

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์

วีรวุฒิ วิทยานันท์ และ ธรณิศวรรี ไชยมงคล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ฟิโพรนิล (fipronil) เป็นสารกำจัดแมลงที่เมื่อสลายตัวให้สารเมตาโบไลต์ที่มีพิษทำลายระบบประสาทรุนแรง ประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในพืชแต่ห้ามใช้กับสัตว์ที่เป็นอาหาร ในปี พ.ศ. 2560 พบไข่ที่ผลิตในสหภาพยุโรปปนเปื้อนสารฟิโพรนิล สร้างความวิตกกังวลแก่ผู้บริโภคไทย ทำให้ต้องหาวิธีเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการตกค้างของสารฟิโพรนิลในไข่และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศไทย จึงได้พัฒนาการสกัดจากวิธี EN 15662:2018 QuEChERS ตรวจวัดด้วยเทคนิค selected reaction monitoring (SRM) จากเครื่อง GC-MS/MS คำนวณผลด้วย matrix-matched calibration curve ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ 2 ชนิด (fipronil-desulfinyl และ fipronil-sulfone) ในไข่ไก่และไข่เป็ด พบว่าค่า LOD และ LOQ เป็น 0.002 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำกับตัวอย่างที่เติมสารที่ระดับ 0.005, 0.05 และ 0.1 mg/kg ค่าร้อยละในการคืนกลับ (recovery) อยู่ในช่วง 92.9-111.6% โดยมีความเที่ยงแสดงด้วย RSD น้อยกว่า 8.6% การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดให้ค่า relative standard uncertainty น้อยกว่า 20% มีช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 0.005-0.5 mg/kg อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ เป็นวิธีที่มีความไว แม่นยำและเชื่อถือได้เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ เมื่อใช้วิธีนี้ตรวจสอบไข่และผลิตภัณฑ์จำนวน 66 ตัวอย่าง ที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑลในปี พ.ศ. 2564 ผลไม่พบการตกค้างของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในทุกตัวอย่าง บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปใช้สำหรับการเฝ้าระวังการตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์ต่อไป

คำสำคัญ: ฟิโพรนิล, ไข่, GC-MS/MS, การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี

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

Received: 2 October 2021

Revised: 6 February 2022

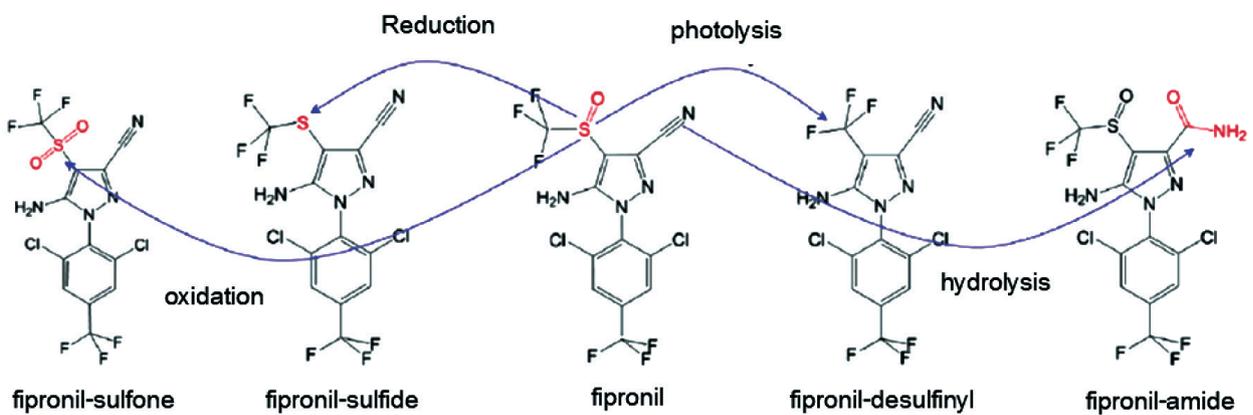
Accepted: 8 February 2022

บทนำ

ไพโรนิล (fipronil) เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (pesticide) ประเภทสารฆ่าแมลง (insecticide) กลุ่ม phenyl pyrazole มีข้อบ่งชี้ในการใช้งานกว้าง สามารถกำจัดแมลงได้หลายชนิด เช่น ใช้กำจัดเห็บและหมัดในสุนัข ใช้ฆ่าเพลี้ย หนอน มด ปลวก เป็นต้น⁽¹⁾ เป็นสารที่ถูกจำกัดให้ใช้เฉพาะกับพืชและสัตว์เลี้ยงในบ้านเพื่อการสาธารณสุขเท่านั้น ห้ามมิให้ใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร เนื่องจากเมื่อสัตว์ได้รับสารไพโรนิลเข้าสู่ร่างกายจะเกิดกระบวนการ metabolism เป็นสารเมตาโบไลต์ที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์สูงโดยเฉพาะกับเด็ก⁽²⁾ สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (Environmental Protection Agency: EPA) พบว่าเมื่อได้รับสารนี้เข้าไปจะเกิดอาการเหงื่อออกมาก คลื่นไส้ อาเจียน ปวดและเวียนศีรษะ ปวดท้อง ชัก และเสียชีวิตได้⁽³⁾ ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ระบุว่าสารไพโรนิลเป็นสารพิษระดับกลาง จัดอยู่ใน Class II moderately hazardous เมื่อได้รับในปริมาณมากจะเป็นอันตรายต่อตับไต และระบบน้ำเหลือง⁽⁴⁾ ไพโรนิลเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีความเป็นขั้วปานกลางและสามารถละลายในตัวทำละลายบางชนิดได้ดี เช่น acetone toluene เป็นต้น⁽⁵⁾ ในธรรมชาติสารไพโรนิลจะทำปฏิกิริยาต่างๆ เช่น photolysis, hydrolysis, reduction และ oxidation เกิดเป็นสาร fipronil-desulfinyl, fipronil-amide, fipronil-sulfide และ fipronil-

sulfone ตามลำดับ⁽⁶⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1 การตรวจวัดการปนเปื้อนตกค้างจึงต้องคำนึงถึงสารเมตาโบไลต์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น เมื่อสารไพโรนิลถูก oxidized ด้วย cytochrome P450 ในสัตว์จะเกิดเป็น fipronil-sulfone⁽⁷⁾ ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังมากกว่าเดิมถึง 20 เท่า แม้ว่าไพโรนิลเป็นสารที่มีความคงตัวต่ำ แต่สารเมตาโบไลต์กลับมีความคงตัวสูงกว่ามาก⁽⁸⁾ นอกจากนี้ยังสามารถจับตัวกับชั้นไขมันได้ดีมีคุณสมบัติเป็น bioaccumulate ในห่วงโซ่อาหาร พบว่าในธรรมชาติเมื่อไพโรนิลถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยแสงเกิดเป็นสาร fipronil-desulfinyl ในปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงเลือกตรวจวิเคราะห์สารรวม 3 ชนิด ได้แก่ สารตั้งต้นหรือ active form คือ ไพโรนิล และสารเมตาโบไลต์ 2 ชนิด ได้แก่ fipronil-desulfinyl และ fipronil-sulfone

จากการสืบค้นวิธีตรวจวิเคราะห์สารไพโรนิล พบว่ามีข้อมูลการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในปริมาณจำกัด โดยปกติจะใช้เครื่อง GC-ECD, GC-MS/MS และ LC-MS/MS เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์^(9,10) ส่วนวิธีการเตรียมตัวอย่างมีทั้งวิธี liquid-liquid partition, solid-phase extraction (SPE) และ solid-phase microextraction ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้สารเคมีจำนวนมาก และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการนำวิธี QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย⁽¹¹⁾ มีรายงานการใช้วิธีนี้สำหรับการเตรียมตัวอย่างไข่เพื่อวิเคราะห์สารไพโรนิลไม่มากนัก



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารไพโรนิลและเมตาโบไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ⁽⁵⁾

ซึ่งเป็นวิธีที่น่าจะมีความเหมาะสมต่อการใช้งานมากที่สุด เพราะนอกจากจะใช้ตรวจวิเคราะห์ฟิโพรนิลแล้วยังสามารถใช้เป็น multiresidue method ร่วมกับสารชนิดอื่นๆ ได้เป็นจำนวนมาก⁽¹²⁾ มีรายงานการใช้วิธีนี้สำหรับเตรียมตัวอย่างไข่เพื่อวิเคราะห์สารฟิโพรนิลไม่มากนัก รวมทั้งความท้าทายของการเตรียมตัวอย่างไข่ คือ การกำจัดสารรบกวน (interference) ที่เป็นโปรตีน ไขมัน และคอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นองค์ประกอบให้ได้มากที่สุด เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ให้สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับต่ำมากได้ การเลือกใช้ GC-MS/MS เป็นเครื่องมือที่มีความเหมาะสมเพราะให้ความไวและความเป็นเส้นตรง (linearity) ของการวิเคราะห์ที่ดี

ในปี พ.ศ. 2560 องค์การความปลอดภัยของอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA) พบการปนเปื้อนของสารฟิโพรนิลและสารอื่นๆ ในตัวอย่างไข่ไก่ที่มีการสุ่มตรวจ สูงเกินกว่ากฎหมายของสหภาพยุโรปซึ่งกำหนดไว้ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹³⁻¹⁵⁾ ทำให้มีการทำลายไข่ไก่เป็นจำนวนมาก และมีการขยายผลการตรวจในสินค้าเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากไข่ไก่ด้วย ส่งผลให้เกิดความตระหนักไปทั่วโลก ประเทศญี่ปุ่น และ Codex⁽¹⁶⁾ กำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit: MRL) ของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในไข่ที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับประเทศไทยกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง โดยกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดในพืชบางชนิดที่ระดับแตกต่างกันไป และค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) สำหรับอาหารอื่นๆ รวมทั้งไข่ไก่ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยชนิดสารพิษตกค้างในพืชเป็น fipronil (ละลายในไขมัน) และในสัตว์เป็นผลรวมของ fipronil และ fipronil-sulfone รายงานผลเป็น fipronil (ละลายในไขมัน)⁽¹⁷⁾ ซึ่งปัจจุบันกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ให้บริการตรวจวิเคราะห์สารฟิโพรนิลในผักและผลไม้⁽¹⁸⁾ โดยมี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ยังไม่มียวิธีตรวจสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในไข่และผลิตภัณฑ์ในระดับ

ที่กฎหมายกำหนด จึงต้องมีการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่าง การสกัดและการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ตามค่าที่กฎหมายกำหนด นอกจากนี้ยังต้องการประเมินความใช้ได้ของวิธี เพื่อใช้ในงานบริการเมื่อได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อสำรวจติดตามเบื้องต้นการปนเปื้อนของสารฟิโพรนิล ปัจจุบันไม่พบข้อมูลการใช้สารฟิโพรนิลในฟาร์มไก่ในประเทศไทย และยังไม่มียรายงานการสำรวจการปนเปื้อนของสารฟิโพรนิลในไข่ไก่ในประเทศไทย จึงเป็นการสำรวจครั้งแรกของประเทศไทยว่ามีการใช้งานผิดวัตถุประสงค์หรือไม่ เพื่อทราบสถานการณ์และสามารถใช้เพื่อแจ้งเตือนภัย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดสด ห้างสรรพสินค้า ร้านค้าปลีก และร้านสะดวกซื้อในพื้นที่ประชากรหนาแน่นของประเทศ คือ เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล 5 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี นครปฐม นนทบุรี สมุทรปราการ และสมุทรสาคร รวมทั้งสิ้น 6 จังหวัด ซึ่งสินค้าที่ผลิตในเขตเกษตรกรรมอื่นถูกนำมาจำหน่ายในบริเวณนี้จำนวนมาก และมีการกระจายตัวของสินค้าออกไปในบริเวณกว้าง หากพบการปนเปื้อนจะสามารถตรวจสอบกลับไปยังแหล่งผลิตได้ แต่หากไม่พบการปนเปื้อนใดๆ ในบริเวณนี้อาจมีการขยายผลเป็นโครงการสำรวจติดตามไปยังพื้นที่ต่างๆ ให้ครอบคลุมทั้งประเทศต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์ สำหรับให้บริการตรวจวิเคราะห์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง และค่ากำหนดของโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius) โดยมีคุณลักษณะของวิธีสอดคล้องกับมาตรฐานและกฎหมายที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งสำรวจและตรวจสอบสินค้าไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล เพื่อให้ทราบสถานการณ์เบื้องต้นของการตกค้างของสารฟิโพรนิลในอาหารก่อนถึงมือผู้บริโภค ใช้ผลสำหรับแจ้งเตือนภัยและขยายผลการสำรวจติดตามในวงกว้างให้ครอบคลุมทั้งประเทศต่อไป อีกทั้งสามารถนำเสนอข้อมูลให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสำหรับการจัดการความเสี่ยงของการได้รับสารพิษอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี (Reagents) ได้แก่ acetonitrile (HPLC, Merck, USA) acetone (AR, RCI Labscan, USA) n-hexane (PG, Burdick & Jackson, USA) ethyl acetate (HPLC, Burdick & Jackson Korea) QuEChERS Extraction Packet (Agilent Technologies, USA) EN Method Part No: 5982-7650 เป็นส่วนผสมของ $MgSO_4$ 4 g NaCl 1 g sodium citrate dehydrate 1 g และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 g Dispersive SPE 15 mL, Fatty sample, EN (Agilent Technologies, USA) เป็นส่วนผสมของ $MgSO_4$ 900 mg PSA 150 mg และ C18EC 150 mg (Agilent Technologies, USA) น้ำ reverse osmosis (RO) D-sorbitol (AR, purity $\geq 98\%$) วัสดุควบคุมคุณภาพ Quality Control Material (QCM) FCPM11-EGG2QC Pesticide Residues (fat soluble) in Chicken (Hens)

สารมาตรฐาน (standards) ได้แก่ fipronil fipronil-desulfinyl และ fipronil-sulfone เกรด วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material: CRM, Dr. Ehrenstorfer, Germany) ความบริสุทธิ์ (purity) $\geq 98.5\%$

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Stock standard solution) แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น $100 \mu\text{g/mL}$ ใน acetone แล้วเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม 3 ชนิด (mixed intermediate standard solution) ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/mL}$ ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย acetone เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -18^\circ\text{C}$ ก่อนการใช้งาน เจือจาง intermediate standard solution ด้วย acetone หรือสารสกัดจากตัวอย่าง เพื่อทำ working standard solution ช่วงความเข้มข้น 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ $1.0 \mu\text{g/mL}$ เติมสารละลาย D-sorbitol 3% (analytical protectant) ปริมาตร 3 μL ในสารละลาย 1 mL ใช้วิเคราะห์

ทันทีหรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -18^\circ\text{C}$ ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 g Sartorius รุ่น LP 620S และ 0.01 mg Sartorius รุ่น MC 210S (Sartorius AG, Germany) สำหรับชั่งตัวอย่างและสารมาตรฐาน เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating box และใช้แก๊สไนโตรเจน (N_2) ในการระเหยสารสกัด REACTI-THERM III #TS-18824 Thermo scientific เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vortex-2 Genie micropipette ขนาด 2–20 μL amber vial centrifuge tube ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18°C certified volumetric flask ก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

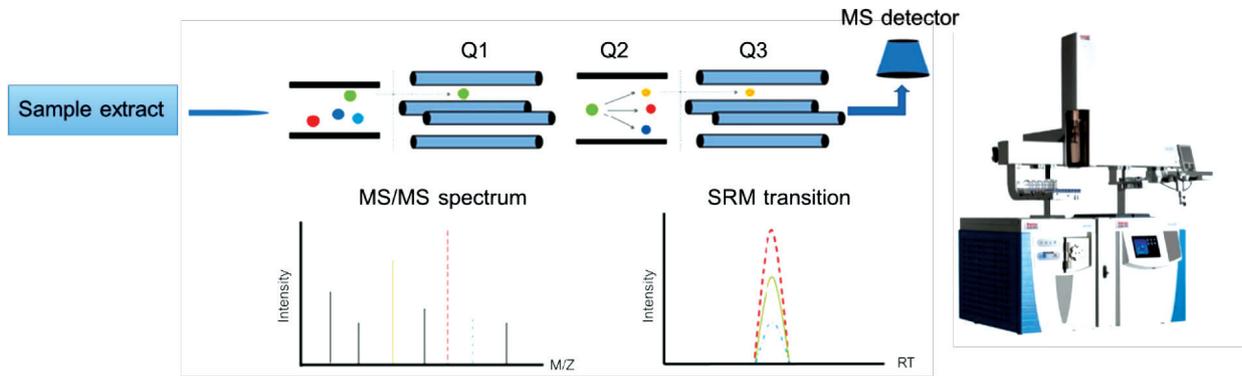
เครื่อง Gas Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS) ของ Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph (Thermo Scientific, Italy) ต่อกับเครื่อง TSQ 9000, Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Scientific, Italy) โดยใช้ PAL RTC auto-sampler และใช้ TraceFinder 4.1 EFS software ทำให้สารเป็นประจุด้วย electron ionization mode (EI, 70 eV) สารจะถูกแยกด้วย fused silica capillary column DB-5ms (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) ของ Agilent Technologies โปรแกรมที่ใช้สำหรับปรับอุณหภูมิใน oven ของเครื่อง GC เริ่มจาก 70°C เป็นเวลา 1 นาที เพิ่มที่อัตรา 50°C ต่อนาที จนถึง 150°C เพิ่มที่อัตรา 6°C ต่อนาที จนถึง 200°C เพิ่มที่อัตรา 16°C ต่อนาที จนถึง 280°C คงไว้ 8.5 นาที จากนั้นเพิ่มที่อัตรา 50°C ต่อนาที ถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ 300°C คงไว้ 0.5 นาที ใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 25 นาที โดยมี injection volume เป็น 2 μL ใช้ inlet ชนิด programmable temperature vaporizing (PTV) ตั้งอุณหภูมิของ PTV ไว้ที่ 80°C ค้างไว้ 0.1 นาที เพิ่มที่อัตรา 5°C ต่อนาที จนถึง 300°C ตั้งอุณหภูมิ

ion source เป็น 280°C และ quadrupole MS1 และ MS2 เป็น 180°C เมื่อสารเข้าสู่เครื่อง GC-MS/MS จะถูกทำให้แตกตัวเป็นประจุโดยใช้แก๊สไนโตรเจน

เป็น quench gas และ Argon เป็น collision gas ถูกตรวจวัดด้วย selected reaction monitoring (SRM) mode ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2

ตารางที่ 1 Selected reaction monitoring (SRM) transitions และ collision energies ของสาร fipronil และเมตาโบไลต์

Compound (RT, min)	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (eV)	Transition type
fipronil-desulfinyl (12.07)	333	231	20	Quantification
	333	281	12	Qualification-1
	388	281	26	Qualification-2
	388	333	12	Qualification-3
	390	333	12	Qualification-4
	390	335	12	Qualification-5
fipronil (13.86)	255	157	34	Quantification
	255	228	14	Qualification-1
	351	255	14	Qualification-2
	367	213	28	Qualification-3
	367	245	20	Qualification-4
	369	215	30	Qualification-5
fipronil-sulfone (15.02)	255	228	10	Quantification
	335	255	10	Qualification-1
	383	255	15	Qualification-2
	385	257	15	Qualification-3
	452	241	20	Qualification-4
	452	255	25	Qualification-5



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของ selected reaction monitoring (SRM) mode ด้วยเครื่อง GC-MS/MS (ภาพจากเอกสารประกอบการบรรยายการใช้เครื่องมือจากบริษัท AB Sciex Thailand Ltd.)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี 2 ชนิด ได้แก่ ไข่ไก่และไข่เป็ด ใช้เฉพาะไข่ขาวและไข่แดง ไม่รวมเปลือก ปั่นผสมตัวอย่างแต่ละชนิดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีผสมอาหาร ซึ่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น analytical portions โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนักไข่ไก่และไข่เป็ด 10.0 ± 0.1 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL ตัวอย่างที่ยังไม่นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C สำหรับตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์จากไข่ ใช้ตัวอย่างอาหารประมาณ 200–300 กรัม ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

การสกัดตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ชั่งไว้เติม acetonitrile ปริมาตร 10 mL เขย่าด้วยมืออย่างแรง 1 นาที เติม QuEChERS extraction pocket เขย่าต่ออีก 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดส่วนใสด้านบน 5 mL ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 mL จากนั้นเติม Dispersive SPE เขย่าด้วยมือ 30 วินาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายชั้นบน ปริมาตร 2 mL นำไประเหยแห้ง ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมของ n-hexane:ethyl acetate (3:1) เป็น 2 mL เติม D-sorbitol 3% ปริมาตร 6 μL ได้ความเข้มข้นตัวอย่าง 1 g/mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

ตัวอย่างสำหรับการสำรวจติดตามเบื้องต้น สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ไข่สดชนิดแบ่งขายและชนิดมีบรรจุภัณฑ์

ประกอบด้วยไข่ไก่และไข่เป็ด ตัวอย่างละ 12 ฟอง ไข่นกระทา ตัวอย่างละ 30 ฟอง และผลิตภัณฑ์จากไข่ ได้แก่ ขนมที่ทำจากไข่ เช่น ทองหยอด ทองหยิบ ฝอยทอง ตัวอย่างละ 200–300 g ไข่เหลวบรรจุขวดไข่ตุ๋น พร้อมบริโภคเต้าหู้ไข่ ตัวอย่างละ 2 หน่วย (ขวด/ถ้วย/หลอด) และไข่ผง ตัวอย่างละ 200–300 g โดยสถานที่เก็บตัวอย่างเป็นตลาดสด ห้างสรรพสินค้าร้านค้าปลีก และร้านสะดวกซื้อในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี นครปฐม นนทบุรี สมุทรปราการ และสมุทรสาคร รวม 6 จังหวัด จำนวน 11 ตัวอย่างต่อจังหวัด รวมทั้งสิ้น 66 ตัวอย่าง โดยแบ่งระยะเวลาการเก็บเป็น 3 เดือน เดือนละ 2 จังหวัด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แผนการเก็บตัวอย่างไข่และผลิตภัณฑ์ จำนวน 66 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2564 (จังหวัดละ 11 ตัวอย่าง)

เดือน	จังหวัด
เมษายน	กรุงเทพมหานคร นนทบุรี
พฤษภาคม	ปทุมธานี สมุทรสาคร
มิถุนายน	นครปฐม สมุทรปราการ

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ประยุกต์ใช้วิธีที่อ้างอิงจากวิธีมาตรฐานของสหภาพยุโรป EN 15662:2018 ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากพืช (food of plant origin) แบบ multiresidue method

ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) และเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี (LC) โดยการสกัดด้วย acetonitrile และ partition ด้วยวิธี QuEChERS ทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive SPE ดัดแปลงให้ใช้กับอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (animal origin food) ซึ่งเป็นตัวอย่างไข่ไก่และไข่เป็ด ด้วยการหา mass transition condition จากเครื่อง GC-MS/MS ที่จำเพาะต่อสารสนใจและคัดเลือก dispersive SPE ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์อาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (fatty sample) รวมถึงการปรับตัวทำละลายสุดท้ายให้มีความเป็นขี้ที่เข้ากับสารฟิโพรนิล

ความจำเพาะของวิธี

ฉีดสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนด จำนวน 3 ซ้ำ บันทึก retention time (RT) และ ion intensity ratio แล้วทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank (reagent blank) ที่ใช้น้ำ RO แทนตัวอย่าง และ sample blank ได้แก่ ไข่ไก่และไข่เป็ด เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี RT และ/หรือ ค่า m/z ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานแบบ matrix-matched calibration (MMC) ศึกษาโดยใช้สารสกัดที่ได้จากไข่ไก่และไข่เป็ดที่เป็น blank เป็นตัวทำละลาย เจือจาง intermediate standard solution ให้ได้ 12 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.0002, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ และฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS แบบสุ่ม (random, $n = 3$) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ขีดจำกัดของการตรวจพบ

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection: LOD) ศึกษาโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารสกัดจากไข่ไก่และไข่เป็ดที่ระดับ LOD แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS คำนวณค่า signal-to-noise ratio

(S/N) จากนั้นยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้น 0.002 mg/kg โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างไข่ไก่และไข่เป็ด สกัดตามขั้นตอนวิเคราะห์จำนวน 7 ซ้ำ ($n = 7$) แล้วคำนวณค่า S/N ค่า LOD คือ ระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N มากกว่า 3

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) ศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg วิเคราะห์ จำนวน 7 ซ้ำ ($n = 7$) แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 70–120 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ศึกษาโดยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.020, 0.050, 0.1, 0.2 และ 0.5 mg/kg วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n = 3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ศึกษาโดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ LOQ, 10 และ 20 เท่าของ LOQ ซึ่งมีความเข้มข้นเป็น 0.005, 0.05 และ 0.1 mg/kg ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ ($n = 7$) แล้วคำนวณ %recovery และ RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (mean recovery) ในช่วง 70–120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (RSD) มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty: MU) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่ทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM⁽¹⁹⁾ ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้น

คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k=2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์

ศึกษาผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect: ME) โดยฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่ต้องการที่ได้จาก spiked matrix blank และ standard on solution แล้วสร้าง curve ระหว่างความเข้มข้น (x-axis) กับ peak area หรือ intensity/response (y-axis) คำนวณ slope ของกราฟมาตรฐาน จากสมการ $y = ax + b$ โดย x คือ analyte concentration, y คือ analyte peak, a คือ ความชันของ calibration curve และ b คือ จุดตัดแกน y คำนวณ matrix factor จากสมการ MF (matrix factor) = $a(\text{matrix})/a(\text{solvent})$ จากนั้นคำนวณ ME (%) จากสมการ $ME (\%) = (MF - 1) \times 100$ หากผลการประเมินพบว่า ME (%) มีผลกระทบน้อย (soft) แสดงว่าผลกระทบของเมทริกซ์ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์และสามารถใช้ standard on solution ในการคำนวณผลได้ หากพบว่าผลกระทบปานกลางและมาก (medium and strong) แสดงว่าไม่สามารถใช้ standard on solution ในการคำนวณ

ผลได้ เกณฑ์การตัดสินผลกระทบของเมทริกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 3 หากเครื่องหมาย ME (%) เป็นบวก ผลกระทบของเมทริกซ์จะเป็นแบบ enhancement หากเครื่องหมาย ME (%) เป็นลบ ผลกระทบของเมทริกซ์จะเป็นแบบ suppression⁽²⁰⁾

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีศึกษาโดยนำวัสดุควบคุมคุณภาพในตัวกลาง (matrix quality control material) QCM Product Code FCPM11-EGG2QC จาก FAPAS[®] ซึ่งทราบค่าความเข้มข้นของ fipronil-sulfone ใน chicken (hens) eggs เป็น 12.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มีช่วงยอมรับอยู่ระหว่าง 6.7–17.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นแล้ว ผลที่ได้ต้องอยู่ในช่วงยอมรับ จึงจะแสดงว่าวิธีมีความถูกต้อง และขยายขอบข่ายชนิดตัวอย่างจากการใช้ตัวอย่างไข่ไก่และไข่เป็ดในขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ด้วยการทำ internal quality control โดยการทดสอบการคืนกลับที่ระดับ LOQ ในตัวอย่างไข่นกกระทาและผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากไข่อื่น ๆ ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ผลต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ %recovery อยู่ระหว่าง 70–120%

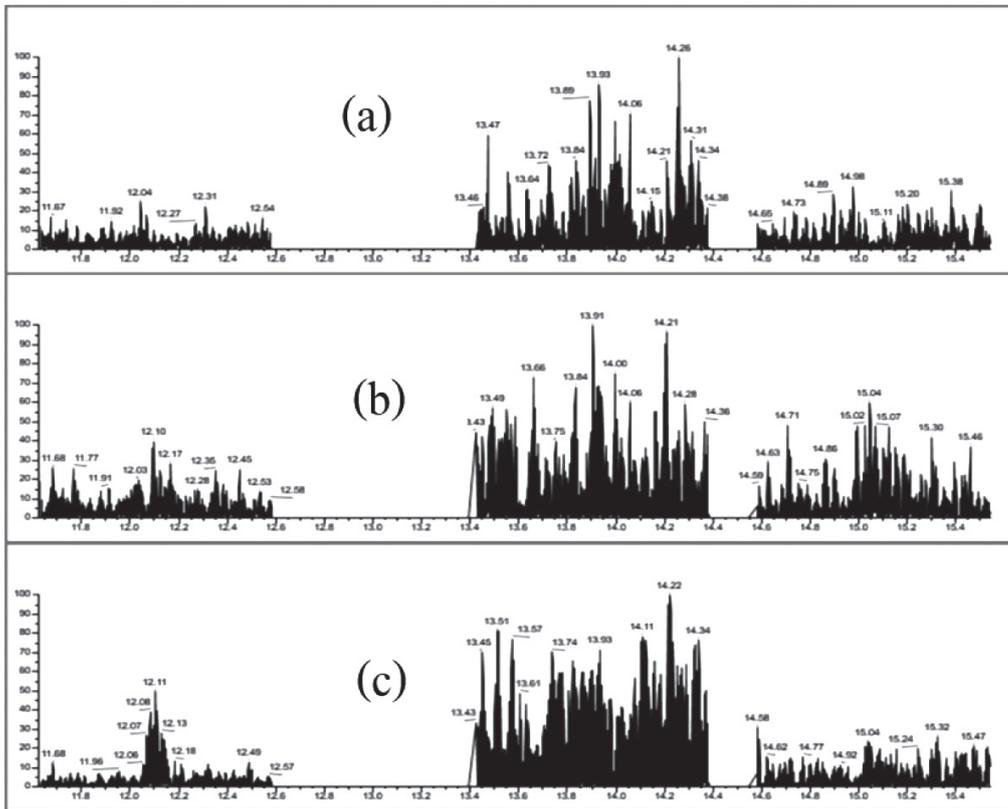
ตารางที่ 3 เกณฑ์การตัดสินผลกระทบของเมทริกซ์

Matrix effect (%)	Consideration	Result	Consideration
-20% to 20 %	Soft	Negative (-)	Suppression
> 20% to 50%	Medium	Zero (0)	No matrix effect
> 50%	Strong	Positive (+)	Enhancement

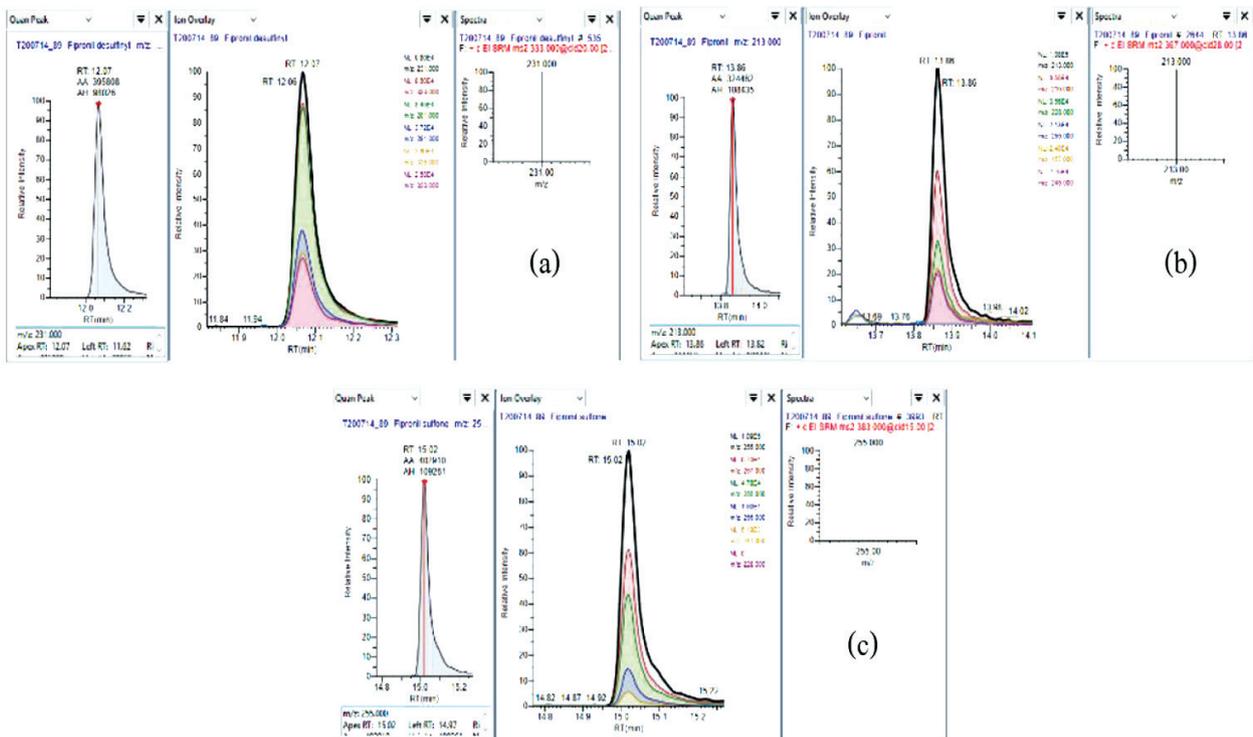
ผล

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ความจำเพาะของวิธี พบว่า peak ที่ได้จากการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ที่เป็นไข่ไก่และไข่เป็ด โดยใช้เครื่อง GC-MS/MS ด้วยเทคนิค SRM ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับ retention time (RT) ของสารมาตรฐาน และพีคที่

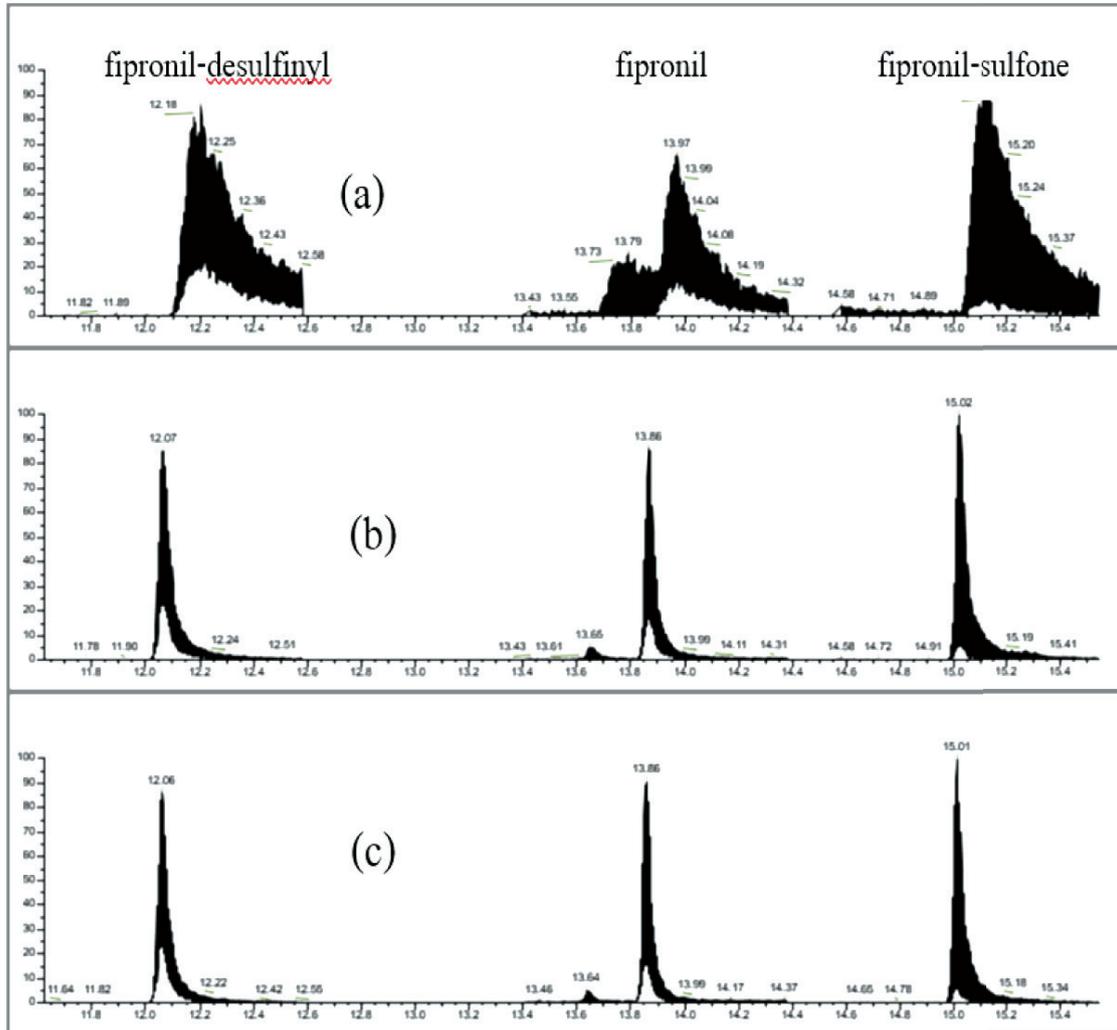
ตรวจพบมีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ซึ่งแสดงว่าวิธีมีความจำเพาะ ดังแสดงในภาพที่ 3 การวิเคราะห์แบบ SRM ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ทำให้ตรวจวัดฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ ได้อย่างชัดเจน เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดสารสนใจในเมทริกซ์ที่มีสารรบกวนได้ดี ดังแสดงในภาพที่ 4-5



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ method blank (a) matrix blank ไข่ไก่ (b) และ matrix blank ไข่เป็ด (c)



ภาพที่ 4 Quantification and qualification peak ของสาร fipronil-desulfinyl (a), fipronil (b) และ fipronil-sulfone (c)



ภาพที่ 5 Total ion chromatogram (TIC) ของสาร fipronil-desulfinyl, fipronil และ fipronil-sulfone ใน acetone (a), ไข่ไก่ (b) และไข่เป็ด (c)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area (response) ของสารสนใจมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.0002 ถึง 1 $\mu\text{L/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 6 โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า r ในช่วง 0.997–0.999 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับที่ 0.995

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 0.002 mg/kg ($S/N > 3$) และการยืนยันโดยการสกัดตัวอย่างที่ระดับ LOD ผลพบว่าพบสารทุกชนิดทั้ง 7 ชนิด โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 mg/kg ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีดังแสดงในตารางที่ 5 ความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ

LOQ, 10 และ 20 เท่าของ LOQ ที่ 0.005, 0.05 และ 0.1 mg/kg ให้ %recovery อยู่ระหว่าง 92.9–111.6% โดยมีความเที่ยงแสดงด้วย RSD น้อยกว่า 8.6% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70–120% และ $\leq 20\%$ ตามลำดับ

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 4 LOD ที่ 0.002 mg/kg และ LOQ ที่ 0.005 mg/kg พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.005–0.5 mg/kg ด้วยคุณลักษณะทั้งหมดที่ทำการทดสอบความใช้ได้แสดงว่าสามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์สารสนใจดังกล่าวได้

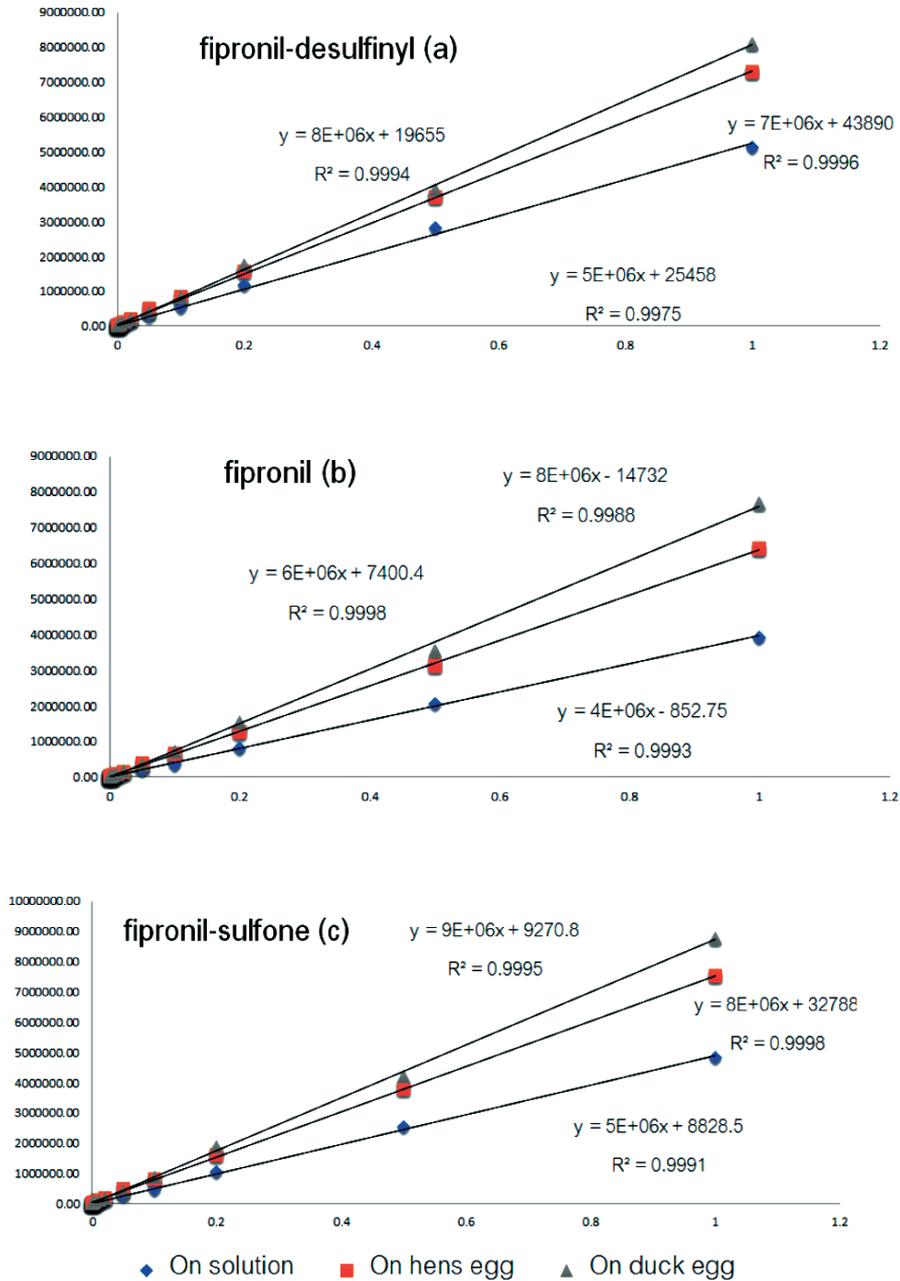
การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์ จากภาพที่ 6 ความชันของกราฟมาตรฐานสาร fipronil-desulfinyl, fipronil และ fipronil-sulfone และค่า ME (%) ที่คำนวณได้ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าผลกระทบของเมทริกซ์

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ) และ Linearity of working range

Compounds	S/N ratio (at LOD = 0.002 mg/kg)	Working range (mg/kg)	r (chicken egg/duck egg)
fipronil-desulfinyl	Infinity	0.005-0.5	0.9998/0.9990
fipronil	31-4329	0.005-0.5	0.9997/0.9991
fipronil-sulfone	63-170	0.005-0.5	0.9998/0.9995

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

Compounds	Matrix	Spiked level (mg/kg)	%Recovery (mean, mg/kg)	%RSD
fipronil-desulfinyl	chicken egg	0.005	95.7 (0.00479)	8.62
		0.05	99.1 (0.04956)	6.11
		0.1	99.1 (0.09908)	4.86
	duck egg	0.005	98.8 (0.00494)	6.17
		0.05	94.4 (0.04720)	5.55
		0.1	111.0 (0.11100)	7.86
fipronil	chicken egg	0.005	92.9 (0.00465)	6.47
		0.05	100.7 (0.05033)	6.40
		0.1	101.0 (0.10100)	5.77
	duck egg	0.005	111.6 (0.00558)	6.55
		0.05	100.7 (0.05034)	8.57
		0.1	104.2 (0.10420)	8.56
fipronil-sulfone	chicken egg	0.005	96.2 (0.00481)	5.64
		0.05	105.1 (0.05256)	5.41
		0.1	101.6 (0.10160)	2.85
	duck egg	0.005	107.0 (0.00535)	6.03
		0.05	99.1 (0.04954)	6.22
		0.1	110.8 (0.11080)	8.15



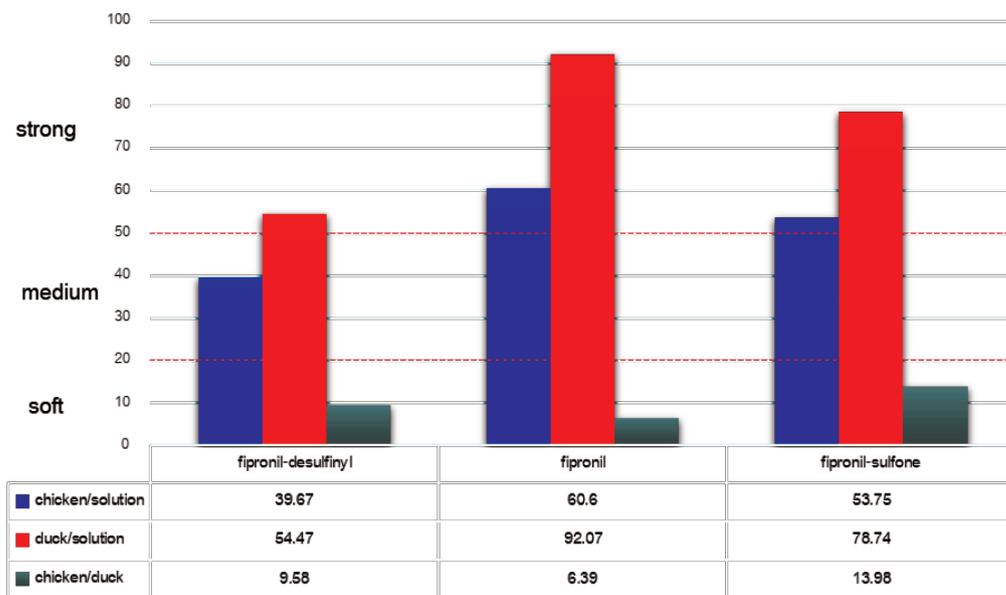
ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของสาร fipronil-desulfinyl (a), fipronil (b) และ fipronil-sulfone (c) ใน solution, matrix ไข่ไก่ และ matrix ไข่เป็ด

ตารางที่ 6 ผลกระทบของ matrix ของ fipronil-desulfinyl, fipronil และ fipronil-sulfone แบบ on solution, matrix ไข่ไก่ และ matrix ไข่เป็ด

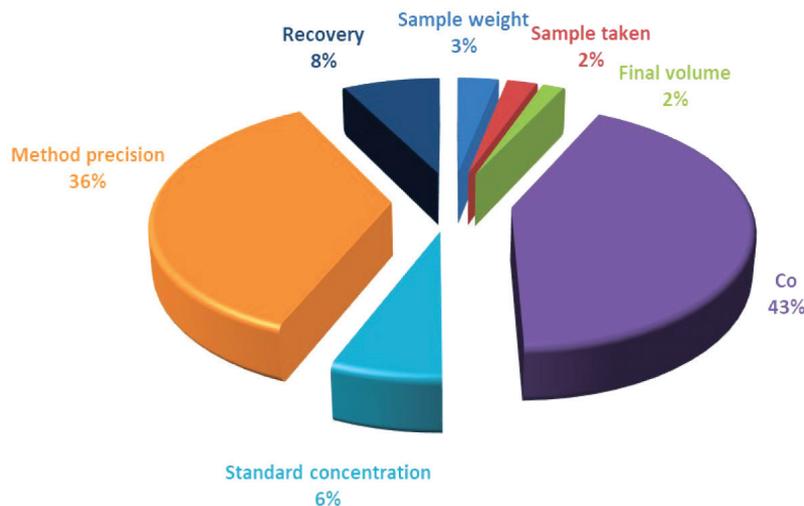
Compound	Matrix Effect (%)					
	chicken/solution		duck/solution		chicken/duck	
fipronil-desulfinyl	39.67	medium	54.47	strong	9.58	soft
fipronil	60.60	strong	92.07	strong	6.39	soft
fipronil-sulfone	53.75	strong	78.74	strong	13.98	soft

ไข่ไก่และไข่เป็ดต่อการวิเคราะห์ on solution เป็นแบบเพิ่มสัญญาณ (enhancement) และไข่ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ต่อกัน สามารถใช้ทดแทนกันได้และพบว่าผลกระทบของเมทริกซ์ไข่ไก่และไข่เป็ดมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ต่อการวิเคราะห์ on solution ดังแสดงในภาพที่ 7

ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach หรือ Bottom-up approach (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$) จากการประมาณค่าความไม่แน่นอน พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุด คือ calibration curve (Co) (43%) และ method precision (36%) ส่วน bias หรือ recovery (8%), standard concentration (6%) และ sample weight (3%) และองค์ประกอบอื่นๆ นั้นถือเป็นองค์ประกอบที่น้อยมาก ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 แผนภูมิแท่ง ME (%) ของ fipronil และเมตาโบไลต์



ภาพที่ 8 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารฟิโพรนิลในไข่ไก่ที่ระดับ 0.005 mg/kg (Co = calibration curve)

ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนนำไปใช้งาน ซึ่งต้องสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง พบว่าเมื่อนำวัสดุควบคุมคุณภาพในตัวกลาง matrix quality control material, QCM Product Code FCPM11-EGG2QC ที่ผลิตโดย FAPAS® ซึ่งทราบค่าที่แน่นอนของ fipronil-sulfone ใน chicken (hens) eggs เป็น 12.0 µg/kg ช่วงยอมรับอยู่ระหว่าง 6.7–17.3 µg/kg ผลการวิเคราะห์ fipronil-sulfone

เป็น 11.0 µg/kg ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้ จากนั้นทดสอบ IQC โดยการศึกษาการคืนกลับ ผลพบว่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70–120% ผลการสำรวจเบื้องต้น พบว่าเมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นและผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แล้ว ตรวจสอบไข่และผลิตภัณฑ์จำนวน 66 ตัวอย่าง ที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑลในปี พ.ศ. 2564 ผลไม่พบการตกค้างของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์สาร fipronil และเมตาโบไลต์ แบ่งตามประเภทของผลิตภัณฑ์

ประเภทตัวอย่าง	Analyte		
	Fipronil-desulfinyl	Fipronil	Fipronil-sulfone
ไข่สดชนิดแบ่งขาย ไม่มีบรรจุภัณฑ์ (n = 18)	Not detected	Not detected	Not detected
ไข่สดบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่ระบุแหล่งผลิต (n = 18)	Not detected	Not detected	Not detected
ผลิตภัณฑ์จากไข่ (n = 30)	Not detected	Not detected	Not detected

วิจารณ์

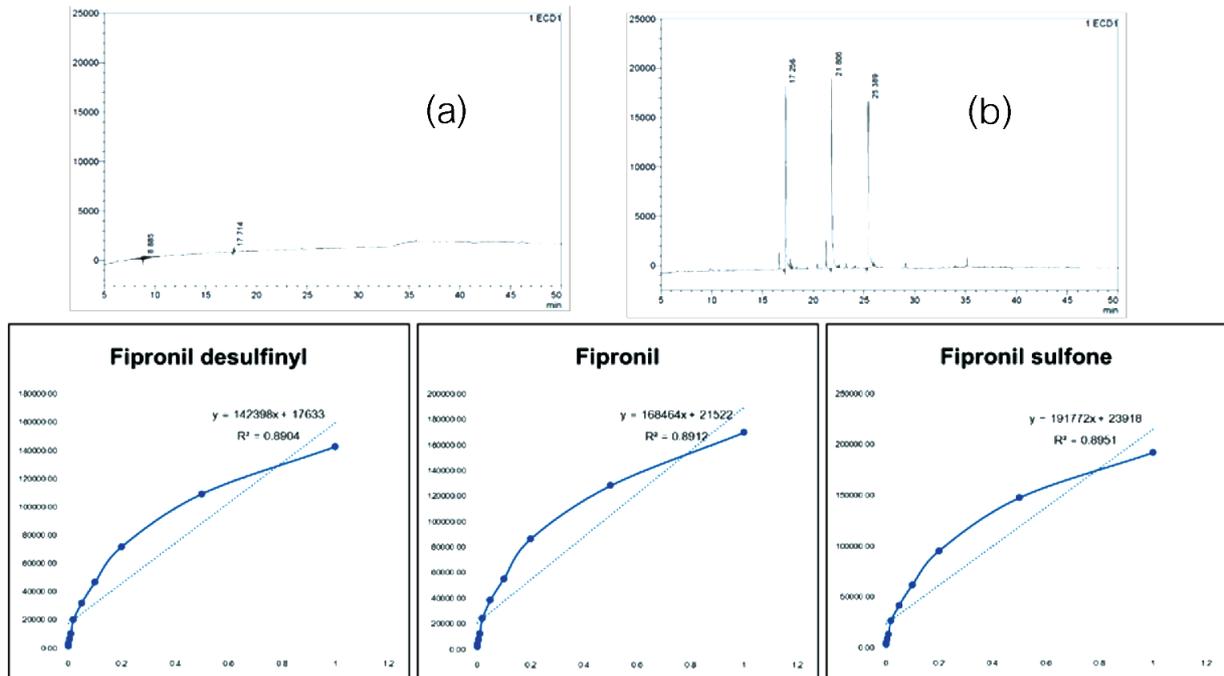
การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง การเตรียมตัวอย่างไข่ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ทำได้ง่ายกว่าการเตรียมตัวอย่างผักผลไม้ เนื่องจากตัวอย่างมีสถานะเป็นของเหลว การวิจัยนี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์สารฟิโพรนิลที่อาจตกค้างหรือเคลื่อนที่เปลือกไข่ แต่จะทำการตรวจวิเคราะห์เฉพาะส่วนที่บริโภคได้เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานการเตรียมตัวอย่าง⁽²¹⁾ สำหรับการสกัดใช้ acetonitrile ที่มีความเป็นขั้วระดับกลางสามารถละลายสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ได้ดี และมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนในตัวอย่างเสื่อมสภาพและจับตัวกันเป็นก้อนแยกออกจากส่วนอื่นๆ (protein precipitation) การสกัดควรใช้การเขย่าในแนวตั้งของ centrifuge tube และเขย่าด้วยมืออย่างแรง สามารถใช้เครื่องเขย่าแบบ mechanic แทนได้ โดยใส่แท่งเซรามิกเพื่อช่วยในการทำให้ก้อนโปรตีนแตกตัวได้ดีขึ้น หากเขย่าไม่แรงเพียงพอ ก้อนตัวอย่างจะติดที่หลอดพลาสติกทำให้ไม่สามารถสกัด

สารออกมาได้ หลังจากได้สารสกัดแล้ว ใช้ dispersive SPE ในการทำให้บริสุทธิ์⁽²²⁾ ซึ่งมีส่วนผสมสำคัญ คือ C18EC สารนี้มีคุณสมบัติดูดซับไขมันได้ดี จึงเป็นการกำจัดไขมันจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เนื่องจากสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์เป็นสารระเหยได้เมื่อถูกความร้อนและคงตัวที่อุณหภูมิสูง จึงสามารถใช้เครื่องมือชนิด gas chromatograph สำหรับแยกและวิเคราะห์สารได้ สารฟิโพรนิลเป็นสารที่มี electron สามารถตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิด electron capture detector (ECD) ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสำหรับวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มี electron ในกลุ่ม organochlorine (OC) ดังนั้นเบื้องต้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองฉีดสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD พบว่าเครื่องมือนี้มี selectivity และ sensitivity ที่ดี สามารถตรวจวัดได้ระดับต่ำมากที่สุดที่ 0.0002 mg/mL (0.2 ppb) และสามารถแยกสารสนใจออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขั้นตอนการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟ

มาตรฐาน พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ในช่วงแคบระหว่าง 0.0002–0.005 mg/mL เท่านั้น และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ECD detector จะอิ่มตัว (saturated) ทำให้กราฟมีลักษณะโค้งที่ความเข้มข้นสูง จึงไม่สามารถใช้งานในช่วงการวิเคราะห์ที่ยาวครอบคลุมค่ากำหนดได้ ดังแสดงในภาพที่ 9

ด้วยคุณสมบัติด้านความไว (sensitivity) ที่ดี จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแบบคัดกรอง (screening method) ที่ระดับต่ำมากได้และหากตรวจพบเบื้องต้นจึงทำการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค single point calibration หรือใช้เครื่อง GC-MS/MS ในลำดับต่อไป



ภาพที่ 9 Chromatogram ที่ได้จากเครื่อง ECD ของ method blank (a) fipronil และ metabolites (b) และกราฟมาตรฐาน

ในขั้นตอนการพัฒนาและการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้น ดำเนินการได้ตรงตามวัตถุประสงค์ กล่าวคือ parameters ต่าง ๆ ที่ทำการทดสอบมีคุณลักษณะและคุณสมบัติอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม pesticide analytical guideline ของสหภาพยุโรป SANTE/12682/2019 สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้ ทั้งนี้หากห้องปฏิบัติการมีประสบการณ์ด้านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS ในการวิเคราะห์ผักและผลไม้อยู่แล้ว สามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ได้โดยปรับเพียงขั้นตอนการเลือก dispersive SPE ที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนที่สำคัญและมีความท้าทายที่สุด คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือวิเคราะห์ และการตรวจวัดที่ระดับต่ำมาก 2–5 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb)

ทั้งนี้เครื่องมือที่เลือกใช้ คือ GC-MS/MS จะตอบสนอง detection limit ได้ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง จากการวิเคราะห์แบบ SRM โดยการเลือก mass transition จำเพาะของสารและเครื่องมือจะตรวจจับเฉพาะสารสนใจโดยไม่มี interferences อื่นปนเปื้อนในระบบ วิธีนี้ช่วยเพิ่ม sensitivity ให้สามารถตรวจที่ระดับต่ำมากได้ การใช้ mass ของ 2 products ion จากเครื่อง GC-MS/MS ชนิด triple quadrupole ให้ degree of selectivity ซึ่งใช้ในการประเมินความเชื่อมั่นในการระบุชนิดสารสูงตรงตามมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลโดยไม่ต้องมีการยืนยันเพิ่มเติม

อุปสรรคที่พบระหว่างการดำเนินงาน คือ ประสพปัญหาที่ไม่สามารถควบคุมได้ในช่วงการเก็บตัวอย่าง

ในเขตพื้นที่การระบาดของโรคติดต่ออุบัติใหม่ (COVID-19) อย่างรุนแรงในช่วงธันวาคม 2563 ถึง เมษายน 2564 ทำให้ภาครัฐต้องออกมาตรการห้ามเข้าถึงพื้นที่เป้าหมายของการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ กรุงเทพมหานครและปริมณฑล และเพื่อความปลอดภัยของคณะผู้วิจัยจึงต้องมีการปรับแผนในการเก็บตัวอย่างออกไป 1-2 เดือนเพื่อรอจนกว่าสถานการณ์จะคลี่คลายลง แต่เนื่องจากพื้นที่เป้าหมายเป็นพื้นที่ใกล้เคียงกับห้องปฏิบัติการในรัศมีไม่เกิน 100 กิโลเมตร หลังจากมีการผ่อนคลายมาตรการลง จึงจะเข้าเก็บตัวอย่างในพื้นที่เป้าหมายได้อย่างรวดเร็วและดำเนินการตามแผนที่วางไว้จนสำเร็จ ผลการสำรวจเบื้องต้นไม่พบการตกค้างของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในทุกตัวอย่าง ทำให้ทราบสถานการณ์เบื้องต้นของการตกค้างของสารฟิโพรนิลในอาหารในเขตพื้นที่เป้าหมาย ซึ่งบ่งชี้ว่า ณ บริเวณที่สำรวจตัวอย่างไม่มีการตกค้างของสารสนใจในระดับที่จะก่อให้เกิดอันตราย และสถานที่ผลิตไม่มีการใช้สารฟิโพรนิล ผิดวัตถุประสงค์ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สะท้อนความปลอดภัยของอาหารเฉพาะส่วนที่บริโภคได้เท่านั้น หากต้องการศึกษาเพิ่มเติมการใช้สารในการกำจัดไรในฟาร์มไก่หรือไม่ อาจมีการตรวจเพิ่มเติมการวิเคราะห์ในส่วนเปลือกไข่ได้ด้วย ข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถใช้สร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคไข่และผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค อาจมีการขยายผลเพื่อจัดทำโครงการสำรวจติดตามในวงกว้างครอบคลุมทั้งประเทศต่อไปได้

สำหรับการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นต้องทำการควบคุมคุณภาพ เช่น การวิเคราะห์ method blank/reagent blank, spiked sample และ duplicate sample ทุกชุดของการสกัด (batch) หรืออย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง และเนื่องจาก MS detector เป็นเครื่องมือตรวจวัดที่ sensitivity สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ตามระยะเวลาการใช้งาน จึงต้องมีการตรวจสอบ instrument drift ด้วยเสมอ โดย response ใน analytical batch เดียวกัน จะต้องแตกต่างกันไม่เกิน 30% และหากพบสารที่สงสัยว่าเป็นสารสนใจจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยทุกครั้งการยืนยันชนิดของสารที่ตรวจพบต้องยืนยันผลด้วย ion intensities ratio โดยค่า ion intensities

ratio ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัวในตัวอย่าง และ ion intensities ratio เฉลี่ยของสารมาตรฐานนั้น จะต้องแตกต่างกันไม่เกิน 30% หรือใช้วิธีทางเลือกอื่น (alternative method) เช่น GC-ECD หรือ LC-MS/MS เป็นต้น และยืนยันปริมาณที่ตรวจพบ โดยทำการทดสอบตัวอย่างใหม่ (retest) แบบ duplicate test รายงานโดยใช้ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ และเกณฑ์ยอมรับของ %RPD ต้องไม่เกิน 25% เป็นการยืนยันว่ากระบวนการวิเคราะห์ทั้งหมดมีความถูกต้องเหมาะสมและสอดคล้องกับเอกสารอ้างอิงและมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025:2017

จากปัญหาตั้งต้นที่สหภาพยุโรปพบไข่จำนวนมาก ถูกปนเปื้อนด้วยสารฟิโพรนิล ซึ่งเป็นสารเคมีที่ห้ามใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ทำให้ต้องสั่งปิดฟาร์มเลี้ยงไก่จำนวนมากเพื่อดำเนินการตรวจสอบ และต้องระงับการขายและเรียกคืนไข่เพื่อนำไปทำลายทิ้ง เรื่องดังกล่าวบ่งชี้ว่าแม้กลุ่มประเทศพัฒนาแล้วและมีความเข้มขันของการตรวจสอบสินค้าอาหารจากต่างประเทศที่จะนำเข้ามาจำหน่ายภายในประเทศสมาชิก แต่กลับมีมาตรการที่หละหลวมต่อการตรวจสอบภาคการผลิตภายในสหภาพยุโรปเอง ในส่วนของประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศผู้ผลิตอาหารรายใหญ่ของโลกและมีการส่งออกสินค้าเกษตรเป็นมูลค่ามหาศาล จำเป็นต้องมีหน่วยงานที่ดูแลด้านความปลอดภัยของอาหาร ดำเนินการตรวจสอบสินค้าที่มีวางจำหน่ายอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องอย่างเป็นระบบ ภาครัฐต้องให้การสนับสนุนทรัพยากรที่เพียงพอต่อการสำรวจติดตาม ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อประชาชนต่อการดำรงไว้ซึ่งสุขภาพที่ดี ลดค่าใช้จ่ายทางการแพทย์และการสาธารณสุข ในส่วนของภาคการผลิตนอกจากจะต้องมีการให้ความรู้ด้านการใช้สารเคมีอย่างถูกต้องในภาคเกษตรกรรมแล้ว ยังต้องมีการกำกับดูแลอย่างเข้มงวดจากหน่วยงานต้นน้ำในขั้นตอนการผลิต ตรวจสอบความปลอดภัยสินค้าหน้าฟาร์ม ก่อนวางจำหน่าย ผลการสำรวจเบื้องต้นของโครงการแสดงให้เห็นว่าไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลยังคงมีความปลอดภัย และเพื่อเป็นการรักษาระดับคุณภาพสินค้าที่จำหน่ายใน

ห้องตลาด จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์สารตกค้างทั้งจากฟาร์มผู้ผลิตก่อนนำออกจำหน่าย ผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพสินค้าของตนได้ และหน่วยงานกำกับดูแลด้านกฎหมายต้องมีแผนการเก็บตัวอย่างอย่างสม่ำเสมอและต้องได้รับการสนับสนุนทรัพยากรจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่องด้วย

สรุป

วิธีทดสอบที่ได้จากการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์มีคุณสมบัติเหมาะสม สอดคล้องกับมาตรฐานและกฎหมายของประเทศไทย ได้แก่ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง และมาตรฐานระดับนานาชาติตามโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius) สามารถใช้เป็นวิธีการทดสอบที่ให้บริการของหน่วยงาน และเพื่อใช้ในการสำรวจติดตามเพื่อประเมินสถานการณ์การตกค้างของสารพิษได้ ผลการสำรวจสินค้าไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ไม่พบสาร fipronil และเมตาโบไลต์ตกค้างในทุกตัวอย่าง สามารถสร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคได้ระดับหนึ่ง รวมถึงการเฝ้าระวังความปลอดภัยจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคและประเทศคู่ค้า

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภายใต้โครงการพัฒนาขีดความสามารถและเครือข่ายห้องปฏิบัติการด้านอาหารเพื่อความมั่นคงด้านสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Lecoq M, Balança G. Field trials of fipronil for control of *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) hopper bands in Brazil. *Crop Protect* 1998; 17(2): 105-10.

2. Kaur R, Mandal K, Kumar R, Singh B. Analytical method for determination of fipronil and its metabolites in vegetables using the QuEChERS method and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 2015; 98(2): 464-71.
3. Jackson D, Cornell CB, Luukinen B, Buhl K, Stone D. Fipronil technical fact sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. [online]. 2009; [cited 2021 Oct 2]; [13 screens]. Available from: URL: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/fiptech.html>.
4. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. [online]. 2004; [cited 2021 Oct 2]; [60 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf.
5. Li X, Ma W, Li H, Zhang Q, Ma Z. Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: a review. *Trends Food Sci Tech* 2020; 97(1): 185-95.
6. Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS. Environmental fate and toxicology of fipronil. *J Pestic Sci* 2007; 32(3): 189-99.
7. Brennan AA, Harwood AD, You J, Landrum PF, Lydy MJ. Degradation of fipronil in anaerobic sediments and the effect on porewater concentrations. *Chemosphere* 2009; 77(1): 22-8.
8. Qu H, Ma RX, Liu DH, Jing X, Wang F, Zhou ZQ, et al. The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana*. *J Hazard Mater* 2016; 312: 169-74.
9. Charalampous AC, Liapis KS, Bempelou ED. Fipronil in eggs. Is LC-MS/MS the only option? A comparison study of LC-MS/MS and GC-ECD for the analysis of fipronil. *J Chromatogr B* 2019; 1129(2019): 121785. (6 pages).

10. Shen W, Liu H, Zhang R, Yu K, Cai L, Liu Y, et al. Determination of fipronil and its metabolites in eggs and egg products with gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Chin J Chrom* 2017; 35(12): 1224-8.
11. Wittayanan W, Srikote R, Chaimongkol T. Determination of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl as POPs residues in freshwater animals in Thailand during 2017-2018. *Science & Technology Asia* 2019; 24(3): 27-38.
12. Wittayanan W, Chaimongkol T. Determination of pesticides residue in cannabis, cannabis extract and cannabis oil by gas chromatography tandem mass spectrometry technique. *Pharm Sci Asia* 2021; 48(4): 354-66.
13. Anagnostopoulos C, Ampadogiannis G, Bempelou E, Liapis K, Kastellanou E. The 2017 fipronil egg contamination incident: the case of Greece. *J Food Saf* 2019; 40(1): e12727. (10 pages).
14. Reich H, Triacchini GA. Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat. *EFSA J* 2018; 16(5): e05164. (30 pages).
15. Commission Regulation (EU) No 1127/2014 of 20 October 2014 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 amitrole, dinocap, fipronil, flufenacet, pendimethalin, propyzamide, and pyridate in or on certain products. *OJ L* 305, 24.10.2014, pp. 47-99.
16. Codex Alimentarius International Food Standard. Codex pesticides residues in food online database. [online]. 2021; [cited 2021 Oct 2]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en>.
17. Ministry of Public Health Notification. No. 387 B.E. 2560. RE: Food containing pesticide residues (Pesticide residues in food). *Government Gazette* 2017; 138(228ng): 8-33.
18. Department of Medical Science. Regulations of the Department of Medical Sciences on analysis and service rate. *Government Gazette* 2020; 137(98ng): 1-18.
19. Eurachem. EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 3rd ed [online]. 2012; [cited 2021 Oct 2]; Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.
20. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2011; 1218(42): 7634-9.
21. Thai Agricultural Standard. Methods of sampling for the determination of pesticide residues TAS 9025-2008. Chatuchak, Bangkok: National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Ministry of Agriculture and Cooperatives; 2008.
22. Gonzalez-Curbelo MA, Socas-Rodriguez B, Herrera-Herrera AV, Gonzalez-Salamo J, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends Anal Chem* 2015; 71: 169-85.

Method Development and Validation for the Determination of Fipronil and Its Metabolite Residues in Eggs and Products

Weerawut Wittayanan and Thoranit Chaimongkol

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Fipronil is an insecticide whose degradation products are highly neurotoxic for humans. In Thailand, fipronil is approved to use for plant protection but not as a veterinary drug. It was found that, egg contamination by fipronil in Europe in 2017 has generated concerns in Thai consumers. Thus, an analytical method is required for the investigation of the fipronil residues in commercialized egg and egg products in Thailand. Fipronil was extracted by a developed procedure based on EN 15662:2018 QuEChERS, detected by selected reaction monitoring techniques in GC-MS/MS and quantified by matrix-matched calibration curve. The validation of the method to detect fipronil and two metabolites, fipronil-desulfinyl, and fipronil-sulfone, in chicken and duck eggs showed that the LOD and the LOQ were 0.002 and 0.005 mg/kg, respectively. Satisfactory recoveries were obtained in the range of 92.9–111.6% in spiked samples at 0.005, 0.05 and 0.1 mg/kg with RSD lower than 8.6%. The relative standard uncertainty value was less than 20% and the method working ranges were between 0.005–0.5 mg/kg which were acceptable. This method was sensitive, precise, reliable, and suitable for use in the laboratory. The validated method was further applied for the analysis of 66 egg and egg product samples collected from Bangkok Metropolitan Region in 2021. The result showed no detectable fipronil residues in any samples. Overall results indicated that the described method would be applied for detecting the fipronil and its metabolite residues in the future.

Keywords: Fipronil, Eggs, GC-MS/MS, Method development and validation