

# การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอนและดีดีที ในปลาแห้งและปลาเค็ม โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์

Development of insecticide residue analysis for Trichlorfon and DDT determination in dried and salted fish by GC-MS technique

จรรยา บัวบาน พยอม หน่อศิริ อนุสรณ์ ดิษฐสุวรรณ  
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์  
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

## บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิด ไตรคลอโรฟอน และดีดีที ในปลาแห้งและปลาเค็มโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ ใช้ mode Selected Ion Monitoring (SIM) คอลัมน์ชนิด VertiBond™ 5 ms โดยนำปลาเค็มมาทำการสกัดด้วย อะซิโตนไนไตร์ ดึงน้ำออกเพื่อตรวจสอบสารไตรคลอโรฟอน ส่วนการตรวจวิเคราะห์ดีดีทีสกัดด้วย เอ็นเฮกเซนและอะซิโตนไนไตร์ที่อิ่มตัวด้วยเอ็นเฮกเซน เพื่อทำสารให้บริสุทธิ์ ก่อนฉีดเข้าเครื่อง ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจพบสารไตรคลอโรฟอนและดีดีทีเท่ากับ 0.005 และ 0.002 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.010 และ 0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 0.005 – 0.500 ไมโครกรัมต่อกรัม มีค่ามากกว่า 0.9950 ความแม่นยำแสดงด้วย % recovery ในช่วง 98.2- 104.8 และความเที่ยงแสดงด้วย HORRAT มีค่าอยู่ในช่วง 0.04 – 0.33 (เกณฑ์ < 2) ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวในปลาแห้งและปลาเค็มได้ เพื่อเฝ้าระวังและประเมินความเสี่ยงพร้อมทั้งแจ้งเตือนภัยแก่ผู้บริโภคต่อไป

**คำสำคัญ :** ปลาแห้งและปลาเค็ม สารดีดีที สารไตรคลอโรฟอน

## Abstract

The Development of insecticide residue analysis, Trichlorfon and DDT in dried and salted fish by GC-MS technique was carried out by using GC-MS technique with Selected Ion Monitoring (SIM) mode and Vertibond™ 5 ms column. For Trichlorfon analysis, the sample was extracted with acetonitrile whereas DDT analysis, the sample was extracted and purified with n-hexane and acetonitrile saturated with n-hexane. Limit of detection (LOD) of Trichlorfon and DDT were 0.005 and 0.002 µg/g and limit of quantitation (LOQ) of those substances were 0.010 and 0.005 µg/g. Calibration curve in range 0.005–0.500 µg/g. The coefficient of determination ( $R^2$ ) more than 0.9950. The accuracy of the method presented as percentage recovery was between 98.2– 104.8 and precision calculated by HORRAT equation was between 0.04–0.36 (acceptance criteria; limit < 2). The results concluded that this technique is simple, high accuracy and precision with less time consumed.

**Keywords :** Dried fish and salted fish, DDT, Trichlorfon

## บทนำ

ประเทศไทยมีอาชีพอุตสาหกรรมทางการเกษตรตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันและมีการพัฒนาจากเดิมอย่างเห็นได้ชัด เช่น ขบวนการผลิตและการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เป็นต้น รวมทั้งมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างแพร่หลายเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช โดยที่เกษตรกรผู้ใช้ขาดความรู้ความเข้าใจในการนำสารเคมีมาใช้อย่างถูกต้อง รวมทั้งมีการนำมาใช้ในปริมาณที่เกินความจำเป็นใช้ร่วมกันหลายชนิด จึงส่งผลให้สารเคมีตกค้างและมีการปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมจนถึงในระดับนิเวศน์ และทำให้สิ่งมีชีวิตได้รับผลกระทบ เช่น พืช ผัก ผลไม้ แม่น้ำ และสัตว์ที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำจนส่งผลกระทบต่อมนุษย์ที่มีโอกาสเกิดการสะสมในร่างกายของผู้บริโภค จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นมะเร็งที่สามารถลุกลามไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ ปลาแห้งปลาเค็มเป็นการแปรรูปสัตว์น้ำที่มีการวางจำหน่ายกันแพร่หลายและเป็นความต้องการของผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจำนวนมาก

มากชิ้น รวมทั้งในพื้นที่สาธารณสุขเขต 18 ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร พิจิตร นครสวรรค์ และอุทัยธานี และพื้นที่สาธารณสุขเขต 2 ได้แก่ จังหวัดชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง และลพบุรี โดยพื้นที่ทั้ง 2 เขต เป็นพื้นที่เกษตรกรรมและเกษตรกรรมมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและฆ่าแมลงจำนวนมาก สามารถทำให้มีการปนเปื้อนในระบบห่วงโซ่อาหารได้ ประกอบกับพื้นที่มีแม่น้ำไหลผ่าน ทำให้มีโอกาสได้รับสารตกค้างดังกล่าวสูง คนในพื้นที่มีการนำปลาจากแม่น้ำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ปลาแห้งปลาเค็ม วางจำหน่ายในตลาดเขตพื้นที่ข้างทางถนนสายเอเชีย และนอกพื้นที่ สามารถสร้างรายได้ให้กับคนในพื้นที่ได้อีกทางหนึ่ง จึงทำให้ผู้ประกอบการมีความคิดจะผลิตผลิตภัณฑ์ได้นานปราศจากแมลงรบกวนทั้งในขณะผลิตและจำหน่ายและทันต่อความต้องการของผู้บริโภค จึงเพิ่มโอกาสต่อการตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลงในปลาแห้งปลาเค็มที่สูงขึ้นเกิดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตภัณฑ์ปลาแห้งปลาเค็มที่ไม่ปลอดภัย

สารพิษตกค้างยาฆ่าแมลง (Pesticides Residue) ได้แก่ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน ใช้กำจัดแมลงอย่างกว้างขวาง มีพิษคงทน สลายตัวยาก ตกค้างอยู่ในธรรมชาติได้นาน เช่น DDE, DDT, Chlordane เป็นต้น กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งเป็นกลุ่มสาร สลายตัวยากมีส่วนออกฤทธิ์ช่วงสั้นๆ และกลุ่มไพรีทรอยด์ มีความ เป็นพิษร้ายแรงต่อสัตว์น้ำ กลุ่มคาร์บาเมทมีประสิทธิภาพสารกำจัด แมลงมีความเป็นพิษรุนแรงและมีราคาแพง<sup>(1)</sup> ซึ่งจะเห็นได้ว่าการ ใช้สารเคมีดังกล่าวเพื่อป้องกันการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เพื่อตอบสนองต่อความต้องการบริโภคของผู้บริโภคทั้งภายใน และ ต่างประเทศ ดังนั้นอันตรายและผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้ สารเคมีตกค้างที่จะเกิดกับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมก็มีปริมาณ สูงเพิ่มขึ้นด้วยจากการรายงานวิจัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและ พืชปิโนอาหาร พ.ศ. 2534 - 2536 พบว่า ตัวอย่างจากสัตว์ ตรวจไม่พบสารตกค้างสารพีซีบี (Polychlorinated Biphenyls; PCBs) แต่พบการตกค้างของกลุ่มสารประกอบคลอรีน ร้อยละ 68.1 พบบ่อยที่สุดคือ ดีดีที และไตรคลอโรฟอน รวมทั้งมีการใช้ในตัวอย่าง ปลาเค็มปลาแห้ง ร้อยละ 17.7 ปริมาณการตรวจพบ 0.01- 33.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม<sup>(2)</sup> ตลอดจนการวิเคราะห์ที่ไตรคลอโรฟอน ในปลาเค็มที่จำหน่ายทุกภาคของประเทศ ระหว่างเดือนมกราคม - เมษายน 2539 จำนวน 296 ตัวอย่าง พบสารไตรคลอโรฟอน ร้อยละ 22.6 ค่าเฉลี่ยปริมาณที่พบเท่ากับ 2.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งภาคเหนือปริมาณการตรวจพบ 2.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่ายังมีการตรวจพบในปริมาณค่อนข้างสูง<sup>(3)</sup> รวมทั้งปี 2543 ทางศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ได้ทำการ สำรวจในตัวอย่างปลาแห้งและปลาเค็มในเขตอำเภอเมือง พบว่า มีการตกค้างของสารไตรคลอโรฟอน สูงถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประกอบกับเขตพื้นที่สาธารณสุขเขต 2 และ 18 เป็นแหล่งอยู่อาศัย น้ำที่มีความสำคัญของประเทศ และมีผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง ปลาเค็ม วางจำหน่ายค่อนข้างมากในตลาดเขตเทศบาลและริมถนนสายเอเชีย ดังนั้นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ และภาคีเครือข่าย ซึ่งเป็นหน่วยงานคุ้มครองผู้บริโภคมีความตระหนักในความปลอดภัย ของผู้บริโภค จึงมีการดำเนินการวิจัยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์สารสารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอนและ ดีดีที โดยเทคนิค GC-MS ตลอดจนจะนำวิธีที่พัฒนาขึ้นทำการ ตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างปลาแห้งปลาเค็มที่จำหน่ายริมถนน สายเอเชียและร้านจำหน่ายในตลาดเทศบาลในเขตพื้นที่สาธารณสุข

เขต 2 และ 18 เพื่อเป็นการเฝ้าระวังคุณภาพและแจ้งเตือนภัย ความเสี่ยงในการบริโภคปลาแห้งปลาเค็มของผู้บริโภคต่อไป

## วัตถุประสงค์

พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิด ไตรคลอโร ฟอน และดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) ในปลาแห้งและ ปลาเค็ม โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

## วิธีการศึกษา

### 1. มาตรฐานฐานและสารเคมี

1.1 มาตรฐานฐานสารไตรคลอโรฟอนและสารดีดีที (p,p' -DDE, p,p' -DDD, p,p' - DDT) purity >95.0%

1.2 สารเคมี : n-Hexane PR grade, Acetonitrile PR grade, Aluminium oxide 90 active, Dichloromethane AR grade, Sodium sulfate anhydrous AR grade, Sodium chloride AR grade, Diethyl Ether AR grade

### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง GC-MS รุ่น 6890 ผลิตภัณฑ์ Agilent Technology โดยใช้ Electron impact (EI) และ mode Selected Ion Monitoring (SIM), analytical column : VertiBond™ 5 ms, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 um, เครื่องบดอาหาร, เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง, เครื่อง rotary evaporator, เครื่อง ultra turrax, กระจกทรง เบอร์ 2, ชุดกรอง Buchner funnel, Suction flask, Mixing cylinder, หลอด graduated, separatory funnel, Erlenmeyer flask, Round-bottomed flask, Glass column (10 mm id x 500 mm), Beaker, Glass funnel.

### 3. การเตรียมสภาวะเครื่อง GC-MS ที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 : การเตรียมสภาวะเครื่อง GC-MS

รายละเอียด	สารไตรคลอโรฟอน	สารดีดีที
Inlet	Spitless at 250° C	Spitless at 250° C
Oven	Initial temperature 100° C , hold 2 min Ramp 25° C /min to 180° C , 11 min (Initial temperature คือเป็นการตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นเพื่อเข้าสู่ระบบการวัดสาร)	Initial temperature 80° C , hold 3 min Ramp 25° C /min to 180° C , 11 min (And post – run 30 min at 280° C เป็นการตั้งเพื่อล้างคอลัมน์ป้องกันการปนเปื้อนดูตอนการพัฒนาวิธี)
Column flow	Constant pressure at 12.9 psi, 1.2 ml/min	Constant pressure at 5.45 psi, 0.7 ml/min
Analytical column	Verti Bond™ 5 ms, 30 m x 0.25 mm x 0.25 um	
Detector	MS (Single quadrupole) with Selected Monitoring Ions (SIM)	
Transfer line	280° C, MS quadrupole; 150° C, MS source : 230° C	

#### 4. การเตรียมสารมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานสารไตรคลอโรฟอน 0.050 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetone ให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร ส่วนสารมาตรฐานดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) ชั่งอย่างละ 0.050 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย n-hexane ให้ครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 5. การเตรียมตัวอย่าง

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอนและดีดีที ในปลาแห้งและปลาเค็ม โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์นั้น เลือกตัวอย่างปลาเค็มมาใช้เป็นตัวแทนในการพัฒนาวิธีเนื่องจากมีกระบวนการผลิตและมีสิ่งรบกวนมากกว่าปลาแห้ง เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกพีคได้ชัดเจนและไม่มีสารอื่นรบกวนจึงนำตัวอย่างปลาเค็มมาพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ใช้เฉพาะส่วนที่รับประทานได้ทำการบดผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดปั่นอาหาร ทำการแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วนเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอน และดีดีที โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

#### 6. การตรวจวิเคราะห์<sup>(4,6)</sup>

6.1 สารเคมีกำจัดแมลงชนิด ไตรคลอโรฟอน : ชั่งตัวอย่างปลาเค็ม 10 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ที่มีฝาปิด เติม Acetonitrile 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm นาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองใส่ใน Mixing cylinder ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย Acetonitrile เติม Sodium Chloride 15 กรัม และ Dichloromethane 80 มิลลิลิตร เขย่าจนสารที่ได้ใส่ กรองผ่านสำลีและ Sodium sulfate anhydrous หนาประมาณ 2 เซนติเมตร นำสารละลายที่ได้ระเหยจนปริมาตรเหลือ 5 มิลลิลิตร จะได้สารความเข้มข้น 2 กรัมต่อมิลลิลิตร นำสารที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS

6.2 สารเคมีกำจัดแมลงชนิดดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) :

6.2.1 ชั่งตัวอย่างปลาเค็ม 20 กรัม ใส่ใน beaker เติม Sodium sulfate anhydrous 100 กรัม คลุกให้เข้ากัน เติมน-hexane 150 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วย เครื่อง ultra turrax ความเร็วสูง นาน 2 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง ใส่ใน suction flask (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ถ่ายสารที่สกัดได้ลงใน round – bottomed flask ที่ชั่งน้ำหนักบันทึกไว้แล้ว นำไประเหยด้วยเครื่อง

Rotary evaporator เกือบแห้งและระเหยต่อด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้งซึ่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักไขมันในตัวอย่างโดยเอาน้ำหนัก Round-bottomed flask หักลบกัน (ถ้าน้ำหนักไขมัน < 2 กรัม ใช้ได้เลย, น้ำหนักไขมัน >2 กรัม ให้ชั่งไขมัน 2 กรัม) เนื่องจากสารเคมีกำจัดแมลงชนิดดีทีทีนั้นละลายได้ดีในไขมันซึ่งในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างจึงต้องใช้น้ำหนักไขมันในตัวอย่างไม่เกิน 2 กรัม เพื่อให้สารละลายที่ใช้สกัดมีประสิทธิภาพในการดึงสารดีทีทีออกจากตัวอย่าง เพื่อนำมาทำการตรวจวิเคราะห์

6.2.2 การล้างไขมัน โดยการนำไขมันจากข้อ 6.2.1

ใส่ Reparatory funnel ละลายด้วย n-hexane จำนวน 13 มิลลิลิตร และสกัดด้วย Acetonenitrile ที่อิมตัวด้วย n-hexane จำนวน 30 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ตั้งทิ้งไว้แยกชั้นนำส่วนที่ละลายอยู่ในชั้น Acetonenitrile สกัดต่อด้วย n-hexane 100 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเกลืออิมตัว 40 มิลลิลิตร เขย่า 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บชั้น n-hexane ใน Erlenmeyer flask เพื่อนำไปสกัดซ้ำ โดยเติม n-hexane 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บชั้น n-hexane รวมกันล้างด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทิ้งชั้นน้ำ (ล้าง 2 ครั้ง) ไขชั้น n-hexane รวมกันเติม Sodium sulfate anhydrous 100 กรัม ถ่ายสารสกัดลงใน Round-bottomed flask ผ่านกรวยกรองที่อุดด้วยสำลี และมี Sodium sulfate anhydrous หนาประมาณ 2 เซนติเมตร นำไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนเหลือประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอด graduated ปรับปริมาตรด้วย n-hexane เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์

6.2.3 การทำสารให้บริสุทธิ์ใช้ Alumina column บรรจุ Deactivated aluminum oxide เตรียมโดยการเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่า รวมกับ aluminum oxide 10 กรัม เทใส่ใน glass column ที่อุดปลายด้วยสำลี สูงประมาณ 1 เซนติเมตร เติม n-hexane 1 มิลลิลิตรและสารสกัดได้ 5 มิลลิลิตร แล้วชะด้วย n-hexane 100 มิลลิลิตร เก็บใน Round-bottomed flask ระเหยปริมาตรสุดท้ายเหลือ 5 มิลลิลิตร จะได้สารความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร (คำนวณจากตัวอย่างปลาเค็ม 20 กรัม) นำสารที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS

7. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี<sup>(3)</sup>

7.1 การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างปลาเค็ม และทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ สารไตรโคลอร์พอนและสารดีทีทีที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.002 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ใช้พีคที่มีความสูง 3 เท่า Signal to noise ratio แล้วคำนวณเป็นความเข้มข้นต่อน้ำหนักของตัวอย่าง

7.2 การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างปลาเค็ม และทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ สารไตรโคลอร์พอนและสารดีทีทีที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.005 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งนำค่ามาคำนวณ % Recovery และ Precision (% RSD) และ HORRAT (เกณฑ์การยอมรับต้องมีค่า < 2)

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

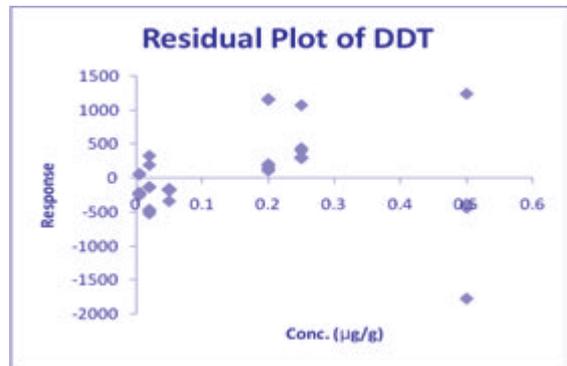
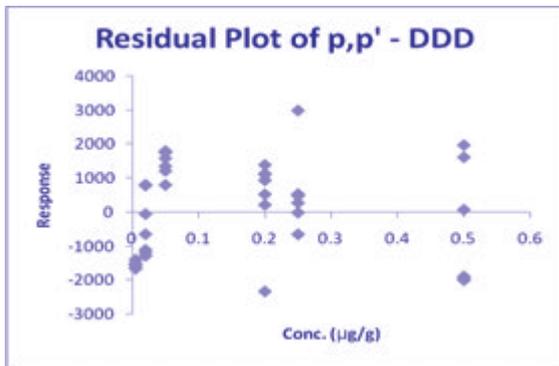
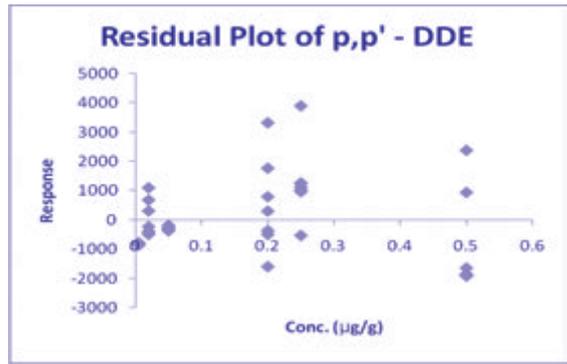
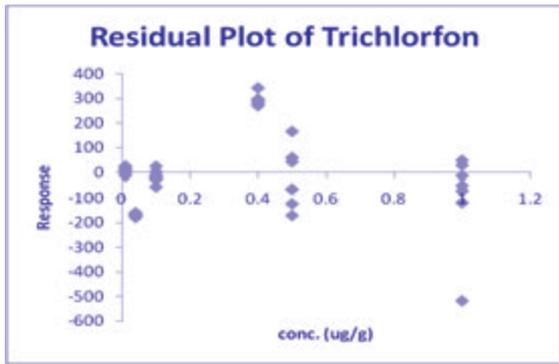
$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดย C เป็น Concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

7.3 การหา Linearity and working range

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างปลาเค็ม ทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากนั้นนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคและหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (R<sup>2</sup>) > 0.9950 ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารไตรโคลอร์พอนเป็น 0.010, 0.040, 0.100, 0.400, 0.500 และ 1.000 ไมโครกรัมต่อกรัม และสารดีทีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) 0.005, 0.020, 0.050, 0.200, 0.250 และ 0.500 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ พร้อมทั้งทำการยืนยันความเป็นเส้นตรง โดยใช้ Residual plot ดังภาพที่ 1



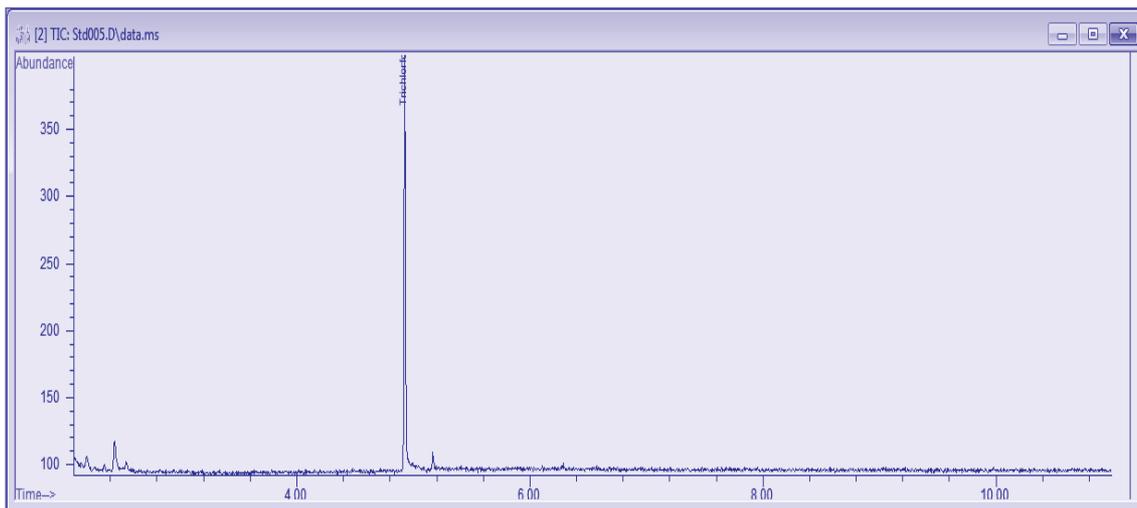
ภาพที่ 1 ผลการยืนยันความเป็นเส้นตรง โดยใช้ Residual plot สารไตรคลอโรฟอนและสารดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT)

#### 7.4 การหา Accuracy และ Precision

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น ลงในปลาเค็ม ทำการวิเคราะห์ ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำแล้วคำนวณค่าความแม่นยำ (Accuracy) ในรูปของการหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% Recovery), ค่าเฉลี่ย (Mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) สารละลายมาตรฐานไตรคลอโรฟอน ที่ระดับความเข้มข้น 0.010, 0.100 และ 0.500 ไมโครกรัมต่อกรัม และสารละลายมาตรฐานสารดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.050 และ 0.250 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

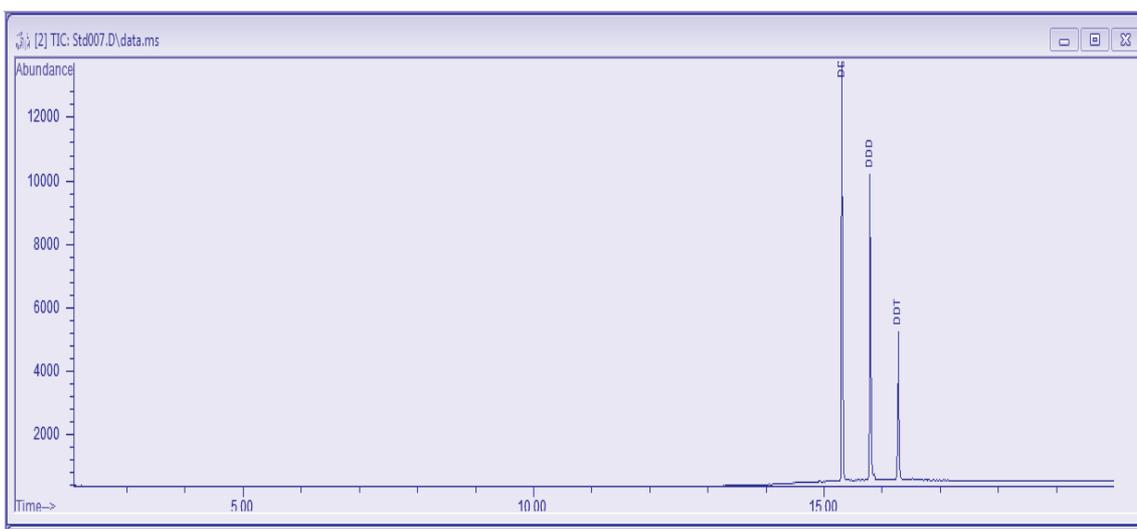
### ผลการศึกษา

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอน และดีดีที ในปลาแห้งและปลาเค็ม โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ ใช้ Electron impact (EI) และ Mode Selected Ion Monitoring (SIM) คอลัมน์ชนิด VertiBond™ 5 ms โดยนำตัวอย่างปลาเค็มมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย เพื่อทำสารให้บริสุทธิ์<sup>(4,6)</sup> ก่อนฉีดเข้าเครื่องจะเห็นว่า Chromatogram สามารถแยกได้ชัดเจนและไม่มีสารอื่นรบกวนสำหรับของสารไตรคลอโรฟอน ที่เตรียมจากตัวอย่างปลาเค็มและมีการเติมสารมาตรฐานสารไตรคลอโรฟอน ระดับความเข้มข้น 0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม สกัดด้วย อะซิโตนไนโตร ดีงน้ำออกโดยใช้ Sodium Sulfate Anhydrous นำสารที่สกัดได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS จะใช้เวลาการแยกของสารที่เกิดพีคขึ้นที่ 4.924 นาที ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลการแยกพีคที่อ่านจากเครื่อง GC-MS ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดไตรคลอโรฟอน ในตัวอย่างปลาเค็ม เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.010 ไมโครกรัมต่อกรัม

สำหรับสารดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) สกัดด้วย n-hexane และ Acetonitrile ที่อิมด้วย n-hexane นำไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator นำไขมันที่ได้จากการสกัดมาล้างและนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Alumina column ดึงน้ำออกโดยใช้ Sodium sulfate anhydrous นำสารที่สกัดได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS จะใช้เวลาการแยกของสารดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) ที่เกิดพีคที่ 15.311, 15.801 และ 16.280 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการแยกพีคที่อ่านจากเครื่อง GC-MS ของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดดีดีที (p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT) ในตัวอย่างปลาเค็มเติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ พบว่า ซีตจำกัดของการตรวจพบสารไตรคลอโรฟอนและดีดีทีเท่ากับ 0.005 และ 0.002 ไมโครกรัมต่อกรัม ซีตจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ 0.010 และ 0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง 0.005 - 0.500 ไมโครกรัมต่อกรัม และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าไม่น้อยกว่า 0.9950 ความแม่นยำแสดงด้วย % recovery ในช่วง 98.2 - 104.8 และความเที่ยงแสดงด้วย HORRAT มีค่า 0.04 - 0.33 (เกณฑ์ < 2)<sup>(3)</sup> ซึ่งปริมาณสาร Organochlorines Compound Group เป็นต่อกรัมเนื้อตัวอย่างปลาเค็ม ดังตารางที่ 2 และมีการ Selected Ion Monitoring (SIM) ตรวจวิเคราะห์ Quantified ion Target (m/z) และ Confirmed ion (m/z) ของสารแต่ละชนิด รายละเอียดดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 2** ความแม่นยำ (Accuracy) และ ความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างปลาเค็ม เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานไตรคลอโรฟอนและสารดีดีทีในระดับความเข้มข้นต่างๆ

Compound Group	Compound	Retention time (min)	Spiked Level (µg/g)	% Recovery (n=10) mean±SD	Experimental RSD	HORRAT < 2
Organo phosphorus	Trichlorfon	4.924	0.010	98.23±1.77	1.80	0.09
			0.100	99.47±1.68	1.69	0.11
			0.500	100.91±2.55	2.53	0.22
Organo chlorines	p,p'-DDE	15.311	0.005	99.73±5.20	5.22	0.22
			0.050	100.98±0.67	0.66	0.04
			0.250	100.82±4.21	4.18	0.32
	p,p'-DDD	15.801	0.005	100.86±8.03	7.66	0.33
			0.050	98.86±3.42	3.46	0.21
			0.250	100.92±2.94	2.91	0.23
p,p'-DDT	16.280	0.005	100.87±4.53	4.49	0.19	
		0.050	101.03±1.84	1.82	0.11	
		0.250	100.71±1.62	1.61	0.12	

หมายเหตุ : Spiked Level (µg/g) คือ การเติมสารละลายมาตรฐานไตรคลอโรฟอนและสารดีดีที ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างปลาเค็มก่อนสกัด (หน่วยไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อตัวอย่างปลาเค็ม)

**ตารางที่ 3** Selected Compound Group of Organophosphorus and Organochlorines pesticides in GC-MS confirmation analysis

Compound Group	Compound	Retention time (min)	Quantified ion (m/z) Target	Confirmed ion (m/z)	
				Q1	Q2
Organo phosphorus	Trichlorfon	4.924	109	79	110
Organo chlorines	p,p'- DDE	15.311	246	318	248
	p,p'- DDD	15.801	235	237	165
	p,p'- DDT	16.280	235	237	236

## สรุปผลและวิจารณ์

วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอน และดีดีที ในปลาแห้งและปลาเค็ม โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ ใช้คอลัมน์ชนิด VertiBond™ 5 ms นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมของแต่ละสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิด เพื่อให้สารบริสุทธิ์ เนื่องจากสารเคมีกำจัดแมลงชนิดดีดีทีนั้นละลายได้ดีในไขมัน ซึ่งในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างจึงต้องใช้น้ำมันในตัวอย่างไม่เกิน 2 กรัม เพื่อให้สารละลายที่ใช้สกัดมีประสิทธิภาพในการดึงสารดีดีทีออกจากตัวอย่าง เพื่อนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ ก่อนฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ตรวจวิเคราะห์ได้ดีกว่าเครื่อง GC -µECD เพราะการวิเคราะห์โดยเครื่อง GC -µECD เป็นการอาศัยการเปรียบเทียบ retention time ของเวลาตรงกันระหว่างพีคของสารในตัวอย่างกับพีคของสารมาตรฐานในการตรวจชนิดของสารเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจทำให้มีโอกาสรายงานผลผิดพลาดได้ จึงทำให้ต้องมีการตรวจยืนยันที่อาศัยสัดส่วนที่จำเพาะของ Fragmentions ที่เกิดจากการแตกตัวของสารแต่ละชนิดเมื่อชนกับอิเล็กตรอนและตรวจวัด Quantified และ Confirmed ions ตามแต่ละชนิดของสารด้วยแมสสเปกโตรมิเตอร์<sup>(5)</sup> และพีคที่ได้มีการแยกอย่างเห็นได้ชัด จึงทำให้ผลที่ได้ มีความจำเพาะถูกต้อง มีความแม่นยำ รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ใน ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเป็นงานประจำและงานวิจัยต่อไป

## ข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดไตรคลอโรฟอน และดีดีที ในปลาแห้งและปลาเค็มโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ใช้ mode Selected Ion Monitoring (SIM) คอลัมน์ชนิด VertiBond™ 5 ms สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างปลาเค็มและเนื้อสัตว์ประเภทอื่นได้ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารและการคุ้มครองผู้บริโภคและเพื่อการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพและแจ้งเตือนภัยอย่างต่อเนื่อง

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายสังคม วิทยานันท์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ และเจ้าหน้าที่งานอาหารช่วยในงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

## บรรณานุกรม

1. กอบทอง รูปหอม และคณะ. (2538). *สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและพืชในอาหาร พ.ศ. 2534-2536*. วารสารวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 37(2): 145-160.
2. นันทพร ภัทรพร. (2553). *สารพิษกับผู้ประกอบการอาชีพ*. สำนักบริการวิชาการมหาวิทยาลัยบูรพา.
3. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. (2549). *แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยห้องปฏิบัติการเดียว*. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
4. ยูวดี เลิศเรืองเดช และ พัชรวรรณ จงมีวาสนา. (2540, มกราคม-มีนาคม). *การวิเคราะห์ไตรคลอโรฟอนในปลาแห้งปลาเค็ม*. วารสารวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 39 (1): 45-51
5. รัตติยากร ศรีโคตร และ วิชาดา จงมีวาสนา. (2553). *การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน 18 ชนิด ในเนื้อเยื่อสัตว์ โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี*. วารสารวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 52 (1-2): 15-29.
6. William Horwitz, Editor. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC international 1 volume. 17<sup>th</sup> Edition. Pesticide and Industrial Chemical Residues. USA. chapter 10:p 10-14.*

