัวที่ความเข้มสูงสุดเป็น quantifier สำหรับหาปริมาณสาร และตัวที่มีความเข้มรองมาจะเป็น qualifier ใช้สำหรับการยืนยันชนิดสาร ซึ่งจากการตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งในโหมด fullscan และ product ion scan ได้กำหนดเวลาที่ใช้หน่วงให้ตัวทำละลายออกก่อนทำการสแกนไอออน (solvent delay) คือ 90 วินาที และความดันของแก๊สอาร์กอนสำหรับพลังงานการชน คือ 50 psi ซึ่งจากการทดลองได้เวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์ ค่ามวลต่อประจุของ PI, product ions และค่า CE ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานสารไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 1000 µg/L ใน iso-octane ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS (triple quadrupole)

ตารางที่ 2 Retention time (RT) และค่า Mass transition สำหรับสารไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS (Triple Quadrupole)

Pesticides	RT (min)	Quantification transition (CE; V)	Confirmation transition 1 (CE; V)	Confirmation transition 2 (CE; V)
Bifenthrin	10.86	181>165.9 (10)	165.1>163.6 (24)	181>179 (12)
Tetramethrin 1, 2	10.82, 10.92	164>107.1 (12)	164>77.1 (24)	164>135.1 (8)
Fenpropathrin	11.03	265>181 (25)	265>152 (35)	265>210 (10)
Phenothrin	11.23, 11.31	183>128 (20)	183>153.3 (20)	183>168.1 (20)
Cyhalothrin	11.42, 11.61	207.9>180.9 (8)	180.9>152 (22)	197.1>141.1 (10)
Cyphenothrin 1, 2	12.05, 12.08	181>152 (20)	123>81 (8)	181>127 (20)
Permethrin 1	12.36	183>153 (12)	163>91.1 (12)	183.1>168 (12)
Permethrin 2	12.46	183>153 (12)	183>165.1 (10)	183.1>168 (10)
Cyfluthrin 1	12.81	163>127.1 (6)	163>91.1 (12)	163>65.1 (26)
Cyfluthrin 2	12.89	163>127.1 (6)	163>91.1 (12)	206>151.1 (12)
Cyfluthrin 3	12.95	163>127.1 (6)	163>91.1 (12)	226>206.1 (12)
Cyfluthrin 4	12.98	163>127.1 (6)	163>91.1 (12)	226>206.1 (12)
Cypermethrin 1, 2, 3, 4	13.12, 13.21, 13.28, 13.30	163>127 (10)	181>127 (25)	181>152 (25)
Flucytrinate 1, 2	13.27, 13.46	199.1>107.1 (22)	157>107 (12)	199.1>157.1 (18)
Etofenprox	13.45	163.1>135.1 (10)	163.1>107.1 (16)	163.1>77.1 (32)
Fenvalerate 1	14.08	167>125 (10)	125>89.3 (20)	225.1>119.1 (18)
Fenvalerate 2	14.31	167>125 (10)	125>89.3 (20)	167>89 (32)
Fluvalinate 1, 2	14.17, 14.24	250>199.9 (18)	185>152.1 (22)	250>55.1 (16)
Deltamethrin	14.99	252.8>92.9 (16)	181>152.1 (22)	252.8>172 (2)

1.2 ค่า Instrument detection limit (IDL)

พบว่า S/N เฉลี่ยของสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้น 0.5, 1 µg/L และในเมทริกซ์ที่มีความเข้มข้น 1 µg/L มีค่ามากกว่าเกณฑ์ที่กำหนด (≥ 3) ดังตารางที่ 3 ความเข้มข้นข้างต้นสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความไวของเครื่องวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้ ยังสามารถกำหนดให้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน (lowest calibration level, LCL) ได้ เนื่องจากมี S/N มากกว่า 10 เหมาะสมสำหรับการศึกษาค่า LOQ ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดที่ใช้ในการรายงานผลทดสอบเชิงปริมาณ

ตารางที่ 3 ค่า Signal to noise (S/N) ที่ระดับ Instrument detection limit (IDL) ของเครื่อง GC-MS/MS ที่ตรวจวัดสารกลุ่ม Pyrethroid

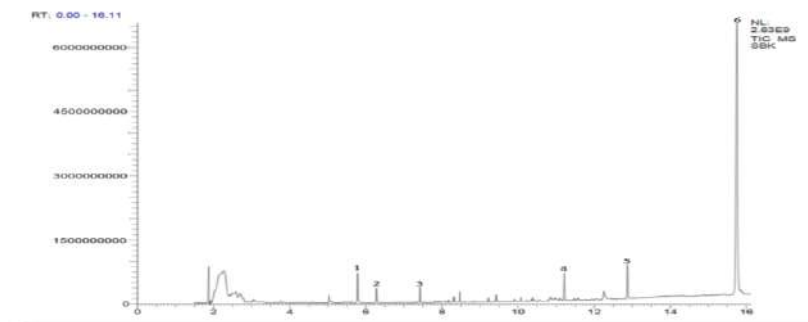
Pesticides	Mean S/N		
	Standard solvent	Standard solvent	Standard matrix
	0.5 µg/L (n = 3)	1 µg/L (n = 3)	1 µg/L (n = 3)
Bifenthrin	13.11	26.92	964.73
Tetramethrin	102.72	147.42	226.31
Fenpropathrin	100.62	137.92	299.79
Phenothrin	59.06	80.46	409.01
lambda-Cyhalothrin	239.11	378.02	962.98
Cyphenothrin	46.15	56.87	449.67
Permethrin	116.23	148.99	209.8
Cyfluthrin	27.59	39.31	456.06
Cypermethrin	45.98	85.15	401.68
Flucythrinate	123.52	162.38	9605.55
Etofenprox	205.45	367.21	469.23
Fenvalerate	192.45	204.30	1623.95
Fluvalinate	90.59	129.59	257.97
Deltamethrin	113.30	173.91	1314.47

2. การพัฒนาวิธีการสกัดและ clean-up

2.1 วิธี LLE

พบว่าการใช้ตัวทำละลาย n-hexane สามารถกำจัดแยกไขมันออกไปจากชั้น ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane ได้ดีและการ clean-up ด้วย florisil column โดยใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate : n-hexane (50:50) จะสารไพรีทรอยด์ ออกจาก column และกำจัดไขมันออกไปได้เพิ่มขึ้น ซึ่งมีปริมาณไขมันคงเหลือก่อนและหลังผ่าน florisil column 1.6% (SB1) และ 0.5% (SB2) และ %MR (SP1-SP3) ได้อยู่ในช่วง 82.6% (fluvalinate) – 92.4 (deltamethrin) และ %RSD อยู่ในช่วง 6.3-8.8 %

สำหรับการทดสอบ SB3 ด้วยโหมด full scan พบ interference peak ค่อนข้างมาก ในช่วงต้นของโครมาโทแกรมกับพีคที่สูงมากในเวลา 15.70 นาที ดังภาพที่ 2 เมื่อเทียบกับ RT ของโครมาโทแกรมสารกลุ่มไพรีทรอยด์แล้ว พบพีคสารที่ RT 12.2-12.3 นาที ซึ่งทับกับ RT ของสาร cypermethrin แต่มีมวลต่อประจุไม่เหมือนกัน เมื่อตรวจสอบกับฐานข้อมูลใน NIST library พบว่าพีคสารส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันเอสเทอร์ และพีคสารที่ RT 15.70 นาที คือสารคลอเรสเตอรอล



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ sample blank ชนิดไขมันไก่ที่สกัดวิธี LLE

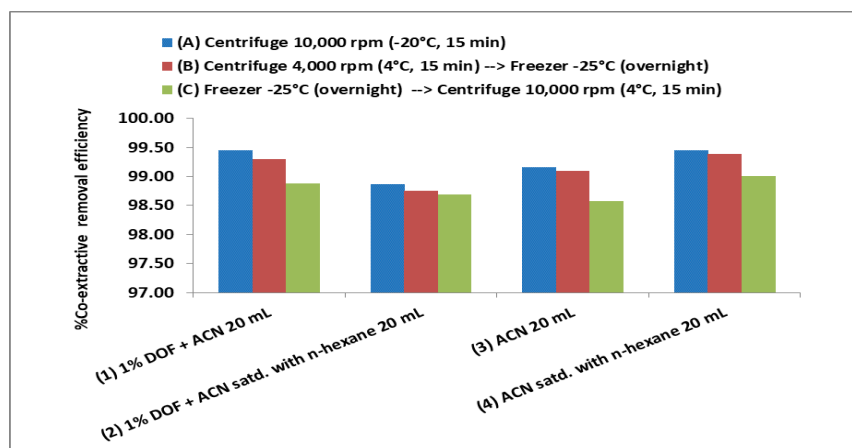
2.2 วิธี QuEChERS

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS กับเทคนิคการตกตะกอนไขมัน พบว่า วิธีการสกัดเพื่อกำจัดไขมัน แบบที่ 1 ด้วยการเติม 1% DOF และสกัดด้วย ACN กับแบบที่ 4 สกัดด้วย ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane แล้วนำไปตกตะกอนไขมันด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี A) มีปริมาณไขมันไม่แตกต่างกันและเหลือน้อยกว่าวิธีสกัดแบบที่ 2 ที่เติมสาร 1% DOF และสกัดด้วย ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane และแบบที่ 3 สกัดด้วย ACN แล้วนำไปตกตะกอนไขมันด้วยการนำเข้าสู่ตู้แช่ที่อุณหภูมิ -25°C เป็นเวลา 1 คืน และนำออกมาปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี C) ซึ่งการสกัดแบบที่ 3 และตกตะกอนไขมันวิธี C นี้มีปริมาณไขมันเหลือมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่เหลือจากวิธี freezing out 3 วิธี พบว่า วิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี A) นั้น ไขมันได้ตกตะกอนจับกันแน่น สามารถแยกชั้นและเทสารสกัดใส่ในหลอดสะอาดได้ดี และมีปริมาณไขมันเหลือน้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเข้าสู่ตู้แช่ที่อุณหภูมิ -25°C เป็นเวลา 1 คืน (วิธี B) สำหรับวิธีที่นำเข้าสู่ตู้แช่ที่อุณหภูมิ -25°C เป็นเวลา 1 คืน และนำออกมาปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี C) นั้น พบว่าก่อนปั่นเหวี่ยง ไขมันจับตัวในชั้นล่าง และมีบางส่วนลอยอยู่ในตัวทำละลาย แต่หลังการปั่นเหวี่ยงแล้ว สังเกตว่าไขมันที่จับตัวไม่แน่นเท่ากับวิธี A และ B เกิดจากอุณหภูมิในระหว่างปั่นเหวี่ยงสูงขึ้นกว่าในตู้แช่ ไขมันจึงได้ละลายออกมาบ้างในตัวทำละลาย เมื่อถ่ายเทขึ้นตัวทำละลาย อินทรีย์ออกมาจึงทำให้มีปริมาณไขมันที่เหลือมากกว่าอีกสองวิธีข้างต้น จากผลการศึกษาได้เปรียบเทียบเป็นประสิทธิภาพการกำจัดไขมัน (100 - %ไขมันคงเหลือ) ได้ดังภาพที่ 3

การเลือกใช้ตัวทำละลายสกัดมีความสำคัญมาก เมื่อพิจารณาที่การทำ freezing out ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี A) สังเกตพบว่าการสกัดด้วย ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane (แบบที่ 4) มีการแยกชั้นไขมันกับตัวทำละลายได้ดีกว่าการสกัดด้วย ACN เพียงอย่างเดียว (แบบที่ 3) แสดงว่า n-hexane ที่เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วช่วยดึงไขมันให้แยกออกจาก ACN ที่มีขั้วมากกว่า n-hexane ในขณะที่การสกัดที่เติม DOF (แบบที่ 2) ที่เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้ว ไขมันบางส่วนอาจจะละลายเข้าไปใน ACN ที่มี n-hexane อยู่ เมื่อถ่ายขึ้นตัวทำละลายใส่หลอดใหม่ จึงมีไขมันมากกว่าการสกัดแบบที่ 1 ที่มีตัวทำละลาย ACN อย่างเดียว ไม่มี n-hexane จะดึงไขมันไป florasil จึงจับไขมันได้ดีกว่าการสกัดแบบที่ 2 และไขมันที่เหลือมีสีที่จางกว่าวิธีแบบอื่น เนื่องจาก florasil เป็นสารที่สามารถดูดซับไขมันและสีได้บางส่วน

ดังนั้น การใช้ ACN อย่างเดียวทำการสกัดสารในตัวอย่างไขมันจึงไม่เหมาะสม จึงเลือกวิธีการสกัดโดยใช้ ACN อิ่มตัวด้วย n-hexane (แบบที่ 4) ที่ไม่ต้องใช้ florasil เป็นการลดสารเคมีที่ต้องใช้ในการทดสอบ และใช้วิธีการตกตะกอนไขมันด้วยวิธี freezing out แบบปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที (วิธี A) ไปทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการกำจัด co-extractives ด้วย dSPE



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพการกำจัดไขมันด้วยเทคนิคการสกัดกับเทคนิค freezing out

แม้ว่าไขมันในตัวอย่างจะถูกกำจัดในขั้นตอนการสกัดและ freezing out ได้มากแล้วก็ตาม แต่ยังมีไขมันที่เหลืออยู่ในสารสกัด ซึ่งไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือได้ เพราะจะทำให้เครื่องมือมีความสกปรก เกิดความเสียหายและอายุการใช้งานสั้นลง ต้องมีการบำรุงรักษาบ่อย ซึ่งไม่เป็นผลดีกับเครื่องมือวิเคราะห์ และมีความล่าช้าในงานวิเคราะห์ จึงต้องมีการทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้นเพียงพอ

ขั้นตอนการ clean-up ด้วยวิธีการของ QuEChERS ใช้ dSPE เพื่อให้สารสกัดสะอาดขึ้นหรือบริสุทธิ์ขึ้น ตัวดูดซับที่ใช้ใน dSPE คือ PSA สำหรับกำจัดน้ำตาล กรดไขมัน กรดอินทรีย์ ลิพิด และสารสี (pigments) C18 ใช้กำจัดสารประกอบไขมันที่มีสายโซ่ยาว sterol และสารรบกวนชนิดไม่มีขั้ว (Rahman, et al., 2017) Z-Sep และ Z-Sep⁺ มีคุณสมบัติในการกำจัดไขมันในตัวอย่างที่มีไขมันสูงได้ (Michel, et al., 2015) และ MgSO₄ สำหรับจับน้ำที่มีอยู่ในสารสกัดตัวอย่าง (Schenck, et al., 2002) การตรวจสอบประสิทธิภาพการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ขึ้น พิจารณาจากปริมาณไขมันคงเหลือและฟีดสาร co-extractives ใน sample blank และ %recovery กับ %RSD ของสารในกลุ่มไพร์ทรอยด์ใน spiked sample โดยในขั้นตอนการระเหยสารสกัดเพื่อลดปริมาตรให้เข้มข้นขึ้น ต้องระเหยให้ ACN แห้ง เนื่องจาก ACN มีคุณสมบัติที่ละลายสารได้ทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้ว หากฉีดสารเข้าสู่ GC column โดยตรง stationary phase ภายใน column จะถูกทำลาย และอายุการใช้งาน GC column สั้นลง เพื่อเป็นการยืดอายุ GC column ให้สามารถวิเคราะห์สารนานขึ้น จึงเปลี่ยนตัวทำละลายในการปรับปริมาตรเป็น iso-octane

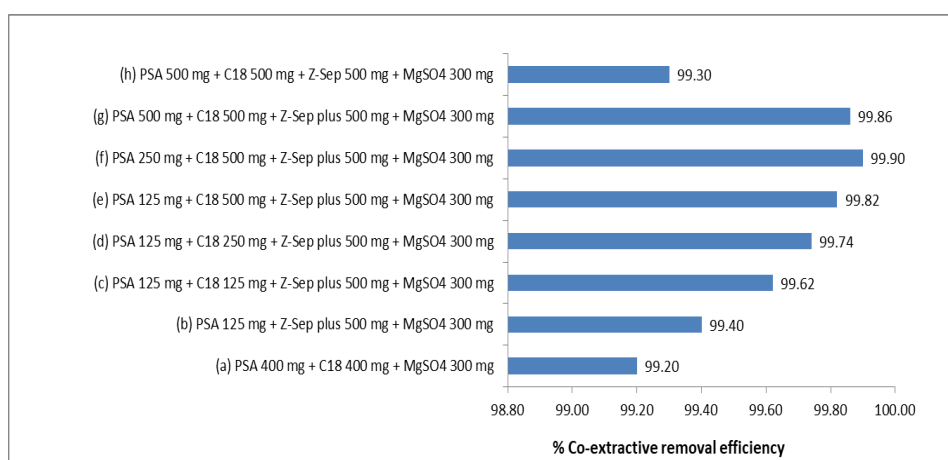
จากการทดลองกับ sample blank โดยกำหนดปริมาณ MgSO₄ เท่ากันทุกการทดลอง พบว่าส่วนผสมของ PSA + C18 (a) หรือ PSA+Z-Sep⁺ (b) กำจัดไขมันได้น้อยกว่าตัวดูดซับ 3 ชนิด PSA, C18, และ Z-Sep⁺ ผสมกัน (c)–(g) สำหรับตัวดูดซับผสม (h) ที่เตรียมมีส่วนผสมของ Z-Sep, C18 และ PSA พบว่าการกำจัดไขมันยังได้น้อยกว่า Z-Sep⁺ ที่อยู่ในชุด (c)–(g) เนื่องจาก Z-Sep⁺ เป็นตัวดูดซับที่มีสารเซอร์โคเนียมไดออกไซด์ (ZrO₂) และ C18 เคลือบอยู่บนซิลิกาเดียวกัน ในลักษณะ dual bonded (Michel, et al., 2015) จึงทำให้กำจัดไขมันได้ดีกว่า Z-Sep ที่มีเฉพาะสาร ZrO₂ ที่เคลือบอยู่บนซิลิกา สำหรับสาร ZrO₂ มีคุณสมบัติเป็นสารแอมโฟเทอริก (amphoteric) และอะตอมของ Zr เป็นกรดลิวอิส ซึ่งทำให้สามารถดูดซับเบสลูอิส เช่น กรดไขมันได้ดี (Peng, et al., 2015)

เมื่อตรวจสอบปริมาณสัดส่วนที่เหมาะสมกับการกำจัดไขมันด้วย PSA และ C18 เมื่อผสมกับ Z-Sep⁺ พบว่าปริมาณ PSA 250 mg + C18 500 mg + Z-Sep⁺ 500 mg (f) เป็นสัดส่วนที่กำจัด co-extractives ได้ดีที่สุด ซึ่งมีน้ำหนักแห้งของไขมันคงเหลือคิดเป็น 0.10 % โดยแสดงเป็นประสิทธิภาพการกำจัดไขมันด้วยเทคนิค dSPE หลังทำการสกัดและ freezing out ดังภาพที่ 4 และมีผลรวมของพื้นที่ใต้พีคของแต่ละการทดสอบน้อยกว่าตัวดูดซับผสมอื่นๆ ซึ่งปริมาณพื้นที่ใต้พีคมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักไขมันไปในทางเดียวกัน โครมาโทแกรมที่ใช้ตัวดูดซับ (f) สะอาดที่สุด จึงได้เลือกวิธีการ clean-up นี้เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการสกัดกับการทำให้บริสุทธิ์กับ

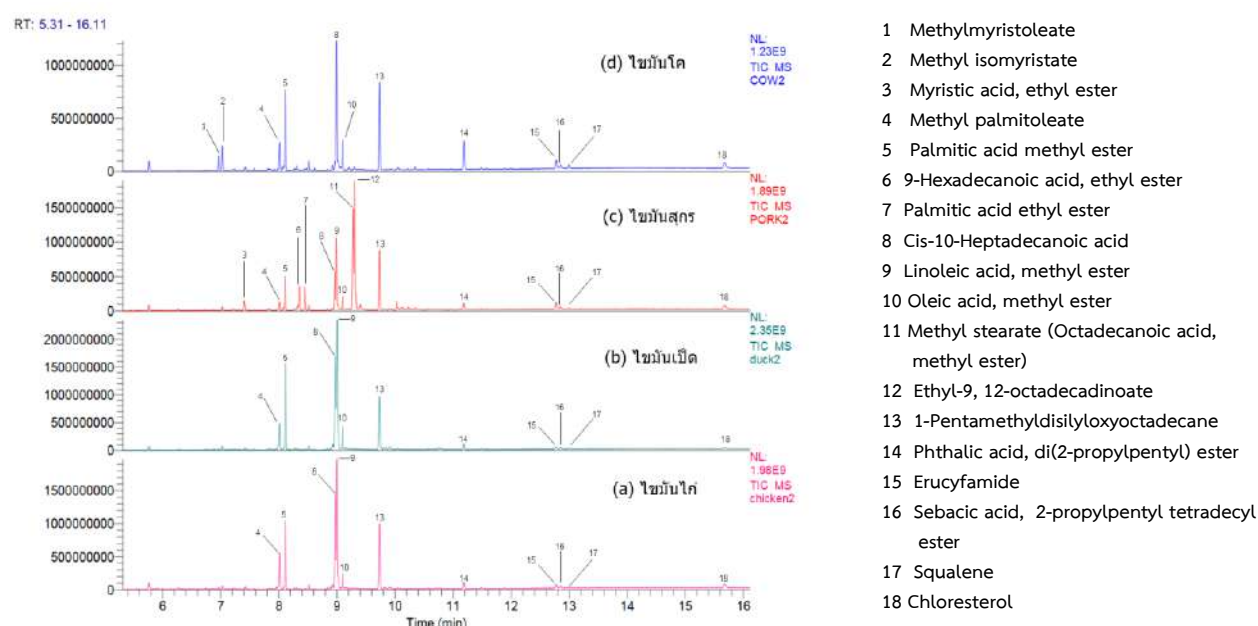
ไขมันไก่ เป็ด สุกร และโค พบว่าน้ำหนักของ co-extractives ในไขมันเป็ดมีมากกว่าไขมันไก่ โค และสุกร ตามลำดับ โดยที่ลักษณะของ interference peak ของไขมันไก่และเป็ดที่เป็นสัตว์ปีกมีความเหมือนกัน สำหรับไขมันสุกรและโค นอกจากพบพิกัดสารที่เหมือนกับไขมันไก่และเป็ดแล้ว ยังพบพิกัดสารอื่นเพิ่มเติม ดังภาพที่ 5

ตรวจสอบ interference peak ในไขมันทั้ง 4 ชนิด กับฐานข้อมูลใน NIST Library พบว่า ส่วนมากเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน พิกัดสารเหล่านี้มี RT อยู่ในช่วงต้นของโครมาโทแกรม ไม่ซ้อนทับกับสารกลุ่มไพรีทรอยด์ที่อยู่ช่วงท้ายโครมาโทแกรม พบเพียงพิกัดสารเล็ก ๆ ลำดับที่ 12-14 ซึ่งมี RT ตรงกับสาร cypermethrin แต่มีมวลต่อประจุไม่เหมือนกัน และพบพิกัดสารคลอโรสเตอรอล (ลำดับ 18) ที่มีพื้นที่ใต้พิกัดน้อยมากเมื่อเทียบพิกัดสารในช่วงต้น วิธีการนี้สามารถแยกพิกัดและตรวจวัดสารไพรีทรอยด์ได้ชัดเจน

เมื่อพิจารณาค่า %MR และ %RSD จากการใช้ตัวดูดซับผสม (c)-(g) พบว่าค่า %MR อยู่ในเกณฑ์ 70-120% และ %RSD < 20% ดังตารางที่ 4 ซึ่งค่า %MR และ %RSD ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับตัวดูดซับผสม (a), (b) และ (h) มีคราบไขมันที่สังเกตได้ชัดหลังจากกระเหยแห้ง จึงไม่นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพการกำจัดไขมันด้วยเทคนิค dSPEหลังทำการสกัดและ freezing out ใน sample blank



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของ sample blank ชนิดไขมันไก่ (a) เป็ด (b) สุกร (c) และ (d) โค ที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS

ตารางที่ 4 ค่า % mean recovery (%MR) และ %RSD ของการทดสอบตัวดูดซับชนิด (c)-(g)

Pesticides	Sorbent (c)		Sorbent (d)		Sorbent (e)		Sorbent (f)		Sorbent (g)	
	%MR	%RSDr	%MR	%RSDr	%MR	%RSDr	%MR	%RSDr	%MR	%RSDr
Bifenthrin	91.5	0.9	90.7	1.0	91.4	2.3	92.1	2.1	92.3	4.3
Tetramethrin	104.3	3.6	103.7	2.8	101.5	1.8	104.5	2.4	104.1	0.5
Fenpropathrin	103.4	5.2	102.4	7.9	107.8	1.5	107.0	3.2	105.5	4.3
Phenothrin	95.3	2.1	97.4	3.2	95.2	2.4	95.4	2.4	97.8	2.4
Cyhalothrin	103.6	1.0	102.9	6.6	101.4	4.3	100.2	4.4	100.6	0.9
Cyphenothrin	96.3	3.5	99.9	6.5	94.7	3.8	100.2	1.1	99.3	0.1
Permethrin	97.8	1.3	98.2	0.9	99.7	0.9	101.7	0.6	100.8	0.8
Cyfluthrin	98.5	0.6	98.0	4.0	99.9	1.8	101.7	0.6	101.1	1.9
Cypermethrin	98.1	0.6	96.8	1.1	96.5	2.3	98.3	2.0	97.1	1.0
Flucythrinate	102.2	0.9	99.6	3.2	100.3	4.6	102.6	5.3	105.1	6.1
Etofenprox	92.5	1.2	97.2	4.0	99.4	2.0	102.5	1.5	101.1	1.3
Fenvalerate	100.9	2.2	100.6	3.5	100.1	4.9	101.4	2.9	103.6	3.5
Fluvalinate	103.2	1.8	105.4	1.8	104.6	3.7	103.6	2.0	103.9	0.5
Deltamethrin	101.8	1.9	96.7	7.8	105.0	3.2	106.3	2.5	104.0	0.7

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาการสกัดสารไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์ด้วยวิธี LLE กับวิธี QuEChERS พบว่า ในขั้นตอนการสกัดกับ freezing out ในวิธี QuEChERS สามารถกำจัดไขมันได้มากกว่าวิธี LLE และขั้นตอน clean-up ที่ใช้ตัวดูดซับผสม (c)-(g) ของวิธี QuEChERS สามารถกำจัดไขมันได้มากกว่ารวมทั้งมีค่า %MR กับ %RSD ได้ดีกว่าวิธี LLE ที่ใช้ florisil column เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้วิธี QuEChERS ที่ใช้ตัวดูดซับผสม (f) มีผลรวมพื้นที่ใต้พีคน้อยกว่าวิธี LLE ดังนั้น จึงเลือกใช้วิธีการสกัดกับ freezing out และตัวดูดซับผสม (f) ด้วยวิธี QuEChERS ในการพิสูจน์ความใช้ได้สารไพรีทรอยด์ 14 ชนิดในไขมันสัตว์

3 การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี

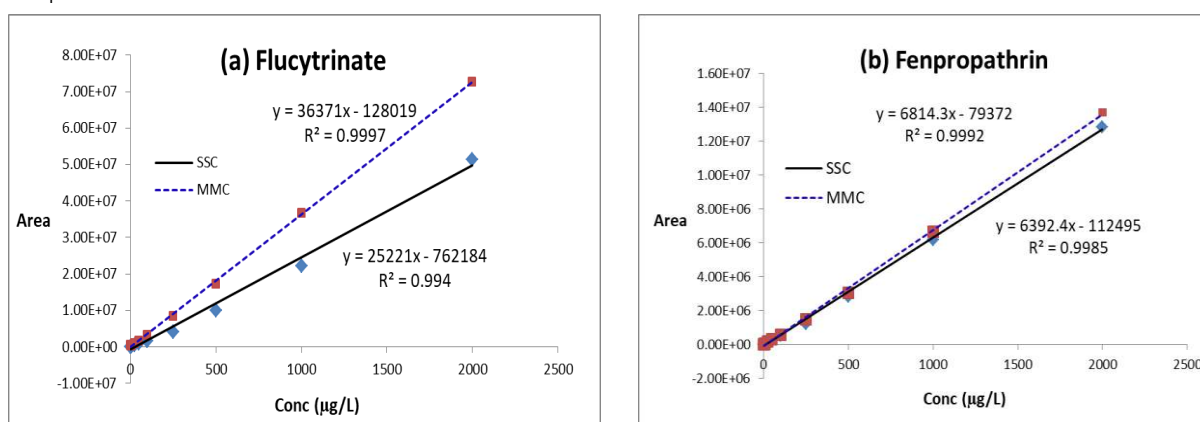
3.1 ความจำเพาะ

จากการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ในโหมด SRM ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีค และมวลต่อประจุตรงกับสารที่วิเคราะห์ในกลุ่มไพรีทรอยด์ เมื่อเทียบกับ RT ของสารมาตรฐานในช่วง ± 0.1 นาที ตามเกณฑ์ SANTE/12682/2019 ซึ่งการวิเคราะห์สารในโหมด SRM ด้วยเครื่อง GC-MS/MS สามารถตรวจวัดพีค สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างชัดเจน เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดสารสนใจ ในเมทริกซ์ที่มีสารรบกวนได้ดี

3.2 ผลกระทบจากเมทริกซ์ และช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารกลุ่มไพรีทรอยด์จากการฉีดสารมาตรฐานหลาย ความเข้มข้นในตัวทำละลายและในเมทริกซ์เข้าเครื่อง GC-MS/MS เมื่อนำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน พบว่ากราฟของ สารทั้ง 14 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ความเข้มข้น 1–2,000 $\mu\text{g/L}$ โดยค่า R^2 มากกว่า 0.990 มีสมการเส้นตรง ($y = mx + c$) ตามตารางที่ 5 เมื่อนำค่าความชันของกราฟมาตรฐานทั้งสองชนิดมาคำนวณเพื่อตรวจสอบผลกระทบ จากเมทริกซ์ พบว่า มีเพียง 6 สาร ได้แก่ bifenthrin, fenpropathrin, phenothrin, cyhalothrin, cyphenothrin และ permethrin ที่มี %ME ต่ำกว่า 20% คือ ตั้งแต่ 6.6–17.3% และสารที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับมีค่า %ME มากกว่า 20% จำนวน 8 สาร ซึ่งเกิดจากผลกระทบของเมทริกซ์ แบ่งได้ 2 ช่วง คือ ช่วงที่มากกว่า 20–40% จำนวน 6 สาร ตั้งแต่ 24.6–39.8% ได้แก่ cyfluthrin, cypermethrin, etofenprox, fenvalerate, fluvalinate และ deltamethrin และที่มากกว่า 40% ขึ้นไป มี 2 สาร คือ tetramethrin และ flucythrinate ตั้งแต่ 41.5–44.2%

โดยสารที่มีค่า %ME สูงสุด คือ flucytrinate ซึ่งสังเกตได้จากภาพที่ 6(a) ที่เห็นได้ว่าความชันของกราฟทั้งสอง แยกห่างออกจากกันมาก ซึ่งมีความแตกต่างกับสาร fenpropathrin ในภาพที่ 6(b) ที่มี %ME ต่ำสุดเท่ากับ 6.6% โดยความชันของกราฟทั้งสองของ fenpropathrin มีความใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบต่อสารไพรีทรอยด์เป็นส่วนใหญ่ สัญญาณที่เพิ่มขึ้นเกิดจากส่วนประกอบเมทริกซ์ปิดกั้นบริเวณ inlet liner และ GC column สารที่วิเคราะห์จะถูกดูดซับบนเฟสอยู่กับที่ที่เคลือบอยู่ภายในคอลัมน์ได้น้อยลง ทำให้สารที่วิเคราะห์สามารถเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจจับได้มากขึ้น (Lozano, et al., 2014) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ปราศจากเมทริกซ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน แม้ว่าในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะได้ปรับขั้นตอนการ clean-up อย่างละเอียดแล้วก็ตาม แต่เนื่องจากตัวอย่างไขมันสัตว์มีสารประกอบเมทริกซ์ในปริมาณมาก จึงยังพบว่ามี co-extractives ที่คงเหลือในสารสกัดตัวอย่างอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้น จึงใช้การชดเชยผลของเมทริกซ์ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายในเมทริกซ์เพื่อความถูกต้องและเหมาะสมในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีและในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มไพรีทรอยด์ทั้ง 14 ชนิด ในตัวอย่างไขมันสัตว์



ภาพที่ 6 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและการทดสอบ matrix effect โดยที่ (a) Flucytrinate (matrix enhancement) และ (b) Fenpropathrin (without matrix effect)

ตารางที่ 5 สมการเส้นตรง ค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานและ Matrix effect

Pesticides	Standard in iso-octane		Standard in Matrix		%ME
	Calibration curve	R^2	Calibration curve	R^2	
Bifenthrin	$y = 102,212x - 1,226,589$	0.9998	$y = 112,924x - 509,791$	0.9996	10.5
Tetramethrin	$y = 42949x - 221521$	0.9997	$y = 30,351x - 1,110,336$	0.9992	41.5
Fenpropathrin	$y = 6814.3x - 79372$	0.9992	$y = 6392.4x - 112495$	0.9985	6.6
Phenothrin	$y = 3917.5x + 27872$	0.9997	$y = 3387.6x - 57789$	0.998	15.6
Cyhalothrin	$y = 22823x - 209753$	0.9995	$y = 19816x - 355446$	0.9986	15.2
Cyphenothrin	$y = 22823x - 209753$	0.9995	$y = 19816x - 355446$	0.9986	17.3
Permethrin	$y = 17926x - 132167$	0.9997	$y = 15532x - 244466$	0.9982	15.4
Cyfluthrin	$y = 19507x - 85734$	0.9997	$y = 14065x - 382278$	0.9951	38.7
Cypermethrin	$y = 25179x - 178742$	0.9993	$y = 18561x - 504963$	0.9952	35.7
Flucytrinate	$y = 36371x - 128019$	0.9997	$y = 25221x - 762184$	0.994	44.2
Etofenprox	$y = 128617x - 540184$	0.9999	$y = 103222x - 2E+06$	0.9974	24.6
Fenvalerate	$y = 48250x - 223501$	0.9997	$y = 36005x - 881792$	0.9959	34.0
Fluvalinate	$y = 582.24x + 35722$	0.9988	$y = 416.6x - 12727$	0.9949	39.8
Deltamethrin	$y = 6922.3x - 77378$	0.9991	$y = 5076.5x - 160452$	0.9938	36.4

3.3 ทดสอบ Limit of Detection (LOD) & Limit of Quantitation (LOQ)

ผลการทดสอบ spiked fat sample ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg คำนวณค่า LOD และ LOQ ได้ตั้งแต่ 0.2–1.5 และ 0.7–5.0 µg/kg ตามลำดับ จึงทดสอบยืนยันค่า LOD และ LOQ ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 µg/kg ตามลำดับ และพบว่า S/N สารกลุ่ม pyrethroid ใน spiked fat sample ความเข้มข้น 1 µg/kg มีค่ามากกว่า 3 โดย S/N ของสารที่ต่ำสุดคือ fenprothrin มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.2 แสดงว่า สามารถกำหนดให้เป็นความเข้มข้นเท่ากับ 1 µg/kg เป็นค่า LOD ของวิธีทดสอบได้ และการยืนยันค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 5 µg/kg พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับทุกสาร ได้แก่ ค่า S/N > 10 โดย S/N ของสารที่ต่ำสุดคือ phenothrin มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38 ค่า %MR อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 70-120% โดยสาร fluvalinate มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 80.3% และค่า %RSD อยู่ในเกณฑ์ ≤ 20% โดยสาร deltamethrin มีค่า %RSD สูงสุดเท่ากับ 13.5% รายละเอียดดังตารางที่ 6 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมีค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 5 µg/kg ซึ่งค่านี้มีความไวเพียงพอกับค่า MRL ที่กำหนดไว้ต่ำสุดที่ 10 µg/kg

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบหาค่า Limit of Detection (LOD) & Limit of Quantitation (LOQ)

Pesticides	SPK 10 µg/kg (n=5)			LOD (SPK 1 µg/kg, n=5)		LOQ (SPK 5 µg/kg, n=5)	
	SD	Est. LOD (3S ₀)	Est. LOQ (10 S ₀)	S/N	S/N	%MR	%RSD _r
Bifenthrin	0.12	0.4	1.2	131.4	689.0	84.2	7.2
Tetramethrin	0.14	0.4	1.4	31.5	105.6	90.9	6.6
Fenprothrin	0.45	1.4	4.5	17.2	123.1	88.0	12.2
Phenothrin	0.50	1.5	5.0	31.5	38.0	104.7	2.0
Cyhalothrin	0.20	0.6	2.0	196.6	582.8	99.0	3.1
Cyphenothrin	0.18	0.5	1.8	31.2	48.0	102.3	3.7
Permethrin	0.26	0.8	2.6	48.6	214.6	103.0	4.1
Cyfluthrin	0.13	0.4	1.3	22.9	55.7	86.2	11.0
Cypermethrin	0.12	0.3	1.2	29.3	48.5	86.0	10.2
Flucythrinate	0.07	0.2	0.7	52.6	251.0	83.1	12.8
Etofenprox	0.37	1.1	3.7	56.0	344.2	89.0	3.8
Fenvalerate	0.34	1.0	3.4	51.5	269.9	94.7	4.5
Fluvalinate	0.12	0.4	1.2	40.8	50.6	80.3	12.8
Deltamethrin	0.11	0.3	1.1	26.3	148.6	81.2	13.5

3.4 ความแม่นยำและความเที่ยง

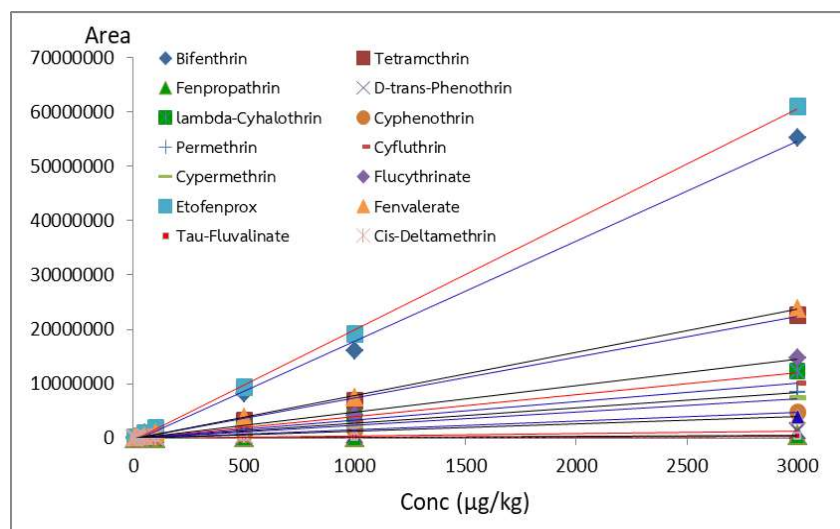
ผลการตรวจสอบความแม่นยำจาก %MR และความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability precision) และแบบการทำซ้ำได้ (intermediate precision) จากค่า RSD ใน spiked fat sample ที่ความเข้มข้น 5 (LOQ), 10 (2xLOQ), 100 และ 3,000 µg/kg ดังตารางที่ 7 โดยพบว่า ค่า %MR อยู่ในเกณฑ์ 70–120%, RSD_r และ RSD_i ไม่เกิน 20% โดยการทดสอบแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR ตั้งแต่ 80.3–118.4% และค่า RSD_r ตั้งแต่ 0.6–14.2% สำหรับการทดสอบแบบทำซ้ำได้ มีค่า RSD_i ตั้งแต่ 1.2–13.2%

ตารางที่ 7 ค่า % mean recovery และ (%RSD) ของสารกลุ่มไพรีทรอยด์ใน spiked fat sample ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Pesticides	Day 1, Conc. (µg/kg), n = 5				Day 2, Conc. (µg/kg)), n = 5				Intermediate, Conc. (µg/kg)), n = 10			
	5	10	100	3000	5	10	100	3000	5	10	100	3000
Bifenthrin	84.2 (7.2)	101.8 (1.2)	104.4 (4.9)	103.5 (1.0)	90.0 (6.6)	100.6 (2.6)	113.1 (5.5)	102.9 (2.4)	90.2 (6.5)	100.6 (1.9)	113.4 (4.9)	102.6 (1.8)
Tetramethrin	90.9 (6.6)	104.0 (1.3)	102.0 (3.5)	105.0 (1.4)	98.6 (3.4)	104.2 (2.4)	111.1 (5.0)	103.0 (2.2)	95.5 (5.9)	103.9 (1.9)	109.4 (4.4)	103.3 (1.8)
Fenpropathrin	88.0 (12.2)	92.8 (4.6)	105.8 (3.7)	102.3 (1.1)	97.4 (14.2)	94.1 (5.7)	114.4 (2.1)	115.1 (2.9)	94.7 (12.9)	96.6 (5.6)	113.6 (2.9)	108.5 (6.8)
Phenothrin	104.7 (2.0)	103.4 (5.0)	101.6 (5.8)	109.1 (2.9)	100.7 (3.2)	103.8 (3.7)	106.0 (4.2)	101.4 (5.0)	101.4 (2.7)	102.6 (4.3)	105.4 (4.8)	102.6 (4.0)
Cyhalothrin	99.0 (3.1)	104.9 (1.9)	111.4 (2.0)	101.6 (1.7)	97.8 (5.4)	104.0 3.9)	114.2 (1.9)	111.3 (2.7)	99.2 (4.4)	105.0 (3.0)	114.7 (1.9)	107.3 (4.5)
Cyphenothrin	102.3 (3.7)	100.8 (1.7)	109.0 (2.0)	100.1 (0.8)	100.2 (2.2)	104.0 (1.5)	107.5 (4.5)	106.0 (1.0)	101.2 (3.1)	103.6 (1.6)	108.0 (3.3)	103.3 (2.8)
Permethrin	103.0 (4.1)	104.8 (2.5)	101.0 (3.3)	100.4 (1.0)	103.3 (3.5)	102.4 (1.3)	105.4 (4.6)	103.4 (2.0)	101.8 (3.9)	103.0 (2.0)	104.9 (3.8)	102.4 (1.8)
Cyfluthrin	86.2 (11.0)	100.8 (1.2)	114.6 (1.4)	99.4 (0.9)	101.3 (10.8)	105.7 (2.3)	115.5 (2.3)	107.9 (1.5)	99.7 (10.4)	103.5 (2.8)	116.0 (1.9)	104.3 (3.8)
Cypermethrin	86.0 (10.2)	103.6 (1.1)	114.6 (1.3)	103.0 (0.9)	93.8 (9.9)	103.9 (2.2)	114.2 (3.2)	104.9 (1.2)	97.6 (10.3)	104.2 (1.7)	114.3 (2.3)	103.7 (1.3)
Flucythrinate	83.1 (12.8)	106.3 (0.6)	115.4 (1.2)	103.9 (1.0)	101.3 (8.8)	106.5 (1.9)	117.3 (1.4)	108.0 (2.1)	100.3(10.4)	106.3 (1.3)	117.6 (1.3)	106.3 (2.3)
Etofenprox	89.0 (3.8)	100.8 (3.6)	109.4 (3.2)	102.5 (1.0)	101.5 (9.5)	102.3 (1.5)	111.5 (4.8)	100.3 (1.6)	97.2 (8.4)	102.9 (2.7)	113.4 (4.2)	101.3 (1.6)
Fenvalerate	94.7 (4.5)	100.8 (3.2)	118.4 (0.9)	103.5 (1.1)	107.5 (6.0)	103.4 (1.4)	115.2 (2.8)	115.4 (1.9)	104.2 (6.1)	104.7 (2.7)	116.1 (2.2)	109.7 (5.7)
Fluvalinate	80.3 (12.8)	104.2 (1.1)	115.2 (2.5)	105.7 (3.0)	102.5 (12.8)	106.4 (1.1)	112.3 (3.2)	102.4 (2.8)	97.5 (13.2)	105.8 (1.2)	112.9 (2.8)	102.2 (2.7)
Deltamethrin	81.2 (13.5)	105.2 (1.1)	111.6 (2.7)	101.8 (1.6)	95.7 (12.7)	102.4 (1.4)	114.6 (3.6)	101.9 (1.6)	96.0 (12.4)	103.3 (1.5)	111.5 (4.2)	102.2 (1.5)

3.5 ความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ (Working range)

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดใน spiked fat sample ที่ความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 และ 3,000 µg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และแกน Y เป็นพื้นที่ใต้พีค ดังภาพที่ 7 เมื่อคำนวณสมการเส้นตรงและตรวจสอบค่า R^2 พบว่ากราฟของสารทุกชนิดที่ตรวจวิเคราะห์เป็นเส้นตรงได้ค่า R^2 ตั้งแต่ 0.9903 (phenothrin) - 0.9995 (etofenprox) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของค่า $R^2 \geq 0.990$ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่อง GC-MS/MS กับปริมาณสารตั้งแต่ 5 -3,000 µg/kg



ภาพที่ 7 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ปริมาณสารตั้งแต่ 5 -3000 µg/kg

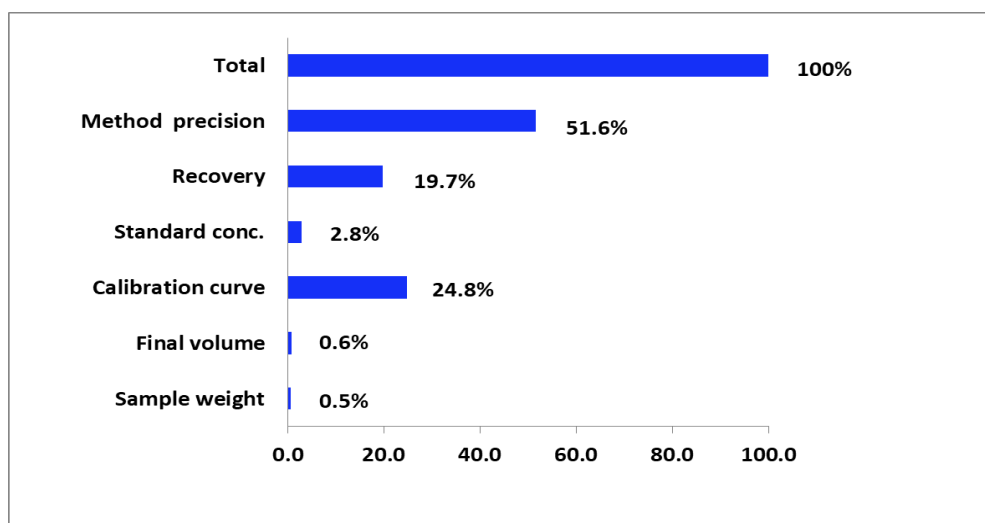
3.6 ความคงตัว (Stability)

เมื่อทดสอบสารละลาย spiked fat sample ความเข้มข้น 10 µg/kg ซ้ำ หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18°C เป็นเวลา 7 วัน กับกราฟมาตรฐานชนิดเมทริกซ์ ได้ผล %MR ในช่วง 90.5–104.7% และ %RSD_r ไม่เกิน 20 ซึ่งผลที่ได้มีค่าต่ำลงจากการทดสอบครั้งแรกแต่ยังอยู่ในเกณฑ์ ดังนั้น ในงานวิเคราะห์ควรทำการทดสอบตัวอย่างให้เสร็จภายใน 7 วัน เพื่อความถูกต้องของผลวิเคราะห์ที่จะใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด

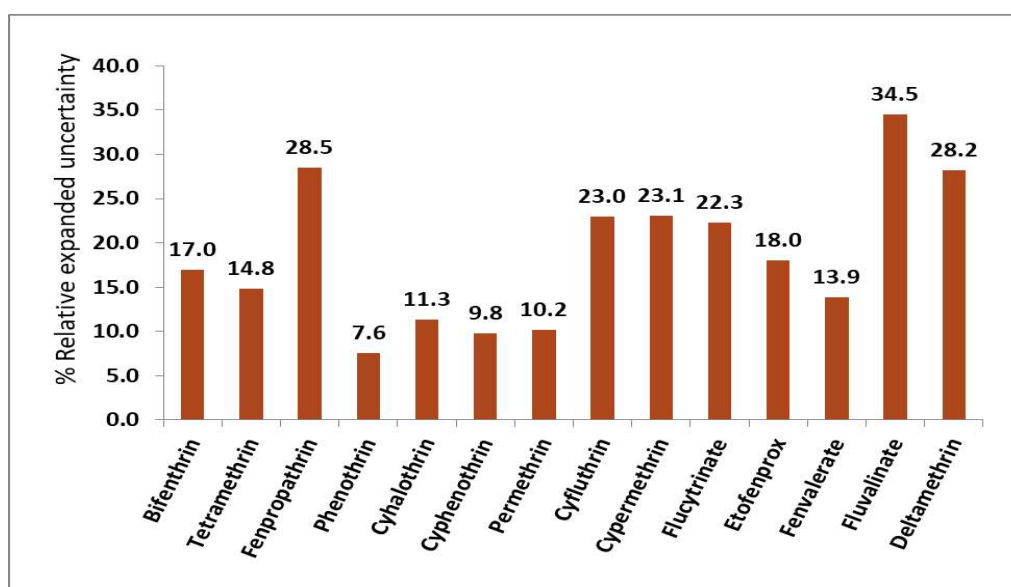
3.7 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามวิธีการของ Eurachem (2014) ตามแนวทางของ ISO/GUM Approach เป็นแนวทางที่เข้มงวดและมีรูปแบบคำนวณที่ชัดเจน ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ระดับค่า LOQ ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดของความสามารถของวิธีทดสอบ พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุด คือ ความเที่ยงของวิธี (method precision) 51.6% รองลงมา คือ กราฟมาตรฐาน (calibration curve) 24.8% และความล่าช้าหรือ recovery 19.7% ส่วนแหล่งที่มาอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบที่มีค่าความไม่แน่นอนน้อยมาก ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (standard conc.) 2.8% ปริมาตรตัวอย่าง (final volume) 0.6% และน้ำหนักตัวอย่าง (sample weight) 0.5% เมื่อคิดรวมแหล่งที่มีค่าความไม่แน่นอนน้อยแล้วไม่เกิน 1/5 เท่าของ total uncertainty ดังภาพที่ 8

เมื่อคำนวณเป็นค่า %RU พบว่า สารที่มีค่า %RU ต่ำสุด คือ phenothrin (7.6%) และสารที่ค่า %RU สูงสุด คือ fluvalinate (34.5%) ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 8 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนที่มีต่อการวิเคราะห์สารไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ในไขมันสัตว์ ที่ระดับ LOQ เปรียบเทียบกับความไม่แน่นอนทั้งหมด



ภาพที่ 9 ค่า % relative expanded uncertainty ของสารไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ในไขมันสัตว์

3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างไขมันสัตว์

ผลวิเคราะห์ตัวอย่างไขมัน ไก่ เป็ด สุกร โค รวม 20 ตัวอย่าง ตามวิธีที่ได้จากการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้แล้ว พบว่า ไม่พบสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ทั้ง 14 ชนิด ในทุกตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่างไขมันสัตว์เหล่านี้จึงได้มาตรฐาน ซึ่งในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ผลการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ภายในด้วย spiked sample ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg ได้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 70-120% และ %RPD มีค่าต่ำกว่า 20%

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ 14 ชนิด ในไขมันสัตว์ด้วยวิธีที่พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้โดยใช้วิธี QuEChERS ซึ่งสกัดตัวอย่างด้วย ACN ที่อิ่มตัวด้วย n-hexane และตกตะกอนไขมันด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 15 นาที และ clean-up ด้วย dSPE ชนิดและปริมาณที่เป็นสารผสมของ PSA 250 mg + C_{18} 500 mg + Z-Sep⁺ 500 mg และ MgSO_4 300 mg ในการทำให้สารที่สกัดได้สะอาดขึ้นและวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงมากกว่าวิธี LLE ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีมีความจำเพาะ ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ความแม่นยำ ความเที่ยง ค่า LOD, LOQ และช่วงการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม SANTE/12682/2019 เหมาะสมกับการใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์สำหรับการตรวจสอบเฝ้าระวังสารพิษตกค้างประจำปีของกรมปศุสัตว์ให้เป็นไปตามค่ามาตรฐานระหว่างประเทศเพื่อการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ และใช้เป็นข้อมูลประกอบแสดงความเชื่อมั่นต่อประเทศคู่ค้า วิธีวิเคราะห์นี้สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอื่นๆ และสารพิษตกค้างอื่น ๆ โดยต้องคำนึงถึงลักษณะและคุณสมบัติของสารที่จะวิเคราะห์ด้วย และทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีก่อนนำไปใช้เสมอ ทั้งนี้จากการวิเคราะห์สารไพรีทรอยด์ในตัวอย่างไขมันไก่ เป็ด สุกร และโค ด้วยวิธีที่พิสูจน์ความใช้ได้แล้ว ไม่พบสารไพรีทรอยด์ทั้ง 14 ชนิด ในทุกตัวอย่าง

ข้อเสนอแนะ

นอกจากการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์แล้ว ควรมีการดำเนินการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารไพรีทรอยด์ในเนื้อสัตว์ด้วย เนื่องจากมีการส่งออกเป็นเนื้อสัตว์ไปยังประเทศต่างๆ หากในการเฝ้าระวังตรวจติดตามมีการตรวจพบสารตกค้างในไขมันสัตว์ที่สูงเกินหรือใกล้เคียงค่ามาตรฐานการตกค้าง จะสามารถตรวจสอบการตกค้างในเนื้อสัตว์และสามารถนำไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานการตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ เพื่อประโยชน์กับการส่งออกของประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นายสัตวแพทย์สมชาย วงศ์สมุทร ผู้เชี่ยวชาญด้านตรวจสอบคุณภาพปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์นมที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และบุคลากรงานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสารตกค้างสำหรับสินค้าปศุสัตว์. 12 กรกฎาคม 2549.
- กรมปศุสัตว์. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การกำหนดรายการข้อมูล เอกสารและหลักฐานเพื่อการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 215 ง/หน้า 18-19/17 กันยายน 2563.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. and Schenck, F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 86, 412–431.

- AKRE, C. J. and MACNEIL, J. D. 2006. Determination of Eight Synthetic Pyrethroids in Bovine Fat by Gas Chromatography with Electron Capture Detection. *J. AOAC Int.* 89(5), 1425-1431.
- AOAC. 2019. Official Method of Analysis of AOAC International. 21st Edition. Vol. I. The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence. Maryland. Method number 970.52 Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues.
- Castillo M., González, C., Miralles, A. 2011. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. *Anal Bioanal Chem.* 400, 1315–1328.
- Eurachem Guide. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. [Online]. Available form: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- European Union. 1996. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Community.* L125, 10-32.
- European Union. 2005. Regulation (EC) No 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union* L70, 1-16.
- European Union. 2010. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union.* L15, 1-72.
- European Union. 2015. Commission Regulation (EU) 2015/399 of 25 February 2015 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 1,4-dimethylnaphthalene, benfuracarb, carbofuran, carbosulfan, ethephon, fenamidone, fenvalerate, fenhexamid, furathiocarb, imazapyr, malathion, picoxystrobin, spirotetramat, tepraloxymid and trifloxystrobin in or on certain products. *Official Journal of the European Union.* L71, 1-55.
- European Union. 2015. Commission Regulation (EU) 2015/868 of 26 May 2015 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 2,4,5-T, barban, binapacryl, bromophos-ethyl, camphechlor (toxaphene), chlorbufam, chloroxuron, chlozolinate, DNOC, di-allate, dinoseb, dinoterb, dioxathion, ethylene oxide, fentin acetate, fentin hydroxide, flucycloxuron, flucythrinate, formothion, mecarbam, methacryfos, monolinuron, phenothrin, prothion, pyrazophos, quinalphos, resmethrin, tecnazene and vinclozolin in or on certain products. *Official Journal of the European Union.* L145, 1-71.
- European Union. 2016. Commission Regulation (EU) 2017/626 of 31 March 2017 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for acetamiprid, cyantraniliprole, cypermethrin, cyprodinil, difenoconazole, ethephon, fluopyram, flutriafol, fluxapyroxad, imazapic,

- imazapyr, lambda-cyhalothrin, mesotrione, profenofos, propiconazole, pyrimethanil, spirotetramat, tebuconazole, triazophos and trifloxystrobin in or on certain products. Official Journal of the European Union. L96, 1-43.
- European Union. 2017. Commission Regulation (EU) 2017/623 of 30 March 2017 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for acequinocyl, amitraz, coumaphos, diflufenican, flumequine, metribuzin, permethrin, pyraclostrobin and streptomycin in or on certain products. Official Journal of the European Union. L93, 1-29.
- European Union. 2018. Commission Regulation (EU) 2018/687 of 4 May 2018 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for acibenzolar-S-methyl, benzovindiflupyr, bifenthrin, bixafen, chlorantraniliprole, deltamethrin, flonicamid, fluazifop-P, isofetamid, metrafenone, pendimethalin and teflubenzuron in or on certain products. Official Journal of the European Union. L121, 63-104.
- European Union. 2018. Commission Regulation (EU) 2018/832 of 5 June 2018 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for cyantraniliprole, cymoxanil, deltamethrin, difenoconazole, fenamidone, flubendiamide, fluopicolide, folpet, fosetyl, mandestrobin, mepiquat, metazachlor, propamocarb, propargite, pyrimethanil, sulfoxaflo and trifloxystrobin in or on certain products. Official Journal of the European Union. L140, 38-86.
- European Union. 2018. Commission Regulation (EU) 2017/1777 of 29 September 2017 amending Annexes II, III and IV to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB24, *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI 600, clayed charcoal, dichlorprop-P, ethephon, etridiazole, flonicamid, fluazifop-P, hydrogen peroxide, metaldehyde, penconazole, spinetoram, tau-fluvalinate and *Urtica* spp. in or on certain products. Official Journal of the European Union. L253, 1-31.
- European Union. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1015 of 20 June 2019 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for aminopyralid, captan, cyazofamid, flutianil, kresoxim-methyl, lambda-cyhalothrin, mandipropamid, pyraclostrobin, spiromesifen, spirotetramat, teflubenzuron and tetraconazole in or on certain products. Official Journal of the European Union. L165, 23-64.
- Lozano, A., Rajski, L., Uclés, S., Belmonte-Valles, N., Mezcuca, M. and Fernández-Alba, A.R. 2014. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*. 118, 68-83.
- Magnusson, B. and Örnemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. Available from <http://www.eurachem.org>.

- Michel, F., Barrey, E., Stenerson, K., Shimelis, O. and Ye, M. 2015, October 27. Improved sample preparation and HPLC/MS determination of pesticides in fat-rich vegetables. Food Science Asia 2015, Singapore. [Online]. Available source: https://www.researchgate.net/publication/286392284_Improved_sample_preparation_and_HPLCMS_determination_of_pesticides_in_fat-rich_vegetables.
- Rahman, M. M., Abd E.A., A. M., Kim, S.W., Shin, S. C., Shin, H.C. and Shim, J.H. (2017). Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: A review. J. Sep. Sci. 40, 203-212.
- Rejczak, T., Tuzimski T. (2015) A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. Open Chem. 13, 980–101.
- Peng, X.T., Jiang, L., Gong, Y., Hu, X.Z., Peng, L.J. and Feng, Y.Q. 2015. Preparation of mesoporous ZrO₂-coated magnetic microsphere and its application in the multi-residue analysis of pesticides and PCBs in fish by GC–MS/MS. Talanta. 132, 118-125.
- SANTE/12682/2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. [Online]. Available source: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf
- Schenck, F.J., Callery, P., Gannett, P.M., Daft, J.R. and Lehotay, S.J. 2002. Comparison of Magnesium Sulfate and Sodium Sulfate for Removal of Water from Pesticide Extracts of Foods. J. AOAC Int. 85(5), 1177-1180.
- SUN, F., LIN, F.Y., WONG, S.S. and Li, G.C. 2003. The Screening of Organophosphorus, Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Pesticides Residues in Beef Fat by Tandem Solid-Phase Extraction Technique. J Food Drug Anal. 11(3), 258-265.
- The Japan Food Chemical Research Foundation. Maximum Residue Limits (MRLs) of Agricultural Chemicals in Foods. [Online]. Available source: <https://db.ffcr.or.jp/front/>.

ภาคผนวก
ปริมาณตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ (MRL) ของสารกลุ่มไพรีทรอยด์ในไขมันสัตว์

Pesticide	MRL (mg/kg) in animal fat			
	กรมปศุสัตว์ ^(a)	ญี่ปุ่น ^(b)	Reg. (EU)	
Bifenthrin	NL	0.05 (สัตว์ปีก) 3 (สุกร โค)	0.05* (สัตว์ปีก), 3 (สุกร โค กระบือ แกะ แพะ ม้า)	2018/687
Cyfluthrin	NL	1 (สัตว์ปีก) 4 (สุกร) 0.2 (โค)	0.05 (สัตว์ปีก), 0.2 (สุกร โค กระบือ แกะ แพะ ม้า) 0.05 (โค กระบือ แกะ)	2016/1902 37/2010
Cyhalothrin	NL	0.3 (สัตว์ปีก) 0.4 (สุกร โค)	0.01* (สัตว์ปีก), 3 (สุกร โค กระบือ แกะ แพะ ม้า) 0.5 (โค กระบือ)	2021/590 37/2010
Cyphenothrin	NL	NL	NL	-
Cypermethrin	0.05 (สัตว์ปีก) 0.2 (สุกร)	0.1 (สัตว์ปีก) 0.2 (สุกร โค)	0.1 (สัตว์ปีก), 2 (สุกร โค กระบือ แกะ แพะ ม้า) 0.2 (สัตว์เคี้ยวเอื้อง)	2017/626 37/2010
Deltamethrin	0.05 (สัตว์ปีก) 0.5 (สุกร)	0.5 (สัตว์ปีก) สุกร โค	0.1 (สัตว์ปีก), 0.5 (สุกร แกะ แพะ โค กระบือ), 0.5 (ม้า) 0.05 (สัตว์เคี้ยวเอื้อง)	2018/832 37/2010
Etofenprox	NL	1 (สัตว์ปีก) 6 (สุกร โค)	0.04 (สัตว์ปีก), 1.5 (สุกร แกะ แพะ), 2 (โค กระบือ ม้า)	2021/590
Fenpropathrin	NL	0.01 (สัตว์ปีก) 0.03 (สุกร โค)	NL	-
Fenvalerate	NL	0.01 (สัตว์ปีก) 1 (สุกร โค)	0.02* (สัตว์ปีก), 0.03 (สุกร), 0.25 (โค กระบือ), 0.2 (แกะ แพะ ม้า) 0.25 (โค กระบือ)	2015/399 37/2010
Flucytrinate	NL	0.05 (สัตว์ปีก) สุกร โค	0.01* (สัตว์ปีก สุกร แกะ แพะ โค กระบือ และม้า)	2015/868
Fluvalinate	NL	NL	0.03 (สัตว์ปีก), 0.05 (สุกร) 0.3 (แกะ แพะ โค กระบือ และม้า)	2020/785
Permethrin	0.1 (สัตว์ปีก) 0.5 (สุกร)	0.1 (สัตว์ปีก) 1 (สุกร โค)	0.05* (สัตว์ปีก สุกร แกะ แพะ และม้า), 0.5 (โค กระบือ) 0.5 (โค กระบือ แกะ)	2017/623 37/2010
Phenothrin	NL	NL	0.05* (สัตว์ปีก สุกร แกะ แพะ โค กระบือ และม้า)	2015/868
Tetramethrin	NL	NL	NL	-

^(a) คือ ตามประกาศกรมปศุสัตว์ (ประกาศ ณ วันที่ 12 กรกฎาคม 2549)

^(b) คือ ค่า MRL ที่ประกาศโดย The Japan Food Chemical Research Foundation และค้นข้อมูลได้ที่เว็บไซต์ <http://db.ffcr.or.jp/front/>

* คือ Indicates lower limit of analytical determination

NL คือ ไม่มีรายการที่กำหนดไว้