รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรม : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) ไพรีทรอยด์ (Pyrethroid) คาร์บาเมต (Carbamate) และไตรอะซีน (Triazine) ในเนื้อปลา

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development and Validation of method for residue analysis of organophosphate, organochlorine, pyrethroid, carbamate, and triazine in fish tissue

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางมลิสา เวชยานนท์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวจันทิมา ผลกอง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายอำนาจ กะฐินเทศ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในเนื้อปลาที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารหลายชนิดได้ในคราวเดียวนั้นจะต้องมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก เหมาะกับวัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีอยู่ และที่สำคัญต้องให้ผลการทดสอบถูกต้องและแม่นยำ ในการทดลองนี้ จึงได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีนในเนื้อปลา ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในคราวเดียว โดยทำการสกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile ใช้เครื่องปั่นความเร็วรอบสูง (Homogenizer) แยกและกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE ชนิด C_{18} และ florisil ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร แยกตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph ที่มีตัวตรวจวัดแตกต่างกัน ได้แก่ GC-ECD, GC-FPD และ GC-NPD พบว่าให้ผลการทดสอบความแม่น (accuracy) ประเมินจาก %recovery ระหว่าง 70-120% และมีความเที่ยง (precision) ให้ผลการทดสอบ %RSD ระหว่าง 2-18% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ค่า LOD ของวิธีทดสอบมีค่าระหว่าง 0.0005-0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOQ ของการทดสอบสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และกลุ่มออร์กาโนคลอรีนเท่ากับ 0.01 และ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนกลุ่มไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีน เท่ากับ

0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ พบว่ามีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในเนื้อปลาได้

A multiresidue method for determination the pesticide residues in fish that easy procedure and suitable for material and equipment, the results must be accurate and precise. In the present study, the objective was to developed and validated method of pesticide residues of organophosphate, organochlorine, pyrethroid, carbamate and triazine groups in fish tissue. Sample were extracted with acetonitrile, mixed and extracted with homogenizer. The extracts were cleaned up by tandem SPE column of C_{18} and florisil. The final of extracts volume were adjusted exactly to 2 milliliter. Residues were determined by different detector of gas chromatography; electron capture detector, flame photometric detector and nitrogen phosphorus detector. Accuracy and precision of method were within acceptable range, %recovery between 70 and 120%, %RSD between 2 and 18%. Limit of detection for test method from 0.0005 to 0.005 mg/kg. Limit of quantitation of test method for organophosphate and organochlorine groups were 0.01 and 0.003 mg/kg, respectively. And the limit of quantitation for pyrethroid, carbamate, and triazine groups were 0.02 mg/kg. All of the performance characteristics were showed that this pesticide residues method in fish is intended for operating in laboratory.

6. คำนำ

ปัญหาสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างและสะสมในห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะสัตว์น้ำชนิดปลาที่เป็นแหล่งอาหารสำคัญของมนุษย์นั้น จะทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ในทางตรงคือ เมื่อปลาได้รับสารพิษ จำนวนและชนิดของปลาจะลดลง ส่วนทางอ้อมจะทำให้ผู้บริโภคในลำดับถัดๆ ไปได้รับสารพิษที่สะสมในเนื้อเยื่อของปลาเหล่านี้ไปด้วย (Garcia et al., 2003) การได้ทราบข้อมูลปริมาณการตกค้างของสารในเนื้อเยื่อปลา จึงมีความสำคัญสำหรับการบริโภคอาหารที่มีความปลอดภัย รวมไปถึงจะได้หาแนวทาง หรือวิธีการในการลดการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์นั้นร่วมกันต่อไป

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในเนื้อปลาเพื่อให้ทราบปริมาณที่ถูกต้องนั้น มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน รวมทั้งวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง เนื่องจากในส่วนของเนื้อเยื่อปลามีส่วนประกอบของไขมันแตกต่างกันไป ตามชนิดของปลา (ประภาศรี และครรชิต, 2547) ซึ่งในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างจะต้องทำการกำจัดออกให้หมด รวมถึงในเนื้อเยื่อปลานั้น มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน (Mohanty et al., 2014) ที่เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่จะไปรบกวนการตรวจวิเคราะห์สารพิษที่มีไนโตรเจน (-N) เป็นส่วนประกอบ ฉะนั้นจะต้องมีวัสดุและวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนจะต้องปรับสภาวะในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชนี้ จากการศึกษาของ Mercedes et al. (2012) พบว่าปริมาณของไขมันในเนื้อปลาที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิดนั้น ไม่มีผลต่อวิธีการสกัดสารพิษในตัวอย่าง แต่ matrix ของตัวอย่างจะรบกวน

ปริมาณการตรวจวัดสารบางชนิด วิธีทดสอบของ AOAC (1995) ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในตัวอย่างปลาที่มีไขมันสูง ได้ใช้ SPE ต่อกัน พบว่าจะสามารถแยกและกำจัดไขมันอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งต่อมา SUN et al. (2000) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบชนิด alachlor และ trifluralin ในเนื้อปลา 9 ชนิด แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามปริมาณของไขมันที่มีในเนื้อปลา ได้แก่ มีปริมาณน้อยกว่า 10% มีปริมาณมากกว่า 10% แต่น้อยกว่า 20% และมากกว่า 20% ใช้ acetonitrile เป็นสารสกัด กำจัดสิ่งปนเปื้อน และไขมัน ด้วย C_{18} และ florisil ต่อซ้อนเข้าด้วยกัน ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมาของสารระหว่าง 73.4-119.6% นอกจากนี้ Wittayanan et al. (2019) ได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของการวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน 22 ชนิดในตัวอย่างสัตว์น้ำชนิดปลาและกุ้ง โดยการดัดแปลง QuEChERS มีการใช้ SPE แบบจำเพาะที่มีราคาแพงสำหรับกำจัดไขมัน ทั้งนี้พบว่างานวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพียงบางกลุ่มหรือบางชนิดเท่านั้น เช่น กลุ่มออร์กาโนคลอรีน ซึ่งยังไม่ครอบคลุมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในกลุ่มอื่น ๆ

สำหรับการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีน ในเนื้อปลาที่ได้ทำการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะกับวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่มีอยู่ โดยให้ผลการทดสอบเป็นที่ยอมรับ และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการได้

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ ได้แก่ beaker, cylinder, round bottom flask, filter paper No. 1, vial for auto sampler, micro-pipette, buchner funnel, volumetric flask, pasture pipette, graduated tube, laboratory bottle และ desiccator
2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ
   2.1 สารเคมีชนิด analytical grade ได้แก่ อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile; C_2H_3N), อะซีโตน (acetone; C_3H_6O), เฮกเซน (hexane; C_6H_{14}), แอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate; anh. Na_2SO_4), เอทิล อะซิเทต (ethyl acetate; $C_4H_8O_2$) วัสดุสำหรับสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (solid phase extraction cartridge) ชนิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีอะตอมคาร์บอน 18 ตัว (C_{18} SPE cartridge) และ ชนิด florisil (MgO_3Si) ขนาด 500 มิลลิกรัม 6 มิลลิลิตร
   2.2 สารมาตรฐาน pesticide grade ความบริสุทธิ์สูง
      2.2.1 กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 10 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, diazinon, EPN, ethion, malathion, methidathion, parathion methyl, pirimiphos methyl, profenofos และ triazophos
      2.2.2 กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 16 ชนิด ได้แก่ aldrin, α-BHC, α-endosulfan, β-endosulfan, dieldrin, endosulfan sulfate, endrin, γ-BHC, heptachlor, heptachlor epoxide, *o,p′*-DDE, *p,p′*-DDE, *o,p′*-TDE, *p,p′*-TDE, *o,p′*-DDT และ *p,p′*-DDT

2.2.3 กลุ่มไพรีทรอยด์ 4 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, cypermethrin, fenvalerate และ permethrin

2.2.4 กลุ่มคาร์บาเมต 2 ชนิด ได้แก่ carbofuran และ promecarb

2.2.5 กลุ่มไตรอะซีน 3 ชนิด ได้แก่ ametryn, atrazine และ metribuzin

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่ง (analytical balance) เครื่องกรองระบบสุญญากาศ (vacuum filtration apparatus) เครื่องปั่นผสมตัวอย่าง (homogenizer) และเครื่อง gas chromatograph ชนิดตัวตรวจวัด electron capture detector (GC-μECD), flame photometric detector (GC-FPD) และ nitrogen phosphorus detector (GC-NPD)
4. ตัวอย่างเนื้อปลาบดละเอียดสำหรับใช้ทดสอบ ได้แก่ ปลานิล (Oreochromis niloticus) ปลาดุก (Clarias batrachus) และ ปลาช่อน (Channa striata)

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย stock standard solution ของสารพิษแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นประมาณ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม Intermediate standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมของแต่ละกลุ่มให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.01-5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปรับสภาพการทำงานของเครื่อง GC เพื่อตรวจวิเคราะห์สารในแต่ละกลุ่มดังนี้

2.1 ทดสอบสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ปรับสภาพการใช้เครื่องดังนี้

Column : DB-5, 30 m length x 0.25 mm id. x 0.25 μm film thickness

Detector : FPD, Injection mode : splitless

Temperature conditioning: injector = 230 °C, detector = 250 °C

Oven program : 85 °C (2 min) $\xrightarrow{25\,^{\circ}C/min}$ 150 °C (0 min) $\xrightarrow{2\,^{\circ}C/min}$ 190 °C (0 min) $\xrightarrow{3\,^{\circ}C/min}$ 220 °C (0 min) $\xrightarrow{3\,^{\circ}C/min}$ 250 °C (2 min)

Carrier gas : helium flow 1.4 ml/min

Ignite gas : hydrogen 150 ml/min, air 110 ml/min

Injection volume : 1 μL, run time: 46.60 min

2.2 ทดสอบสารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และกลุ่มไพรีทรอยด์ ปรับสภาพการใช้เครื่องดังนี้

Column : DB-1701, 30 m length x 0.32 mm id. x 0.25 μm film thickness

Detector : μECD, Injection mode: splitless

Temperature conditioning : injector = 230 °C, detector = 300 °C

Oven program : 80 °C (1 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 220 °C (2 min) $\xrightarrow{1\,^{\circ}C/min}$ 235 °C (1 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 240 °C (1 min) $\xrightarrow{25\,^{\circ}C/min}$ 265 °C (12 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 280 °C (8 min)

Carrier : helium flow 1.4 mL/min

Injection volume : 1 µL, run time: 49 min

2.3 ทดสอบสารพิษกลุ่มคาร์บาเมต และไทรอะซีน ปรับสภาพการใช้เครื่องดังนี้

Column : DB-35, 30 m length x 0.25 mm id. x 0.25 µm film thickness

Detector : NPD, Injection mode : pulsed splitless

Temperature conditioning : injector = 230 °C, detector = 300 °C

Oven program : 55 °C (1 min) $\xrightarrow{10\,^{\circ}C/min}$ 195 °C (2 min) $\xrightarrow{10\,^{\circ}C/min}$ 230 °C (1 min) $\xrightarrow{20\,^{\circ}C/min}$ 250 °C (1 min) $\xrightarrow{15\,^{\circ}C/min}$ 280 °C (1 min)

Carrier gas : helium flow 1.4 ml/min

Ignite gas : hydrogen 2 ml/min, air 120 ml/min

Injection volume : 1 µL, run time: 26.5 min

3. การพัฒนาวิธีการทดสอบ

ดัดแปลงวิธีการทดสอบของ SUN et al. (2000) ใช้สารสกัดเป็น acetonitrile สกัดโดยเครื่องปั่นผสมตัวอย่าง (Homogenizer) กำหนดเกณฑ์การยอมรับ %recovery อยู่ในช่วง 70-120% (SANTE/11813, 2017) โดยมีขั้นตอนการทดสอบตัวอย่างดังนี้

3.1 ชั่งเนื้อปลาบดละเอียด 10 กรัม เติม acetonitrile 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วย homogenizer นาน 1 นาที กรองด้วยระบบสุญญากาศ ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย acetonitrile 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ลดปริมาตรเกือบแห้ง เติม acetonitrile 5 มิลลิลิตร นำไปกำจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ตามข้อ 3.2

3.2 การกำจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ใช้ SPE ชนิด C_{18} ต่อกับ SPE ชนิด florisil (C_{18} อยู่ด้านบน) ที่บรรจุเพิ่มด้วย anh. $NaSO_4$ 2 กรัม ล้างคอลัมน์ด้วย acetonitrile 6 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจากข้อ 3.1 ใส่คอลัมน์ ปรับอัตราการไหล 3 หยดต่อวินาที เก็บใน graduated tube นำไปลดปริมาตรด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร แบ่งสารสกัด 1 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรเกือบแห้ง และปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) เป็น 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมท และไตรอะซีน สารสกัดที่เหลือ 1 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรเกือบแห้ง และปรับปริมาตรด้วย hexane (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร เพื่อตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและไพรีทรอยด์

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Magnusson & Ornemark, 2014)

4.1 หาช่วงความสามารถของวิธีทดสอบที่ทำให้ผลการทดสอบเปนสัดสวนกับความเขมขนของสารทดสอบในชวงความเขมขนที่กำหนด (range/linearity)

4.1.1 หา range โดยทดสอบ reagent blank และ fortified sample 8 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 1 ซ้ำ Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample (แกน X) กับ response (แกน Y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

4.1.2 หา linearity โดยทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้นภายใน range ของการทดสอบ 6 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fortified

sample (แกน X) กับ response (แกน Y) คำนวณ correlation of determination (R^2) กำหนดเกณฑ์การยอมรับ $R^2 \geq 0.995$

4.2 ตรวจสอบความแม่นของวิธีทดสอบ ที่ให้ผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิง (accuracy) โดยใช้วิธีการตรวจสอบค่าคืนกลับ (recovery test) ดังนี้ ทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ ระดับต่ำ กลาง และสูง ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ของผลทดสอบที่ลบค่า reagent blank ของ sample blank (X_1) ประเมิน accuracy จากค่า recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(X_2 - X_1)}{C_{fortified}} \times 100$$

โดยที่ $C_{fortified}$ = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

กำหนดเกณฑ์การยอมรับ %recovery 70-120% (SANTE/11813, 2017)

4.3 ตรวจสอบความเที่ยงของวิธี (precision)

โดยการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ ($\bar{X}$) และ SD ของผลการทดสอบ คำนวณ %RSD; $\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$ กำหนดเกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤20% (SANTE/11813, 2017)

4.4 หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of determination; LOD)

ทำการทดสอบ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ และทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จำนวน 10 ซ้ำ ประเมินค่า LOD จาก Signal to Noise Ratio; S/N Ratio กำหนดค่าการยอมรับการตรวจวัด S/N ratio ≥ 3

4.5 หาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ (Limit of quantitation; LOQ)

ทำการทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOQ ของวิธีทดสอบที่แท้จริง อ้างอิงจากความเข้มข้นของวิธีทดสอบที่ระดับใกล้เคียงหรือต่ำกว่า 10 S/N ratio โดยทดสอบ fortified sample ประเมิน accuracy และ precision ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ recovery มีค่า 70-120% และค่า %RSD ≤20%

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 **สิ้นสุด** กันยายน 2562

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากวิธีทดสอบของ SUN et al. (2000) ที่ใช้วิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในปลาที่มีปริมาณไขมันแตกต่างกัน ใช้สารเคมีสกัดเป็น acetonitrile สกัดโดยเครื่องปั่นผสมตัวอย่าง (Homogenizer) แยกและกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE ชนิด C_{18} และ florisil ขนาด 6 มิลลิลิตร 1000 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC นั้น ในการพัฒนาวิธีทดสอบนี้ได้ทำการดัดแปลง โดยเปลี่ยนขนาดและปริมาณของตัวแยกและกำจัดสิ่งปนเปื้อน SPE ชนิด

C18 และ florisil เป็น 6 มิลลิลิตร 500 มิลลิกรัม รวมทั้งปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร ใช้ปลานิล (Oreochromis niloticus) ซึ่งมีปริมาณไขมัน <2 กรัม/100 กรัม (ประภาศรี และครรชิต, 2547) เป็นตัวอย่างทดสอบ (sample blank) ซึ่งพบว่าให้ผลการทดสอบมี %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 70-120% (SANTE/11813, 2017)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของสารพิษตามพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารในช่วงทดสอบและสัญญาณการตรวจวัด (range/linearity) ได้ผลการทดสอบดังนี้ กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ มีช่วงการตรวจวิเคราะห์สำหรับใช้งานที่ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง (working range) ที่ 0.01-0.20, 0.003-0.05 และ 0.02-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนกลุ่มคาร์บาเมต และไตรอะซีน มี working range ที่ 0.02-0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณของการตรวจวัดแล้ว พบว่าทุกกลุ่มสารมีค่า correlation of determination (R^2) ระหว่าง 0.995-0.999 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

ผลการตรวจสอบความแม่น (accuracy) ของวิธี จากการประเมิน %recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง พบว่าทุกกลุ่มสารให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 70-120% (SANTE/11813, 2017) โดยกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีน ให้ผลการทดสอบ %recovery อยู่ระหว่าง 83-120, 70-115, 77-100, 72-110 และ 70-97% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิด parathion methyl และ malathion ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการทดสอบ %recovery ค่อนข้างสูงคือ 116-120 และ 111-118% ตามลำดับ นอกจากนี้สารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิด aldrin และ *o,p'*-DDE ที่ความเข้มข้นระดับกลาง 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และชนิด α-endosulfan ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ต่ำคือ 70% เช่นเดียวกับชนิด β-endosulfan ทั้งความเข้มข้นระดับกลาง และสูง 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลจากในการทดสอบตัวอย่างนั้น จะเป็นการเติมสารมาตรฐานที่เตรียมแบบผสมหลายชนิดเติมในตัวอย่าง สารบางชนิดมีการสลายตัวให้สารชนิดอื่น เช่น aldrin สลายเป็น dieldrin (Hamilton, 1961) เป็นต้น เช่นเดียวกับสารชนิด α และ β-endosulfan ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารชนิด endosulfan sulfate อย่างไรก็ตามผลการทดสอบ %recovery นี้ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (precision) พบว่าทุกกลุ่มสารมี %RSD อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ≤20% (SANTE/11813, 2017) คือระหว่าง 2-18% โดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตชนิด profenofos ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นมี %RSD ค่อนไปทางสูงระหว่าง 10-18% ทั้งนี้สารดังกล่าวมีผลการทดสอบที่ค่อนข้างแปรปรวน ซึ่งมาจาก sensitivity ของสารที่ค่อนข้างต่ำ ค่าที่วัดได้ในแต่ละซ้ำให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) ของสารพิษกลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีค่าเท่ากับ 0.0005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีน เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้ผลการทดสอบ S/N ratio ≥3 ส่วนปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ โดยให้ค่าที่ถูกต้อง และแม่นยำ (LOQ) พบว่ากลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และออร์กาโนคลอรีนมีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม

ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีน 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสรุปผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีดังแสดงใน Table 1.

นอกจากนี้ ได้นำวิธีการทดสอบที่ได้พัฒนา และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในตัวอย่างเนื้อปลาไปทดสอบในเนื้อชนิดอื่นๆ ได้แก่ ปลาดุก (Clarias batrachus) และปลาช่อน (Channa striata) ซึ่งมีปริมาณไขมันสูง 8-20 กรัม/100 กรัม (ประภาศรี และครรชิต, 2547) พบว่าให้ผลการทดสอบอยู่ระหว่างที่ 70-118% นั่นคืออยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างปลาชนิดอื่นๆ ได้ โดยสามารถสรุปขั้นตอนการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างเนื้อปลาดังรายละเอียดใน Figure 1.

Table 1. Summary of analytical method validation results for pesticide residues in fish tissue

Pesticide group	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Range (mg/kg)	Correlation of determination (R^2)	%Recovery			%RSD		
					low 0.003-0.02 (mg/kg)	medium 0.01-0.05 (mg/kg)	high 0.05-0.50 (mg/kg)	low 0.003-0.02 (mg/kg)	medium 0.01-0.05 (mg/kg)	high 0.05-0.50 (mg/kg)
Organophosphate										
diazinon	0.005	0.010	0.01-0.20	0.999	90	89	104	6	7	7
pirimiphos methyl	0.005	0.010	0.01-0.20	0.998	105	104	120	6	6	6
chlorpyrifos	0.005	0.010	0.01-0.20	0.998	110	106	116	6	6	6
parathion methyl	0.005	0.010	0.01-0.20	0.997	116	119	120	6	7	7
malathion	0.005	0.010	0.01-0.20	0.998	118	111	115	5	6	8
methidathion	0.005	0.010	0.01-0.20	0.995	95	100	113	8	7	8
profenofos	0.005	0.010	0.01-0.20	0.995	85	72	102	18	12	10
ethion	0.005	0.010	0.01-0.20	0.995	91	81	78	12	6	6
triazophos	0.005	0.010	0.01-0.20	0.998	97	116	93	10	6	8
EPN	0.005	0.010	0.01-0.20	0.999	102	119	102	12	7	7
Organochlorine										
α-BHC	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	92	81	88	3	3	3
γ-BHC	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	98	85	96	5	2	2
heptachlor	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	102	86	94	4	3	3
aldrin	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	81	70	78	3	3	3
heptachlor epoxide	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	81	73	83	3	2	2
o,p' -DDE	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.997	92	103	106	9	9	9
α-endosulfan	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.996	70	72	84	7	3	3
p,p' -DDE	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	88	72	80	3	2	2
dieldrin	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	87	74	82	3	2	2
o,p' -TDE	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	82	70	76	6	2	2
endrin	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	91	75	91	6	3	3
o,p' -DDT	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	95	81	94	4	3	3
p,p' -TDE	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	84	71	75	3	2	2
β-endosulfan	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	75	70	70	4	7	7
p,p' -DDT	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	94	90	115	7	3	3
endosulfan sulfate	0.0005	0.003	0.003-0.05	0.995	73	84	95	9	3	3

Table 1. Summary of analytical method validation results for pesticide residues in fish tissue (cont')

Pesticide group	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Range (mg/kg)	Correlation of determination (R^2)	%Recovery			%RSD		
					low 0.003-0.02 (mg/kg)	medium 0.01-0.05 (mg/kg)	high 0.05-0.50 (mg/kg)	low 0.003-0.02 (mg/kg)	medium 0.01-0.05 (mg/kg)	high 0.05-0.50 (mg/kg)
Pyrethroid										
bifenthrin	0.005	0.020	0.02-0.50	0.998	80	78	77	3	4	3
permethrin	0.005	0.020	0.02-0.50	0.995	100	80	84	13	6	3
cypermethrin	0.005	0.020	0.02-0.50	0.995	101	79	92	5	5	2
fenvalerate	0.005	0.020	0.02-0.50	0.995	100	83	100	5	4	3
Carbamate										
carbofuran	0.005	0.020	0.02-0.20	0.995	105	84	92	6	8	6
promecarb	0.005	0.020	0.02-0.20	0.998	117	96	101	6	10	5
Triazine										
ametryn	0.005	0.020	0.02-0.20	0.995	71	70	70	10	8	9
atrazine	0.005	0.020	0.02-0.20	0.997	72	93	82	6	13	5
metribuzin	0.005	0.020	0.02-0.20	0.995	93	116	97	7	7	4

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีนในเนื้อปลา โดยสกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile ใช้เครื่องปั่นความเร็วรอบสูง (Homogenizer) แยกและกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE ชนิด C_{18} และ florisil ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC พบว่าให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการได้ อย่างไรก็ตามหากนำวิธีนี้ไปใช้จะต้องมีการทวนสอบวิธี (verify) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของเครื่องมือของห้องปฏิบัติการนั้น ๆ อีกครั้ง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากวิธีที่พัฒนาและได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้ดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับวัสดุและอุปกรณ์ที่มีอยู่ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ฉะนั้นวิธีนี้จึงเป็น in-house method ของห้องปฏิบัติการที่สามารถใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน ไพรีทรอยด์ คาร์บาเมต และไตรอะซีนในเนื้อปลา สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร รวมถึงห้องปฏิบัติการและผู้สนใจอื่นๆ สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในเนื้อปลาได้

11. เอกสารอ้างอิง

ประภาศรี ภูวเสถียร และครรชิต จุดประสงค์. 2547. ปลาที่นิยมบริโภค: สารอาหารหลัก กรดไขมัน และคอเลสเตอรอล, ***วารสารโภชนาการ***, ปีที่ 39 ฉบับที่ 3, น. 5-8.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC).1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed., Arlington, VA, USA. sec 970.52

Garcia, S.M., A. Zerbi, C. Aliaume, T. Do Chi, and G. Lasserre. 2003. ***The ecosystem approach to fisheries.*** Issues, terminology, principles, institutional foundations, implementation and outlook. FAO Fisheries Technical Paper. No. 443. Rome, FAO. 2003. 71 p. [On line]. Available from: http://www.fao.org/3/y4773e/y4773e05.htm#bm05 (January 10, 2020)

Hamilton, E. W. 1961. Metabolism of aldrin and dieldrin by the American cockroach, Periplaneta Americana (L). [Online]. Available from: https://lib.dr.iastate.edu/rtd/2405 (December 20, 2019)

Magnusson, B. and U. Ornemark, (eds.). 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed. [Online]. Available from: https://www.eurachem.org (January 20, 2018)

Mercedes, C., E. Carbonell, C. González and A. Miralles-Marco. 2012. Pesticide Residue Analysis in Animal Origin Food: Procedure Proposal and Evaluation for Lipophilic Pesticides, Pesticides-Recent Trends in Pesticide Residue Assay, R.P. Soundararajan, IntechOpen, DOI: 10.5772/48665. [Online]. Available from: https://www.intechopen.com/books/pesticides-recent-trends-in-pesticide-residue-assay/ pesticide-residue-analysis-in-animal-origin-food-procedure-proposal-and-evaluation-for-lipophilic-pe (January 10, 2019)

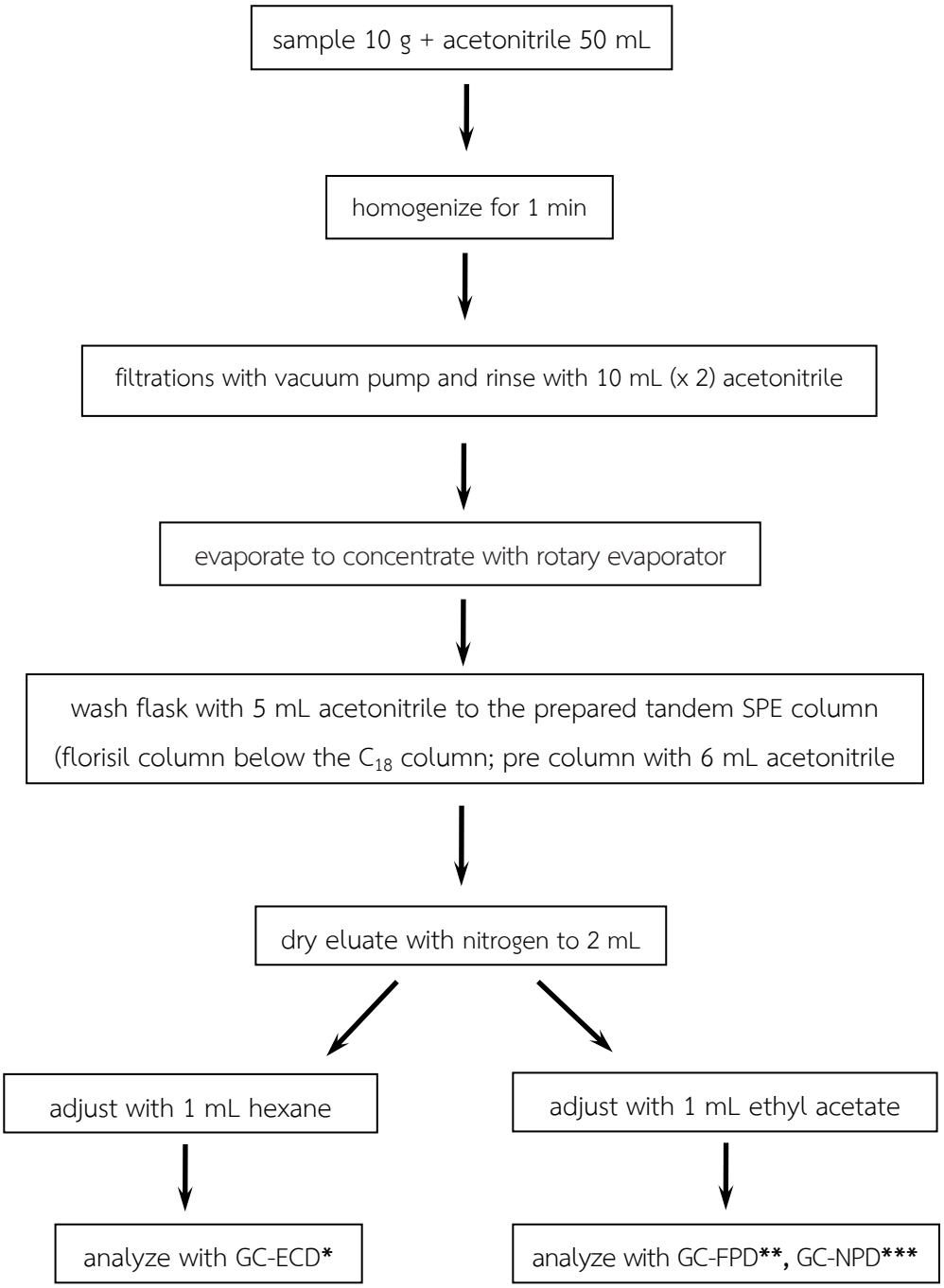
Mohanty, B., A. Mahanty, S. Ganguly, T.V. Sankar, K. Chakraborty, A. Rangasamy, B. Paul,D. Sarma, S.Mathew, K. K. Asha, B.Behera, Md. Aftabuddin, D. Debnath, P. Vijayagopal, N. Sridhar, M.S. Akhtar, N.Sahi, T. Mitra, S. Banerjee, P. Paria, D. Das, P. Das, K. K. Vijayan, P.T. Laxmanan, and A.P. Sharma. 2014. Amino Acid Compositions of 27 Food Fishes and Their Importance in Clinical Nutrition. ***Amino Acids*** Volume 2014, Article ID 269797:1-7. [On line]. Available from: http://dx.doi.org/10.1155/2014/269797 (September 10, 2019)

SANTE/11813.2017. Implemented by 01/01/2020. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. [Online]. Available from: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf (December 15, 2018)

Sun, F., F.Y. lin, S.S. wong, and G.C. Li. 2000. Determination of organochlorine and Nitrogen-Containing Pesticides in Fish with Different Fat Content. ***Food and Drug Analysis.*** 8(2):103-111.

Wittayanan, W., S. Rattiyakorn and C. Thoranit. 2019. Determination of Organochlorine Pesticide and Polychlorinated Biphenyl as POPs Residues in Freshwater Animals in Thailand during 2017-2018. ***Science & Technology Asia*** Vol. 24 No.3 July-September 2019:27-38.

12. ภาคผนวก



Remark: * Organochlorine and Pyrethroid**;** ** Organophosphate; *** Carbamate and triazine

Figure 1. Analytical procedures for determining organophosphate, organochlorine, pyrethroid, Carbamate, and triazine in fish tissue