

การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสตกค้างหลายชนิดพร้อมกัน
 ในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดเอฟพีดี
 Multiresidue Method for Determination of Organophosphorous Pesticide Residues
 in Animal Origin Foods by Gas Chromatograph - Flame Photometric Detector (GC-FPD)

วีรวุฒิ วิทยานันท์* และ รัตติยากร ศรีโคตร

Weerawut Wittayanan* and Rattiyakorn Srikote

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences

Received : 17 March 2016

Accepted : 19 June 2016

Published online : 29 June 2016

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างหลายชนิดพร้อมกันอย่างง่าย และรวดเร็วเพื่อใช้วิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (OP) ในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดเอฟพีดี (GC-FPD) สารกลุ่ม OP ถูกสกัดออกจากอาหารด้วยอะซีโตนไนโตรล์ เติมไดคลอโรมีเทนและโซเดียมคลอไรด์แล้วกรองเอาของแข็งออก เติมน้ำโซเดียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำ ระเหยจนเกือบแห้งแล้วละลายและปรับปริมาตรด้วยอะซีโตนก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FPD ได้ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยใช้สารกลุ่ม OP 22 ชนิด ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ปลาแห้ง ปลาร้า และจิ้งหรีดทอด ที่ระดับ 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสามารถตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 13 ชนิดในเกณฑ์ยอมรับ (% recovery 60-120%, HORRAT<2) มีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เป็น 0.03 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นวิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม OP ในอาหาร ระหว่างปี พ.ศ.2554-2558 จำนวน 133 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างของ trichlorfon เพียงชนิดเดียว ปริมาณ <0.1-34.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างปลาแห้งจำนวน 32 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 24 บ่งชี้ว่าปัญหาการใช้สาร trichlorfon อย่างผิดวิธียังคงมีอยู่ ซึ่งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการกำกับติดตามเพื่อแก้ปัญหาอย่างเป็นระบบ

คำสำคัญ : การวิเคราะห์สารหลายชนิดพร้อมกัน สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส อาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ แก๊สโครมาโทกราฟี

*Corresponding author. E-mail : weerawut.w@dmsc.mail.go.th

Abstract

A rapid and simple multiresidue method has been developed and validated for determination of organophosphorous (OP) pesticide residues in animal origin foods by gas chromatograph - flame photometric detector (GC-FPD). The pesticides were extracted from food product samples with acetonitrile and homogenized by using a shaker. Dichloromethane (CH_2Cl_2) and sodium chloride (NaCl) were added to the extract followed by filtration to remove solid residue. Water residue in the filtrate layer was removed by adding anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4). After removal of the solvent, the residue was dissolved to reconstitute in acetone. The final extract of test solution was subjected to GC-FPD. Recovery tests of 22 pesticides in three kinds of foods; dried fish, fermented fish and fried crickets were performed at three different fortification levels of 0.1, 0.5 and 1 mg/kg and 13 pesticides showed acceptable recoveries (60-120%) and repeatability ($\text{HORRAT} < 2$). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) of the method are 0.03 and 0.1 mg/kg, respectively. The developed method was applied to determine OP pesticides in real samples. One hundred and thirty-three food samples were analyzed during 2011 to 2015. Residual trichlorfon was detected at < 0.01 -34.1 mg/kg in 32 samples of dried fish (24%). These results indicated that the problem of miss used trichlorfon still exists. The relevant authorities should be concerned to solve systematically the problem.

Keywords: Multiresidue analysis, Organophosphorous pesticide, Animal origin food,

Gas chromatography

บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิต และลดการสูญเสียจากศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง (Pico *et al.*, 2000) สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (OP) เป็นสารที่นำมาใช้แทนสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนเนื่องจากเป็นสารที่มีความคงตัวไม่สูงมาก มีการตกค้างและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า แต่เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (Sultatos, 1994) จึงทำให้เป็นพิษต่อมนุษย์เช่นกัน สารในกลุ่ม OP มีความหลากหลายของคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมี เช่น ความมีขี้ การละลายน้ำ และบางชนิดสามารถสะสมในไขมันของสัตว์และห่วงโซ่อาหารได้ (Bentabol *et al.*, 1995) ในอดีตพบปัญหาการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในประเทศไทย โดยในปี พ.ศ.2534-2536 (Thoophom *et al.*, 1995) และ ปี พ.ศ.2549 (Lertruengdej *et al.*, 1997) มีรายงานของกองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบการตกค้างของสาร trichlorfon ในปลาแห้งและปลาเค็ม ต่อจากนั้นสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้ตรวจวิเคราะห์อาหารในปี พ.ศ.2553 พบการตกค้างของสารดังกล่าวอีกครั้งในปลาร้า (Atisook, 2010; Park *et al.*, 2006) การตรวจพบสาร trichlorfon นี้เป็นปัญหาการใช้สารกำจัดศัตรูพืชผิดประเภท (misuse) ในการกำหนดหนดอนแมลงวันในผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง ปลาเค็ม และปลาร้า นอกจากกรณีการตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าวแล้วยังพบการตกค้างของสารกลุ่ม OP ในแมลงที่ใช้เป็นอาหาร

เกษตรกรบางรายใช้สารกำจัดศัตรูพืชในการฉีดพ่นดักจับแมลง เกิดการตกค้างสะสมและเป็นพิษต่อผู้บริโภคดังเช่นกรณีผู้ป่วยเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลต่างๆในเขตภาคใต้หลังจากการบริโภคแมลงทอดเมื่อปี พ.ศ.2551 จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่าในช่วงเวลา 20 ปี สารเคมีกลุ่ม OP ชนิดที่เป็นปัญหาตกค้างคือสาร trichlorfon ซึ่งมีวิธีวิเคราะห์จำเพาะ และการตกค้างของสารกลุ่ม OP ชนิดอื่นๆในแมลงที่ใช้เป็นอาหาร ดังนั้นเพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร trichlorfon และ สารกลุ่ม OP ชนิดอื่นๆได้พร้อมกันแบบ multiresidue method ให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก รวดเร็วและสามารถตอบสนองสถานการณ์ฉุกเฉินได้ รวมทั้งเพื่อเป็นการสร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคต่อความปลอดภัยจากการตกค้างของสารเคมีทางการเกษตรดังกล่าวจึงต้องมีการตรวจติดตามอย่างสม่ำเสมอ โดย พ.ร.บ.อาหาร ปี พ.ศ.2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 288) พ.ศ.2548 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง ได้กำหนดค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residual Limit, MRL) ของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม OP ไว้ในชนิดอาหารที่เป็นวัตถุดิบแยกตามชนิด (commodity) แต่ไม่ได้กำหนดค่า MRL ในผลิตภัณฑ์อาหารที่แปรรูปแล้ว ดังนั้นในอาหาร เช่น ปลาแห้ง ปลาเค็ม ปลาร้า และแมลงทอดจึงไม่ควรมีการตกค้างของสารกลุ่ม OP

การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสนั้นมักใช้เครื่อง gas chromatograph (GC) ที่มี flame photometric detector (FPD) หรือสารบางชนิดที่มีทั้งฟอสฟอรัสและคลอรีนเป็นองค์ประกอบอาจตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้ electron capture detector (ECD) ในบางกรณีมีการใช้ mass spectrometry detector (MSD) เพื่อเพิ่ม selectivity แต่ในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์จะมีสารไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) เป็นองค์ประกอบทำให้มี background interference ในเครื่องมือ GC-MSD มากกว่า (Lehotay *et al.*, 2001) ความยุ่งยากของการวิเคราะห์สารเคมีกลุ่ม OP ในอาหารที่มีไขมัน (fatty food) เกิดจากหลายสาเหตุ เช่น สารเคมีกลุ่มนี้บางชนิดเป็นสารที่มีความไวต่ออุณหภูมิ (thermally labile) ทำให้เกิดการสลายตัวเมื่อวิเคราะห์โดย GC (Ngoh *et al.*, 1996) จึงต้องมีการปรับสภาวะเครื่องมือให้เหมาะสม ปัญหาการวิเคราะห์อาจเกิดจากปริมาณไขมันแม้เพียงเล็กน้อยสามารถรบกวนเครื่องมือวิเคราะห์และทั้งระบบการวิเคราะห์จะสูญเสียลง (Khay *et al.*, 2010) เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของไขมันในคอลัมน์ ต้องมีการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดและผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ที่เหมาะสมก่อนการวิเคราะห์เพื่อกำจัดไขมันออกแต่หากใช้คอลัมน์ ชนิด florisil หรือ silica สารทั้งสองชนิดจะดูดซับสารกลุ่ม OP ไว้ทำให้ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ต่ำและไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ (Zrostlíková *et al.*, 2002) ขั้นตอนเหล่านี้เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองทรัพยากร และมีประสิทธิภาพต่ำ จึงต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นโดยการปรับปรุงจากวิธีของ ยูวดี เลิศเรืองเดช และคณะ โดยเพิ่มชนิดสารมาตรฐานกลุ่ม OP ที่ใช้วิเคราะห์ให้สามารถวิเคราะห์ได้หลายชนิดพร้อมกัน และเนื่องจาก acetone ให้ปริมาณ co-extractive สูง จึงเปลี่ยนตัวทำละลายในการสกัดเป็น acetonitrile เพื่อลดพีคของสารรบกวน มีการปรับวิธีการสกัดตัวอย่างทำให้สามารถขยายขอบข่ายชนิดตัวอย่างในการวิเคราะห์ได้มากขึ้น เพิ่มการใช้เครื่องเย้าทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และในขณะเดียวกันก็ลดขั้นตอนการปั่นตัวอย่างลง (homogenization) วิธีที่ได้้นอกจากต้องเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ครอบคลุมสารกลุ่ม OP หลายชนิดพร้อมกันและต้องมีความถูกต้องของการวิเคราะห์สูงแล้วยังต้องสามารถลดผลกระทบของไขมันที่มีต่อระบบการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทำขึ้นเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในอาหารด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดเอฟพีดี วิธีที่พัฒนาขึ้นและผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้วจะถูกนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการตกค้างในตัวอย่างจริง เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : acetonitrile (HPLC) และ acetone (HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของ J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา dichloromethane (HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Burdick&Jackson ประเทศเกาหลีใต้ sodium chloride (AR) และ sodium sulfate anhydrous (granular AR) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Fisher Chemical ประเทศอินเดีย Na_2SO_4 เเผาที่อุณหภูมิ 600°C อย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วเก็บในภาชนะแก้วสีขาปิดสนิท กระจกทรง No.2 สำลี ต้องล้างโดยแช่ใน acetone จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ชั่วโมง และ n-hexane จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ชั่วโมง แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเก็บในขวดสีชา

สารมาตรฐาน (Standards) : Organophosphorus compounds จำนวน 22 สาร ได้แก่ acephate, azinphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon, diclorvos, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, parathion-methyl, pirimiphos-methyl, phosalone, profenofos, prothiofos, triazophos และ trichlorfon สารทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer บริษัท Dr. Ehrenstorfer GmbH ประเทศเยอรมนี ความบริสุทธิ์ (purity) ระหว่าง 94.0-99.0%

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Stock solution) เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานแต่ละชนิดความเข้มข้นประมาณ 250-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน acetone โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิน้อยกว่า -4°C สำหรับ Intermediate และ working solution เตรียมสารละลาย trichlorfon ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน acetone โดยเปิด stock solution ของ trichlorfon 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone และเตรียมสารละลาย working solution ของ trichlorfon ช่วงความเข้มข้น 0.2, 1, 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิน้อยกว่า -4°C ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์ และเตรียมสารละลายผสมของสารมาตรฐานอื่นๆอีก 21 ชนิด ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน acetone โดยเปิด stock solution สารมาตรฐานแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone และเตรียมสารละลายผสมของสารมาตรฐาน 21 ชนิด ช่วงความเข้มข้น 0.2 1 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิน้อยกว่า -4°C

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดป่นอาหาร (Warning Commercial, Model: HGTWT), เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง และ 5 ตำแหน่งสำหรับชั่งสารมาตรฐาน, rotary evaporator, water bath อุณหภูมิไม่เกิน 40°C , micropipette, Erlenmeyer flasks with screw caps ขนาด 250 มิลลิลิตร, mixing cylinder ขนาด 250 มิลลิลิตร, graduated tube พร้อม screw-cap ขนาด 15 มิลลิลิตร, Pasteur pipette, round-bottomed flask ขนาด 500 มิลลิลิตร, aluminum foil, glass funnel, ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -15°C , certified volumetric flask, shaker, GC-FPD; Agilent Technology 6890N โดยใช้ analytical column: DB-1701 (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness) และ DB-35ms (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness) ก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ในการทดสอบความถูกต้องของวิธี ได้แก่ ปลาว่าที่มาจากปลากระดี่ใช้เป็นตัวแทนเนื้อสัตว์หมักดอง ใช้จิ้งหรีดทอดเป็นตัวแทนแมลงทอดและแมลงอบ กับใช้ปลาจิ้งจั้งแห้ง เป็นตัวแทนของเนื้อสัตว์เค็ม และเนื้อสัตว์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม OP ในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ พ.ศ.2554-2558 โดย

วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารรวม 133 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาแห้งและปลาเค็ม 100 ตัวอย่าง หมึกแห้ง 19 ตัวอย่าง หอยแห้ง 11 ตัวอย่าง กุ้งแห้ง 1 ตัวอย่าง ดักแด่ 1 ตัวอย่าง และ เนื้อแห้ง 1 ตัวอย่าง นำตัวอย่างประมาณ 500 กรัม เฉพาะส่วนที่รับประทานได้มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างหยาบด้วยเครื่องบดปั่นอาหารหรือใช้มีดตัดหั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาดไม่ใหญ่กว่าเมล็ดข้าวสาร โดยใช้เวลานานที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงความร้อนที่จะทำให้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชสลายตัว สำหรับอาหารที่เป็นชิ้นขนาดเล็กเท่าเมล็ดข้าวสารหรือเล็กกว่าไม่ต้องบดตัวอย่าง ซึ่งแบ่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม เพื่อเป็น analytical portions และตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C

การสกัด

ซึ่งตัวอย่าง 10 กรัม (± 0.1 กรัม) ลงใน Erlenmeyer flask ที่มี teflon stopper ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และ acetonitrile 100 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ปิดด้วย aluminum foil และ teflon stopper ให้แน่น เขย่าด้วยเครื่อง shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) นาน 30 นาที เติมน้ำกลั่น NaCl 15 กรัม และ dichloromethane 80 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเขย่าเบาๆจนสารสกัดมีลักษณะใสขึ้น กรองสารสกัดส่วนใสผ่านกระดาษกรอง No.2 เก็บ filtrate ใน mixing cylinder ขนาด 250 มิลลิลิตร กรองสารสกัดผ่าน glass funnel ที่อุดด้วยสำลีและ sodium sulfate ประมาณ 30 กรัมหรือมากกว่าจะดูคน้ำได้หมด ลงใน round-bottomed flask ขนาด 500 มิลลิลิตร rinse sodium sulfate ใน glass funnel ด้วย acetonitrile เล็กน้อย นำ filtrate ไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตรใน graduated tube พร้อม screw-cap ขนาด 15 มิลลิลิตร ด้วย acetone ได้ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง 2 กรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-FPD โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (clean up)

การตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง GC-FPD

ใช้เครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟของ Agilent Technologies รุ่น 6890N โดยมี Flame Photometric Detector (GC-FPD) ใช้ column DB-1701 (ขนาด 30 m x 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness) และ/หรือ DB35ms (ขนาด 30 m x 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness) ใช้ pulse splitless mode: pressure 17.5 psi, purge flow 60 ml/min, purge time 0.8 min ใช้ helium เป็น carrier gas มี flow rate 1.5 ml/min (constant flow) และใช้ nitrogen เป็น make up gas 60 ml/min จุด flame โดยใช้ hydrogen 75 ml/min และ air 100 ml/min มี injection volume เป็น 1 μl มีอุณหภูมิ injector และ detector เป็น 220°C และ 200°C ตามลำดับ วิเคราะห์สาร trichlorfon โดยใช้สภาวะ oven temperature program เป็น initial 70°C hold 1 min, rate $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 180°C , rate $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 205°C hold 5 min, rate $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to final 265°C hold 20 min วิเคราะห์สาร OP อื่นๆ 21 ชนิด โดยใช้สภาวะ oven temperature program เป็น initial 80°C hold 1 min, rate $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 190°C , rate $2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 220°C , rate $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 240°C , rate $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to final 270°C hold 8 min

การคำนวณปริมาณ

ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบคำนวณผลโดยใช้เทคนิค external calibration เปรียบเทียบกับ calibration curve (ความเข้มข้น 4 ระดับ) โดยจากสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ เมื่อ X คือความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $(Y - b)/a$, Y คือ peak area ของสารมาตรฐาน, a คือ slope และ b คือ intercept ของ calibration curve ความเข้มข้นของสารที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานและปริมาณสารที่ตรวจพบในตัวอย่างสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ } (\mu\text{g/ml}) = \frac{Y-b}{aX} \quad (1)$$

$$\text{ปริมาณสารที่ตรวจพบในตัวอย่าง } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ } (\mu\text{g/ml})}{\text{ความเข้มข้นของตัวอย่างที่นำไปฉีด } (\text{g/ml})} \quad (2)$$

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะของวิธีและความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank และ sample blank เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี Retention time (RT) ใกล้เคียงกับสารที่สนใจถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ matrix-matched calibration (MMC) เพื่อลดผลกระทบของ matrix ที่มีต่อความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เนื่องจากเนื้อสารที่มีในตัวอย่างจะส่งผลให้สารมาตรฐานเข้มข้นขึ้นหรือเจือจางลงจาก matrix effect โดยใช้สารที่สกัดได้จากปลาร้าที่เป็น blank เป็นตัวทำลาย เจือจาง intermediate standard solution ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 1 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและฉีดเข้าเครื่อง GC-FPD แบบสุ่ม (random, n=3) ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

หาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) โดย spiked สารละลายมาตรฐานทั้งหมดลงในสารสกัดที่ได้ ปลาร้าแล้วนำไปวิเคราะห์หาค่า LOD พิจารณาค่า LOD ที่เหมาะสมโดยใช้ค่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้โดยมีสัญญาณ signal-to-noise ratio มากกว่า 6 ขึ้นไป หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) โดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ แล้วยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 60-120 และ HORRAT (Horwitz ratio) กำหนดเกณฑ์ยอมรับมีค่าน้อยกว่า 2

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.3 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงและการศึกษาความทน

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับ LOQ 5xLOQ และ 10xLOQ ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 8 ซ้ำแล้วคำนวณ %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 60-120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): HORRAT มีค่าน้อยกว่า 2 ศึกษาความทนของวิธี โดยพิจารณาศึกษาตัวแปรที่เกิดขึ้นบ่อยในห้องปฏิบัติการคือ นักวิเคราะห์ ที่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปแล้วยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ โดยกำหนดผู้วิเคราะห์ 3 คน (นักวิเคราะห์ A B และ C) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาร้า

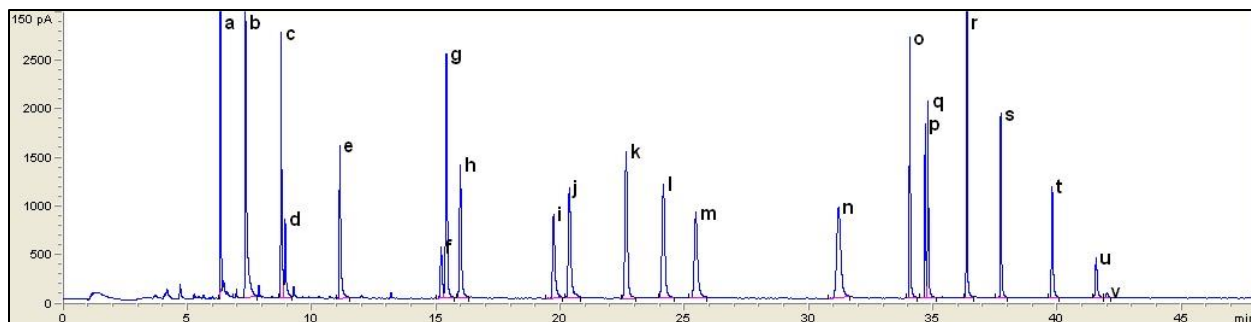
ที่เป็น blank แล้วเติมสารมาตรฐาน trichlorfon ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คนละจำนวน 8 ซ้ำ ใช้ ANOVA: single factor ในการประเมินความใช้ได้ของความแม่นยำและความเที่ยง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty, MU) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช นั้นมีเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องของหลายฉบับ (Ellison *et al.*, 2000; Nordtest, 2004; Eurolab, 2007; Codex, 2011) ทำการศึกษาเอกสารดังกล่าวแล้วเลือกวิธีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของ SANCO (2012) ที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับ และเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง GC-FPD ภายใต้สภาวะที่กำหนด ทำการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน สามารถแยกพีคและตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม OP ได้อย่างชัดเจนดังภาพที่ 1 และสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารกลุ่มดังกล่าวได้ในช่วง 0.2 1 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า r อยู่ระหว่าง 0.995-0.999 ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ของสารทุกชนิดเท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น azinphos-methyl มีค่า LOD เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำ (%recovery) จากการวิเคราะห์ปลาร้าที่เติมสารมาตรฐาน จำนวน 8 ซ้ำ ที่ระดับ LOQ มีค่าอยู่ระหว่าง 58.2-95.5% และความเที่ยงจาก HORRAT มีค่าอยู่ระหว่าง 0.4-1.1 (ตารางที่ 1) ทำการศึกษาค่า LOQ ในเนื้อปลาแห้งและจิ้งหรีดทอด พบว่าความแม่นยำที่ทดสอบโดยการหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (%recovery) ที่ระดับ LOQ มีค่าอยู่ระหว่าง 55.2-98.2% และความเที่ยงจาก HORRAT มีค่าอยู่ระหว่าง 0.4-1.8 และผลการทดสอบค่า LOQ ในตัวอย่างทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยเครื่องมือ GC-FPD และ capillary column: DB1701. a.dichlorvos, b.methamidophos, c.E-mevinphos, d.Z-mevinphos, e.acephate, f.omethoate, g.diazinon, h.dicrotophos, i.monocrotophos, j.dimethoate, k.pirimiphos-methyl, l.chlorpyrifos, m.parathion-methyl, n.parathion, o.prothiofos, p.methidathion, q.profenofos, r.ethion, s.triazophos, t.EPN, u.phosalone และ v.azinphos-methyl.

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (Linearity of working range) พบว่าสารที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.1-2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า r มากกว่า 0.995 มี 14 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, dicrotophos, EPN, ethion, methamidophos, mevinphos, parathion, pirimiphos-methyl, profenofos, prothiofos, triazophos และ trichlorfon วิธีวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ (accuracy) ที่ระดับ LOQ 5xLOQ และ 10xLOQ ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบความแม่นยำ (accuracy) ที่ประเมินจาก %recovery ที่ทั้ง 3 ระดับอยู่ในช่วง 52.8-95.5%, 29.6-78.9% และ 15.7-79.0% ตามลำดับ สารที่มีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (60-120%) มี 13 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, EPN, ethion, methamidophos, mevinphos, parathion, pirimiphos-methyl, profenofos, prothiofos, triazophos และ trichlorfon วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย HORRAT ของสารทุกชนิดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (HORRAT<2) ยกเว้น phosalone ที่มี HORRAT=3.3 และไม่สามารถตรวจวัด azinphos-methyl ได้ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความเที่ยงของการวิเคราะห์ (n=8)

สาร	Linearity	Linearity	ปลาร้า		
	of calibration curve	of working range	Average recovery, % (precision, HORRAT)		
	(r)	(r)	0.1 mg/kg (LOQ)	0.5 mg/kg (5xLOQ)	1 mg/kg (10xLOQ)
acephate	0.997	0.945 ^a	91.2(0.9)	39.2(0.6) ^b	31.8(0.6) ^b
azinthos-methyl	0.999	ND ^a	ND ^b	ND ^b	ND ^b
chlorpyrifos	0.998	0.997	84.1(0.4)	71.0(0.6)	71.6(1.4)
diazinon	0.998	0.997	88.2(0.7)	69.6(1.0)	70.0(1.1)
dichlorvos	0.998	0.995	92.5(0.4)	64.2(1.0)	69.0(1.1)
dicrotophos	0.997	0.997	70.0(0.5)	55.5(1.0) ^b	54.1(1.1) ^b
dimethoate	0.995	0.907 ^a	52.8(0.6) ^b	29.6(0.8) ^b	18.7(1.0) ^b
EPN	0.999	0.996	87.8(1.0)	73.3(1.1)	79.0(1.1)
ethion	0.998	0.996	85.5(0.6)	63.7(0.6)	68.3(1.0)
methamidophos	0.998	0.997	76.5(0.6)	64.3(0.8)	70.0(1.4)
methidathion	0.995	0.889 ^a	79.8(0.7)	37.8(1.5) ^b	17.8(1.2) ^b
mevinphos	0.999	0.995	94.2(0.6)	61.8(1.0)	75.8(1.9)
monocrotophos	0.998	0.917 ^a	95.5(1.4)	41.2(1.5) ^b	25.6(0.7) ^b
omethoate	0.995	0.868 ^a	87.4(0.6)	30.6(0.6) ^b	18.2(0.3) ^b
parathion	0.998	0.996	73.9(0.4)	64.8(0.7)	65.3(1.2)
parathion-methyl	0.996	0.864 ^a	67.1(0.5)	37.8(1.8) ^b	15.7(1.4) ^b
phosalone	0.999	0.765 ^a	81.1(1.1)	34.0(3.3) ^{b,c}	50.0(1.8) ^b
pirimiphos-methyl	0.998	0.997	90.3(0.4)	65.9(0.4)	70.0(1.4)
profenofos	0.998	0.998	82.5(0.6)	69.1(0.5)	65.2(1.0)
prothiofos	0.998	0.997	87.2(0.4)	78.9(0.6)	75.4(1.1)
triazophos	0.998	0.997	90.4(1.0)	75.7(1.3)	76.0(1.0)
trichlorfon	0.999	0.999	99.5(0.4)	89.3(0.4)	105.4(0.4)

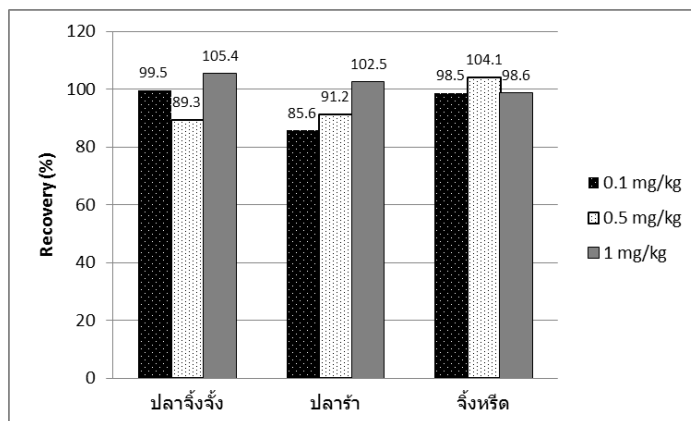
ND: Not Detected ตรวจไม่พบ

^a: r ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($r \geq 0.995$)

^b: accuracy ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (60-120%)

^c: precision ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (HORRAT<2)

ได้ศึกษาความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์สาร trichlorfon ใน matrix ต่างๆ พบว่าความแม่นยำ (%recovery) ที่ระดับ LOQ 5xLOQ และ 10xLOQ ในปลาจิ้งจั้งมีค่าเป็น 99.5 89.6 และ 105.4% ในปลาร้ามีค่าเป็น 85.6 91.2 และ 102.5% และในจิ้งหรีดทอดมีค่าเป็น 98.5 104.1 และ 98.6% ตามลำดับ และความเที่ยงจาก HORRAT มีค่าอยู่ระหว่าง 0.4-1.8 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์สาร trichlorfon ใน ปลาลังจิ้ง ปลาร้า และจิ้งหรีด ที่ระดับ 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การศึกษาความทนของวิธีจากการศึกษาตัวแปร นักวิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์ 3 คน (นักวิเคราะห์ A, B และ C) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาแห้งที่เป็น blank แล้วเติมสารมาตรฐาน trichlorfon ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คนละจำนวน 8 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์ (mean±SD) ของนักวิเคราะห์ A คือ 0.177±0.020 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นักวิเคราะห์ B คือ 0.182±0.020 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ นักวิเคราะห์ C คือ 0.178±0.248 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใช้ ANOVA: single factor จากการประเมินพบว่าค่า F ที่คำนวณได้ มีค่าน้อยกว่าค่า F_{crit} (ตารางที่ 2) แสดงว่าวิธีมีความทนต่อการวิเคราะห์เมื่อมีการเปลี่ยนนักวิเคราะห์

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาความทนของวิธีเมื่อมีการเปลี่ยนนักวิเคราะห์โดยใช้ ANOVA: single factor

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F_{crit}
Between Groups	0.0001	2	5E-05	0.120846269	0.886883	3.554557146
Within Groups	0.007455	18	0.000414			

ใช้การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ง่ายและมีประสิทธิภาพที่สุดของ SANCO ที่ใช้ค่า k=2 ในการคำนวณค่า expended MU (U') จากค่า relative MU (u') และสมการ $U' = k \times u'$ สามารถใช้วิธีดังกล่าวได้เมื่อห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบความสามารถห้องปฏิบัติการ (proficiency testing, PT) วิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชแบบ multiresidue methods อย่างสม่ำเสมอและมีจำนวนครั้งมากพอสมควร ซึ่งผลการเข้าร่วมทุกครั้ง (หรือเกือบทุกครั้ง) จะต้องมีค่า z-score อยู่ในเกณฑ์พอใจ วิธีนี้คำนวณได้โดยใช้ค่า default value = 50% เป็นค่า expended MU (U') คำนวณจากค่าเฉลี่ยของ relative standard deviations (RSD) ที่สมาชิกที่เข้าร่วม PT รายงานสำหรับการวิเคราะห์แบบ multiresidue methods เท่านั้น พบว่าค่าเฉลี่ยของ RSD ที่เหล่านสมาชิกรายงานคือ 25% ทำให้ expended MU (U') เป็น 50% ($U' = 2 \times 0.25 = 0.50$)

การใช้ U' = 50% นี้ถือเป็นการประเมินค่าความไม่แน่นอนที่กว้างเพื่อให้โอกาสความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นจากการวิเคราะห์สารความเข้มข้นต่ำที่มีค่ากำหนดตามกฎหมายโดยเฉพาะเมื่อสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสไม่ได้กำหนดค่า MRL ในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ ตัวอย่างเช่น วิเคราะห์พบสาร trichlorfon ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในเนื้อปลาแห้ง expended MU (U')= 0.5 x 0.1 = 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ห้องปฏิบัติการจะต้องรายงานผลการวิเคราะห์ว่าพบสาร trichlorfon ปริมาณ 0.1±0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ได้นำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้วมาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อสำรวจชนิดและปริมาณการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 13 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, EPN, ethion, methamidophos, mevinphos, parathion, pirimiphos-methyl, profenofos, prothiofos, triazophos และ trichlorfon ในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ในช่วงปี 2554-2558 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปลาแห้งและปลาเค็ม หมึกแห้ง หอยแห้ง กุ้งแห้ง เนื้อแห้ง ที่จำหน่ายในประเทศไทย รวม 132 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ส่งตรวจที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ และภาคเอกชน กับตัวอย่างแมลงทอด (ดักแด้ทอด) 1 ตัวอย่าง ที่เป็นสินค้านำเข้าส่งโดยจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ผลการตรวจวิเคราะห์ ไม่พบสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในตัวอย่างหมึกแห้ง หอยแห้ง กุ้งแห้ง แมลงทอด และเนื้อแห้ง กับพบสาร trichlorfon ปริมาณ น้อยกว่า 0.1 ถึง 34.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างปลาแห้ง 32 ตัวอย่าง ข้อมูลจากตารางที่ 3 ตัวอย่างอาหารที่มาจากภาคใต้มีอัตราการตรวจพบสาร trichlorfon สูงที่สุดถึงร้อยละ 59 รองลงมาคือภาคกลางร้อยละ 7 ส่วนตัวอย่างที่มาจากภูมิภาคอื่น ๆ ตรวจไม่พบสารดังกล่าว ซึ่งให้เห็นว่าความร้ายแรงของปัญหาการตกค้างของแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยมีความแตกต่างกัน ข้อมูลเบื้องต้นนี้เป็นประโยชน์ต่อผู้มีอำนาจด้านการคุ้มครองผู้บริโภคในการบริหารจัดการด้านความปลอดภัยของประชาชน

ตารางที่ 3 การตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืช trichlorfon ในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในอาหารแบ่งตามแหล่งที่มา

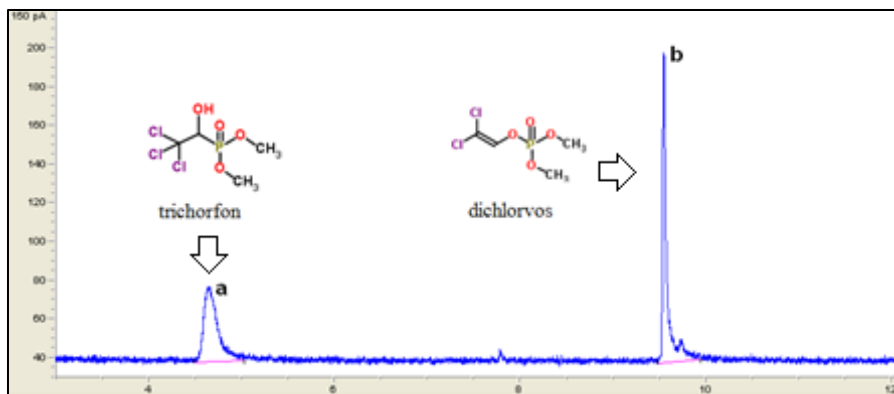
แหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ	ร้อยละของการตรวจพบ	median (mg/kg)	range (mg/kg)
ภาคใต้	51	30	59	4.51	<0.10-34.10
ภาคกลาง	29	2	7	0.39	<0.10-0.67
ภาคตะวันออก	29	0	0	-	-
ภาคเหนือ	13	0	0	-	-
ภาคตะวันตก	10	0	0	-	-
ต่างประเทศ	1	0	0	-	-
รวม	133	32	24	-	-

*ตัวอย่างอาหารทั้ง 133 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสารกลุ่ม OP 12 ชนิด

การพัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสตกค้าง 22 ชนิด หลายชนิดพร้อมกันในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดเอฟพีดี พบว่าสารที่ผ่านการประเมินความ

แม่นยำจากค่า %recovery และความเที่ยงจากค่า HORRAT แล้วอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมี 13 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, EPN, ethion, methamidophos, mevinphos, parathion, pirimiphos-methyl, profenofos, prothiofos, triazophos และ trichlorfon สารดังกล่าวมีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ในช่วง 0.1-2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งคุณลักษณะของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ตกค้างทั้ง 13 ชนิดเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศไทยตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 และมาตรฐานระหว่างประเทศของ CODEX ที่ไม่ระบุค่ากำหนดปริมาณการตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limits, MRL) ไว้ในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ อนึ่งสารกลุ่ม OP ทั้ง 13 ชนิดที่ผ่านเกณฑ์การประเมินความแม่นยำและความเที่ยงส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง (insecticide) และสารฆ่าไร (acaricide) และมีสารบางชนิดเท่านั้นที่เป็นสารกำจัดนก (avicide) สารฆ่าหนอนพยาธิ (anthelmintic drug) สารกำจัดไส้เดือนฝอย (nematicide) และสารฆ่าเชื้อรา (fungicide) สารกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้ล้วนมีค่าระดับที่ยอมรับได้ต่อวัน (Acceptable Daily Intake, ADI) ในระดับต่ำ จึงไม่ควรมีการได้รับสัมผัสในปริมาณมาก และต้องไม่มีการตกค้างของสารดังกล่าวในอาหาร การพัฒนาวิธีที่ทำขึ้นนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจติดตามสถานการณ์การตกค้างของสารกลุ่ม OP ได้

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสมีคุณสมบัติการคงตัวต่ำ สลายตัวได้ง่ายในสภาวะที่เป็นต่างและที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันจึงไม่ควรใช้เวลานานและหลีกเลี่ยงการปั่นตัวอย่างที่จะเพิ่มอุณหภูมิ การใช้สาร trichlorfon ที่มักฉีดพ่นหรือชุบเพื่อกำจัดแมลงวันและหนอนของแมลงวันในอาหารพวกปลาแห้งและปลาเค็มจะตกค้างในอาหารบริเวณพื้นผิว ทำให้การสกัดสารดังกล่าวจากการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ถือว่าเพียงพอ นอกจาก acetonitrile ที่ใช้ในการสกัดสามารถละลายทั้งสารชนิดมีขี้ดและไม่มีขี้ดได้แล้วยังพบว่าตัวทำละลายดังกล่าวให้ปริมาณ co-extractives ที่น้อยกว่าตัวทำละลายอื่นๆ (Anastassiades *et al.*, 2003; Malone *et al.*, 2010) จึงเหมาะแก่การวิเคราะห์แบบ multiresidue method และเนื่องจากสารสนใจคือสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่มีขี้ดจึงมีการเติม dichloromethane และ sodium chloride ในการ salting out เพื่อเพิ่มความสามารถในการสกัดสารสนใจ ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพของการสกัดสูงขึ้น การวิเคราะห์โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ลดระยะเวลาและสารเคมี ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 21 ชนิด และ สาร trichlorfon ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ต้องทำการวิเคราะห์ในสภาวะที่แตกต่างกัน เนื่องจาก สาร trichlorfon เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำและจะสลายตัวหากใช้อุณหภูมิสูง กลายเป็น dichlorvos (Catalgol *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2007) สารอนุพันธ์ดังกล่าวที่เกิดขึ้นจะรวมอยู่ในพีคของสารมาตรฐาน ทำให้ปริมาณ trichlorfon ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณต่ำกว่าความเป็นจริง ทำให้เกิดข้อผิดพลาดของผลการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิด จึงต้องใช้สภาวะของเครื่องมือในการวิเคราะห์ที่จำเพาะสำหรับสารชนิดนี้



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมแสดงพีคของสารที่เกิดปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยความร้อนจากอุณหภูมิของเครื่อง GC-FPD และโครงสร้างทางเคมีของ a.trichlorfon เป็น b.dichlorvos

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีสารกลุ่ม OP ที่ไม่ผ่านการประเมินคุณสมบัติความแม่นยำและความเที่ยง (ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ accuracy; 60-120% precision; HORRAT<2) 9 ชนิด ได้แก่ acephate, azinphos-methyl, dicrotophos, dimethoate, methidathion, monocrotophos, omethoate, parathion-methyl และ phosalone สารเหล่านี้เป็นสารที่มี sensitivity ในเครื่อง GC-FPD ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับสาร 13 ชนิดที่มีคุณลักษณะอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และมีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่เหมาะสมกับการตรวจวัดด้วย FPD เนื่องจากมีจำนวนฟอสฟอรัส (P) และซัลเฟอร์ (S) ในปริมาณต่ำและเป็นสารที่สลายตัวง่ายที่อุณหภูมิสูง หนึ่งในสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี การใช้ LC-MS/MS เป็นหนึ่งในเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมเช่นกัน ในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ภายนอก (External quality control, EQC) การเปรียบเทียบความสามารถของห้องปฏิบัติการเป็นไปได้ยากขึ้นเนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น การไม่มี CRM ที่เหมาะสมจำหน่ายทำให้ไม่สามารถประเมิน trueness ได้ ต้องประเมินจาก fortified samples เท่านั้น การไม่มี proficiency testing program (PT) ที่เหมาะสม จึงไม่สามารถเข้าร่วมการเปรียบเทียบความสามารถของห้องปฏิบัติการได้ จึงได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถของนักวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน 3 คน ผลการประเมินพบว่าวิธีนี้มีความคงทนต่อการเปลี่ยนปัจจัยที่อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ ส่วนการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control, IQC) ได้กำหนดว่าในทุกชุดการวิเคราะห์ (batch) หรือทุก 10 ตัวอย่าง ให้ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ fortified sample ที่ระดับ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการสำรวจการตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ตรวจไม่พบสารเคมีกลุ่ม OP 21 ชนิด ในทุกตัวอย่าง ซึ่งให้เห็นว่าถึงแม้จะมีการตกค้างของสารกลุ่ม OP ในสภาวะแวดล้อม อากาศ น้ำผิวดิน และดินในประเทศไทย (Harpicharnchai *et al.*, 2013) แต่การตกค้างนี้ยังไม่มีการถ่ายทอดเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหาร แต่พบสาร trichlorfon เพียงชนิดเดียวในอาหารจำพวกปลาแห้งและปลาเค็ม ในบางกรณีที่พบในปริมาณสูงกว่า calibration curve ต้องมีการเจือจาง (dilute) ก่อนการฉีดเข้าเครื่อง GC-FPD แล้วคำนวณผลโดยใช้ dilution factor สาร trichlorfon ถูกตัดออกจากบัญชี The Annex I positive list ของ Directive 91/414 EEC ตั้งแต่เดือนกันยายน ปี พ.ศ. 2547 เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ ดังนั้นจึงห้ามจำหน่ายและใช้สาร trichlorfon ในสหภาพยุโรป (EU)

และได้ถูกประกาศห้ามนำเข้าและส่งออกใน EU ตาม Regulation (EC) 689/2008 เมื่อ 17 มิถุนายน พ.ศ.2549 แต่ในประเทศไทยยังอนุญาตให้ใช้ได้ โดยกรมประมงเป็นผู้ควบคุมสาร trichlorfon ให้เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ใช้เป็นสารป้องกันกำจัดไร (phosphonate acaricide) และเป็นสารกำจัดปรสิตภายนอกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเท่านั้น ทั้งนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุขไม่อนุญาตให้มีการตกค้างของสาร trichlorfon ในอาหารและการตรวจพบสารดังกล่าวจึงถือเป็นความผิดตาม พ.ร.บ.อาหาร การตกค้างของสารดังกล่าวเกิดจากการใช้งานผิดประเภท เมื่อใช้สาร trichlorfon ฉีดพ่นหรือชุบเนื้อสัตว์และสัตว์ที่จะนำไปถนอมอาหารด้วยการตาก อบ หรือทำให้แห้งเพื่อป้องกันแมลงวันและหนอนแมลงวันนั้นต้องใช้สารเคมีปริมาณมากและเกิดการตกค้างสะสม ถึงแม้สาร trichlorfon จะเป็นสารที่มีความเป็นพิษปานกลางและสลายตัวได้ง่ายแต่การได้รับสัมผัสในปริมาณมากและเมื่อมีการปรุงอาหารโดยใช้ความร้อนสาร trichlorfon จะสลายตัวให้สาร dichlorvos ที่มีความเป็นพิษสูงกว่ามาก อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ การได้รับสัมผัสปริมาณสาร trichlorfon ที่ตกค้างในปลาแห้งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ จากการศึกษาพบว่าปัญหาการตกค้างของสารดังกล่าวมีมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2530 และปัญหาควรต้องได้รับการแก้ไขอย่างจริงจัง แต่ 30 ปีให้หลังประเทศไทยก็ยังคงประสบปัญหานี้อยู่ หน่วยงานผู้บังคับใช้กฎหมายควรให้ความสำคัญต่อการจัดการด้านสาธารณสุขของประชาชนอย่างจริงจังและเป็นระบบ

สรุปผลการวิจัย

ได้พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 13 ชนิดในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ง่ายและรวดเร็วโดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์ ใช้เครื่องมือวิเคราะห์พื้นฐานที่ราคาสมเหตุสมผล สามารถนำไปใช้ตรวจสอบคุณภาพตาม พ.ร.บ.อาหาร ปี พ.ศ.2522 ได้ การวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างปี พ.ศ.2554-2558 พบการตกค้างของสาร trichlorfon ปริมาณ <math><0.1-34.1</math> มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างปลาแห้งจำนวน 32 ตัวอย่างจาก 133 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24 การได้รับสัมผัสปริมาณสาร trichlorfon ที่ตกค้างในปลาแห้งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ดังนั้นผู้มีอำนาจและมีส่วนเกี่ยวข้องควรดำเนินการให้เป็นไปตามตามกฎหมายอย่างเคร่งครัดเพื่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของประชาชน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวจรรววรรณ ลิ้มสังจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร นางกนกพร อธิสุข ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหาร และ นางวิชาดา จงมีवासนา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำหรับคำแนะนำและการตรวจแก้ต้นฉบับ นายธรรณิศวรร ไซยมงคล ผู้ช่วยเตรียมตัวอย่าง และเจ้าหน้าที่ฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้างทุกท่านที่ให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D. & 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. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 86, 412-431.
- Atisook, K. (2010). Surveillance of pesticide residues in fermented fish. *News Letter of the Department of Medical Sciences*, 24(7), 11. (in Thai)
- Bentabol, A. & Jodral, M. (1995). Determination of organochlorine pesticides in cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 78, 94D98.
- Catalgol, B.K., Ozden, S. & Alpertunga, B. (2007). Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 2, 1538-1544.
- Codex Alimentarius Commission. (2011). *CAC/GL 59-2006 (Amendment 1-2011) Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results*. Retried January 15, 2016, from www.codexalimentarius.net/download/standards/10692/cxg_059e.pdf
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., & Williams, A. (2000). *EURACHEM Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, Laboratory of the Government Chemist*, 2nd edition, London.
- Eurolab Technical Report. (2007). *Measurement uncertainty revised: alternative approaches to uncertainty evaluation, European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories*. Retried January 15, 2016, from www.eurolab.org
- Guimarães, A.T.B., Silva de Assis, H.C. & Boeger, W. (2007). The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and his- topathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68, 57-62.
- Harnpicharnchai, K., Chaiear, N. & Charemtanyarak, L. (2013). Residues of organophosphate pesticides used in vegetable cultivation in ambient air, surface water and soil in Bueng Niam Subdistrict, Khon Kean Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 44, 1088-1097.
- Khay, S., Abd El-Aty, A.M., Choi, J.H., Shin, E.H., Shin, C.H., Chang, B.J., Lee, C.H., Shin, S.C., Jeong, J.Y. & Shim, J.H. (2009). Simultaneous determination of pyrethroids from pesticide residues in porcine muscle and pasteurized using GC. *Journal of Separation Science*, 32, 244-251.
- Lehotay, S.J., Lightfield, A.R., Harman-Fetcho, J.A. & Donoghue, D.J. (2001). Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4589-4596.

- Lertruengdej, Y. & Chongmevasna, P. (1997). Analysis of Trichlorfon in Dry Salted Fish. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 39(1), 45-51. (in Thai)
- Malone, E.M., Elliott, C.T., Kennedy, D.G. & Regan, L. (2010). Rapid confirmatory method for the determination of sixteen synthetic growth promoters and bisphenol A in bovine milk using dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 1077- 1084.
- Ngoh, M.A. & Cullison, R. (1996). Determination of trichlorfon and dichlorvos residues in shrimp using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2686-2689.
- Nordtest, R. (2004). *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*. Retrieved January 15, 2016, from <http://www.nordicinnovation.net/nordtestfiler/tec537.pdf>
- Park, J.W., Abd El-Aty, A.M., Lee, M.H., Song, S.O. & Shim, J.H. (2006). Residue Analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in fatty matrices by gas chromatography coupled with electron-capture detection. *Zeitschrift für Naturforschung*, 61c: 341D346.
- Pico, Y., Font, G., Molto, J.C. & Manes, J. (2000). Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 16, 153D173.
- SANCO. (2012). *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-Gener. Safety of the food chain Chemicals, contaminants, pesticides*. Retrieved January 15, 2016, from http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf
- Sultatos, L.G. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 43, 271D289.
- Thoophom, G., Sungvaranond, B., Atisook K., Lertruengdej, Y., Kaewklapanachareon, L., Suntudrob, J., Chongmevasna, P. & Boonthai, R. (1995). Pesticide and PCB Residues in Foods, 1991-1993. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 37(2), 145-160. (in Thai)
- Zrostlíkov, J., Lehotay, S.J. & Hajslov, J. (2002). Simultaneous analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in animal fat by gas chromatography with pulsed flame photometric and micro-electron capture detectors. *Journal of Separation Science*, 25, 527-537.