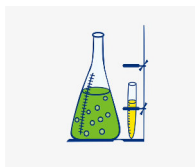




วิธีวิเคราะห์และมาตรฐาน สำหรับควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี

สุภาน้อย ทรัพย์สินเสริม
กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง
กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



เอกสารวิชาการฉบับที่ 6 /2563

คำนำ

กรมประมงเป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทุกห่วงโซ่การผลิต ตั้งแต่ระดับฟาร์มเลี้ยงจนกระทั่งถึงการแปรรูปในระดับอุตสาหกรรม และมีหน้าที่กำกับดูแล และดำเนินการตรวจสอบสารตกค้าง สารปนเปื้อน สารชีวพิษ และเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในวัตถุดิบสัตว์น้ำเพื่อการตรวจติดตามและควบคุมภายใต้แผนการดำเนินงานของกรมประมง ดังนั้นห้องปฏิบัติการทดสอบของกรมประมงจึงต้องมีการพัฒนาศักยภาพการตรวจวิเคราะห์ให้สอดคล้องตามหลักมาตรฐานสากล เพื่อการยอมรับในผลการตรวจสอบ เพื่อป้องกันและควบคุมมิให้เกษตรกรมีการใช้สารตกค้างหรือสารเร่งการเจริญเติบโตต่าง ๆ ที่ผิดกฎหมายและเกิดการตกค้างในอนาคต

กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของกรมประมง มีหน้าที่ในการวิเคราะห์ วิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ด้านคุณภาพและความปลอดภัยของสินค้าประมงและได้นำระบบมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 มาใช้ในการดำเนินการทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มีคุณภาพมาตรฐาน มีความถูกต้องแม่นยำ สร้างความเชื่อมั่นในระบบควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล นอกจากนี้ยังมีส่วนในการขจัดปัญหาทางวิชาการในการกีดกันทางการค้าก่อให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพ ความปลอดภัย และมาตรฐานของสินค้าสัตว์น้ำนั้นๆ ตามมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถนำผลการวิเคราะห์ไปประกอบการแก้ไขข้อบกพร่องในการผลิตได้ทันที่

กองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำอย่างต่อเนื่อง และได้เผยแพร่อบรมให้ความรู้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและภาคเอกชน ในการนี้ เพื่อเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้ให้แก่ห้องปฏิบัติการอื่นๆ รวมทั้งห้องปฏิบัติการในสังกัดกรมประมง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมกำกับดูแลคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำให้ได้มาตรฐานสากลและสอดคล้องตามมาตรฐานของประเทศคู่ค้าต่างๆ จึงได้รวบรวมวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในปัจจุบัน ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์หลักที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพ จำนวน 16 รายการวิเคราะห์ รวมทั้ง ได้รวบรวมและจัดทำสรุปมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า คู่มือฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการและผู้เกี่ยวข้อง ในการศึกษาและสามารถส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการ และผู้ที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปใช้ประโยชน์หรือประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สุภาน้อย ทรัพย์สินเสริม

ผู้จัดทำ

เมษายน 2563

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทที่ 1: ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ	1
บทที่ 2: การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี	5
บทที่ 3: วิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี	20
: วิธีวิเคราะห์ Oxolinic acid โดยเทคนิค HPLC	20
: วิธีวิเคราะห์ Tetracycline group (Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline) โดยเทคนิค HPLC	26
: วิธีวิเคราะห์ Fluoroquinolones group โดยเทคนิค LC-MS/MS	34
: วิธีวิเคราะห์ Sulfonamides group โดยเทคนิค LC-MS/MS	41
: วิธีวิเคราะห์ Nitrofurans group โดยเทคนิค LC-MS/MS	51
: วิธีวิเคราะห์ Chloramphenicol โดยเทคนิค ELISA	63
: วิธีวิเคราะห์ Malachite green, Leuco-malachite green, Crystal violet, Leuco-crystal violet โดยเทคนิค LC-MS/MS	68
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (Total Mercury) โดยเครื่อง Mercury analyzer	77
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAs) ระบบ Graphite furnace	82
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAs) ระบบ Graphite furnace	88
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Benzoic acid & Sorbic acid โดยเทคนิค HPLC	93
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต โดยเทคนิค Spectrophotometer	99
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณ EDTA โดยเทคนิค HPLC	103
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Sulfur dioxide (SO ₂) โดยเทคนิค Titration	107
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) โดยเทคนิค HPLC	113
: วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Histamine โดยเทคนิค Fluorometric method	118
บทที่ 4: มาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ	124
เอกสารอ้างอิง	128

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
บทที่ 3	
1.1 การเตรียม Working Standard oxolinic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	23
1.2 การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ Oxolinic acid	24
2.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Tetracycline group	32
3.1 Mixed Matrix Standard Calibration Curve ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.30, 0.60 และ 1.00 µg/g	37
3.2 ระบบ Gradient Mode	38
3.3 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Fluoroquinolone group	39
4.1 การเตรียม Matrix mixed standard calibration curve ที่ความเข้มข้นต่างๆ	47
4.2 แสดงระบบ Gradient mode ของเครื่อง LC	48
4.3 แสดง Mass range (m/z)	50
5.1 การเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ และ Internal standard	59
5.2 แสดงระบบ Gradient mode	60
5.3 แสดง Mass range (m/z)	60
5.4 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Nitrofurantoin group	61
6.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบคลอแรมเฟนิคอล	67
7.1 Mixed Standard Malachite green/Crystal violet และ Leuco-malachite green/Leucocrystal violet ที่ความเข้มข้นต่างๆ	74
7.2 ระบบ Gradient Mode	74
8.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Mercury ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตรด้วย 3% Hydrochloric acid	79
8.2 การควบคุมคุณภาพของการทดสอบปรอท	80
9.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน cadmium 8 µg/L	83
9.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Cadmium ความเข้มข้นต่างๆ	84
9.3 ขั้นตอนการฉีดสารละลายสำหรับวัดด้วยเครื่อง AAS	85
9.4 แสดง Condition ของเครื่อง AAS	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
บทที่ 3	
9.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบแคดเมียม	86
10.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Lead 50 µg/L	89
10.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Lead ความเข้มข้นต่างๆ	90
10.3 ขั้นตอนการฉีดสารละลายสำหรับวัดด้วยเครื่อง AAS	90
10.4 แสดง Condition ของเครื่อง AAS	91
10.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบตะกั่ว	91
11.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Benzoic acid & Sorbic acid	97
12.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบฟอสเฟต	102
13.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ EDTA	106
14.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Sulfur dioxide	111
15.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ ASP	116
16.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Histamine ความเข้มข้นต่างๆ	122
16.2 การควบคุมคุณภาพการทดสอบฮิสตามีน	122
บทที่ 4	
1 สรุปรเปรียบเทียบมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำตามข้อกำหนดของประเทศ คู่ค้าที่สำคัญ	125

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ชุดกลั่นตามวิธี Rankine	110

บทที่ 1

ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ

มาตรฐาน ISO/IEC 17025

ISO/IEC ย่อมาจาก The International Organization for Standardization; ISO และ The International Electrotechnical Commission; IEC

ISO/IEC 17025 คือข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ (General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories) เป็นมาตรฐานสากลที่กำหนดเพื่อเสริมสร้างความเชื่อมั่นในความสามารถของการทดสอบและสอบเทียบของห้องปฏิบัติการ ไม่ได้ถูกกำหนดเป็นมาตรฐานบังคับ หากห้องปฏิบัติการสามารถปฏิบัติตามมาตรฐานที่กำหนดนี้ได้ จะสร้างความน่าเชื่อถือในผลการทดสอบในระดับสากล

ISO/IEC 17025 เริ่มใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1999 โดยขณะนั้น ISO/IEC 17025: 1999 มีการดำเนินการด้านระบบบริหารงานคุณภาพสอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 9000: 1994 ซึ่งเป็นมาตรฐานข้อกำหนดระบบบริหารงานคุณภาพ และในปี ค.ศ. 2005 ได้ปรับรายละเอียดให้สอดคล้องตาม ISO 9001 : 2000 และได้ประกาศใช้ ISO/IEC 17025: 2005 ซึ่งใช้เป็นข้อกำหนดสำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบจนถึง พ.ศ.2560 และได้ดำเนินการปรับเป็นฉบับ ISO/IEC 17025: 2017 และมีการใช้งานจนถึงปัจจุบัน ซึ่งสาระสำคัญที่ปรับเปลี่ยนในส่วนโครงสร้างของมาตรฐาน กำหนดแนวคิดในการพิจารณาบนพื้นฐานของความเสี่ยงและบริหารจัดการความเสี่ยงของห้องปฏิบัติการ เพื่อก่อให้เกิดการพัฒนากระบวนการบริหารงานด้านคุณภาพและวิชาการที่ยั่งยืนและสอดคล้องตามมาตรฐานสากล ทั้งนี้ สาระสำคัญของข้อกำหนดที่มีการปรับเปลี่ยนตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ประกอบด้วย

ข้อ 4 ข้อกำหนดทั่วไป ประกอบด้วย การจัดการความเป็นกลาง และการรักษาความลับ

ห้องปฏิบัติการจะมีการดำเนินการอย่างเป็นกลาง บุคลากรต้องทำงานอย่างอิสระปราศจากความกดดันทางการเงิน และความกดดันจากระบบบริหารงานภายใน และอิทธิพลต่างๆ ที่อาจมีผลต่อคุณภาพ กำหนดให้มีการชี้แจงความเสี่ยงที่มีผลต่อความเป็นกลาง ซึ่งครอบคลุมความเสี่ยงจากกิจกรรมของห้องปฏิบัติการ ความสัมพันธ์ระหว่างห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและความสัมพันธ์ระหว่างบุคลากร หากมีความเสี่ยงด้านการเป็นกลาง ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการจัดการหรือกำหนดมาตรการเพื่อขจัดหรือลดความเสี่ยงดังกล่าว นอกจากนี้ ห้องปฏิบัติการจะต้องรักษาความลับของลูกค้าอย่างเคร่งครัด ห้องปฏิบัติการจะไม่เปิดเผยข้อมูลรวมถึงแหล่งที่ให้ข้อมูลดังกล่าวให้ลูกค้าอื่นทราบ ยกเว้นได้รับการยินยอม

ข้อ 5 ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง ประกอบด้วย สถานะทางกฎหมายของห้องปฏิบัติการและการให้บริการตามขอบข่ายที่ได้รับการรับรอง โครงสร้างการบริหารและความรับผิดชอบ การดำเนินงานที่สอดคล้องกับความต้องการของลูกค้าตามกฎหมาย

ห้องปฏิบัติการจะต้องเป็นนิติบุคคลที่สามารถรับผิดชอบต่อกิจกรรมของห้องปฏิบัติการตามกฎหมายได้ ผู้บริหารจะต้องรักษาระบบและการบริหารงานอย่างมืออาชีพ มีการกำหนดความสัมพันธ์ อำนาจหน้าที่ของบุคลากรที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้มั่นใจในการปฏิบัติงานและการสื่อสารอย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อ 6 ข้อกำหนดด้านทรัพยากร ประกอบด้วย การจัดเตรียมทรัพยากรที่จำเป็นในการดำเนินงาน การจัดการทรัพยากรบุคคล สิ่งอำนวยความสะดวกและเงื่อนไขด้านสิ่งแวดล้อม อุปกรณ์ ความปลอดภัยของการวัด การจัดเตรียม/จัดหาสินค้าและบริการภายนอกที่จำเป็นต่อกิจกรรมของห้องปฏิบัติการ

มุ่งเน้นเกี่ยวกับทรัพยากรบุคคลและสิ่งอำนวยความสะดวกและภาวะแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อ การปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการ โดยมีการกำหนดหน้าที่ความรับผิดชอบ และการอบรมเพิ่มพูนความรู้และประสบการณ์อย่างต่อเนื่องให้เกิดการพัฒนาของบุคลากร ตลอดจนจะต้องมีการทวนสอบและทบทวนงานที่รับผิดชอบเพื่อให้มีความถูกต้องทุกส่วนตั้งแต่การวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีและการรายงานผลการทดสอบ นอกจากนี้ ต้องจัดให้มีสิ่งอำนวยความสะดวกและภาวะแวดล้อมที่เอื้ออำนวยให้การทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำ ต้องป้องกันสิ่งรบกวนและผลกระทบด้านลบต่อกิจกรรมของห้องปฏิบัติการ รวมทั้งการจัดทำแผนจัดหาสินค้า/บริการ สอบเทียบหรือทวนสอบอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อกิจกรรมของห้องปฏิบัติการ และ การใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง และการร่วมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการตามแผนที่กำหนด

ข้อ 7 ข้อกำหนดด้านกระบวนการ ประกอบด้วย การทบทวนข้อกำหนด การประมาณราคาและสัญญา การทวนสอบ และการสอบเทียบของวิธีการที่เหมาะสม การสุ่มตัวอย่าง การจัดการรายการทดสอบหรือสอบเทียบ การบันทึกผลทางเทคนิค การประเมินความไม่แน่นอนของการวัด ความเชื่อมั่นของผลการสอบเทียบ (Validation) การรายงานผล การจัดการข้อร้องเรียน การจัดการข้อบกพร่อง การควบคุมการจัดการข้อมูลและสารสนเทศ

ห้องปฏิบัติการจะต้องดำเนินการการทบทวนข้อตกลง เพื่อให้เกิดความเข้าใจที่ตรงกันระหว่างห้องปฏิบัติการและลูกค้า มีการเลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสมและหากมีความประสงค์จากลูกค้าให้พิจารณาผลการทดสอบ ห้องปฏิบัติการจะต้องแจ้งเกณฑ์การตัดสินและพิจารณาให้ลูกค้าทราบและต้องได้รับความยินยอมทั้ง 2 ฝ่าย ทั้งนี้หากมีการเบี่ยงเบนจากสัญญาที่ตกลงไว้จะต้องมีการทบทวนข้อตกลงร่วมกัน

ข้อ 8 ข้อกำหนดด้านระบบการจัดการ ประกอบด้วย การจัดทำระบบการจัดการ ซึ่งสามารถเลือกได้ 2 ทางเลือก

ทางเลือกที่ 1 การจัดทำระบบเอกสารตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 โดยมีรายละเอียดประกอบด้วย เอกสารระบบการจัดการ การควบคุมเอกสาร การควบคุมบันทึก การระบุความเสี่ยงและโอกาสที่มีผลต่อกิจกรรมของห้องปฏิบัติการ การปรับปรุง การแก้ไข การตรวจประเมินภายใน การทบทวนของฝ่ายบริหาร

ทางเลือกที่ 2 การจัดทำระบบเอกสารตามข้อกำหนด ISO 9001 ซึ่งต้องสอดคล้องตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 ในข้อ 4-7 และ 8.2-8.9

แนวทางดำเนินการเพื่อมุ่งสู่ห้องปฏิบัติการมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017

1. ผู้บริหารหน่วยงานต้องมีความมุ่งมั่นในการดำเนินการพัฒนาห้องปฏิบัติการสู่มาตรฐานสากล รวมทั้งจัดสรรงบประมาณ และทรัพยากรที่เพียงพอและเหมาะสม เพื่อส่งเสริมและสนับสนุนการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง
2. ห้องปฏิบัติการที่ได้รับมอบหมายต้องมีความมุ่งมั่นในการปฏิบัติงานอย่างมีอาชีพตามหลักวิชาการที่ถูกต้อง เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในระบบตรวจสอบ
3. แต่งตั้งบุคลากรในระบบบริหารงานห้องปฏิบัติการในส่วนต่างๆ เพื่อให้การดำเนินงานอย่างเป็นระบบ เช่น แต่งตั้งผู้จัดการ/ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการที่มีหน้าที่จัดการด้านระบบคุณภาพ เจ้าหน้าที่วิเคราะห์ เจ้าหน้าที่ควบคุมและจัดทำเอกสารในระบบคุณภาพ เจ้าหน้าที่จัดซื้อ/จัดจ้าง เป็นต้น และดำเนินการกำหนดหน้าที่ความรับผิดชอบในแต่ละตำแหน่ง ทั้งนี้ การกำหนดบุคลากรที่เหมาะสมกับตำแหน่งที่รับผิดชอบ จะเป็นการเสริมความเข้มแข็งให้ระบบบริหารงานในห้องปฏิบัติการให้เกิดความต่อเนื่องและมีความน่าเชื่อถือ
4. บุคลากรผู้ปฏิบัติงานทุกส่วนในระบบห้องปฏิบัติการ จะต้องมีการอบรมในหลักสูตรที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างเสริมประสบการณ์ ความรู้ ความชำนาญ โดยหน่วยงานจะต้องสนับสนุนงบประมาณในการพัฒนาบุคลากรอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างมีอาชีพ และสามารถถ่ายทอดการปฏิบัติงานสู่บุคลากรอื่นๆ ภายในหน่วยงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ
5. เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี วัสดุอ้างอิงที่จำเป็นถือว่ามีสำคัญต่อการพัฒนาห้องปฏิบัติการสู่มาตรฐานสากล โดยหน่วยงานต้องให้การสนับสนุนแก่ห้องปฏิบัติการทั้งด้านการจัดหาและการสนับสนุนงบประมาณในการบำรุงรักษาเครื่องมือให้พร้อมใช้ตลอดช่วงการทดสอบ ทั้งนี้ ห้องปฏิบัติการจะต้องจัดทำแผนการสอบเทียบ/ทวนสอบ/ ตรวจสอบระหว่างใช้งานเครื่องมือเป็นประจำ เพื่อให้เครื่องมือมีความถูกต้องแม่นยำ

6. การจัดทำ ปรับปรุงเอกสารในระบบคุณภาพ ได้แก่คู่มือคุณภาพ ขั้นตอนการดำเนินงาน วิธีปฏิบัติงาน วิธีทดสอบ และเอกสารสนับสนุนต่างๆ ให้มีความทันสมัย พร้อมใช้งาน โดยจะต้องมีการทบทวนเอกสารในระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง

7. การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control) อย่างถูกต้องเหมาะสมและต่อเนื่องประจำปี เพื่อทบทวนการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการให้มีความถูกต้องและสอดคล้องตามข้อกำหนด รวมทั้งเพื่อทวนสอบการปฏิบัติงานของบุคลากรในห้องปฏิบัติการ

8. การประชุมทบทวนการบริหารงาน (Management Review) เป็นการประชุมประจำปีอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง เพื่อทบทวนระบบบริหารและเทคนิควิชาการ รวมทั้งแผนและผลการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการที่ผ่านมา เพื่อปรับปรุงและลดความเสี่ยงในทุกส่วนที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบที่สำคัญของกองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง คือการควบคุม ตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำให้เป็นไปตามกฎหมายและมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมาตรฐานของประเทศคู่ค้าหลักที่สำคัญของประเทศไทย ตลอดจนการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล ทั้งนี้ คุณภาพและความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์รวมทั้งการยอมรับในระบบควบคุมตรวจสอบของหน่วยงานจากภายในและภายนอกประเทศ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารเป็นลำดับต้นๆ ของโลก การที่มีระบบมาตรฐานห้องปฏิบัติการด้านการตรวจวิเคราะห์ที่ดี ทันสมัย มีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงเป็นส่วนที่ช่วยผลักดันให้เกิดการยอมรับในระบบควบคุมความปลอดภัยอาหารของหน่วยงานที่มีหน้าที่กำกับดูแล อนึ่ง การเลือกใช้วิธีมาตรฐานและวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับห้องปฏิบัติการ

วิธีวิเคราะห์ที่กำหนดโดยประเทศนำเข้าต่างๆ มีความแตกต่างกัน รวมทั้งมาตรฐานที่บังคับใช้ก็แตกต่างกัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคุ้มครองความปลอดภัยอาหารแก่ผู้บริโภคภายในประเทศ ดังนั้น การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์จึงถือได้ว่ามีความสำคัญ โดยต้องเลือกวิธีมาตรฐานที่สากลยอมรับ หรือเป็นวิธีที่ได้รับการรับรองระดับนานาชาติ ทั้งนี้ ในปัจจุบันเทคนิคการตรวจวิเคราะห์อาหารมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วมีการใช้เครื่องมือที่ทันสมัยในการตรวจวิเคราะห์ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ เพิ่มมากขึ้น และความท้าทายในการวิเคราะห์สารใหม่ๆ ที่เติมในอาหารด้วยวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน หรือเป็นสารที่ปนเปื้อนหรือตกค้างในอาหารจากวิธีการต่างๆ จึงเป็นสิ่งที่ต้องมีการพิจารณาอย่างถี่ถ้วนในการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์เพื่อควบคุมตรวจสอบให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการนำผลวิเคราะห์ไปใช้อย่างแท้จริง

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ มีจุดมุ่งหมายเพื่อควบคุมตรวจสอบคุณภาพให้มีความปลอดภัย ไม่พบการตกค้างหรือปนเปื้อนของสารเคมี ยาปฏิชีวนะ จนทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค รวมทั้งเป็นการเฝ้าระวังคุณภาพและความปลอดภัยตลอดห่วงโซ่อาหาร ในบทนี้ จะกล่าวถึงความสำคัญของการตรวจวิเคราะห์สารแต่ละชนิด เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานได้ทราบถึงเหตุผลความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งรับทราบข้อมูลเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์ที่สำคัญ

ประเภทของวิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมี

ตามหลักการ Principles for the establishment of Codex methods of analysis สามารถแยกประเภทของวิธีวิเคราะห์เป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. Defining methods (Type I) หรือที่ทั่วไปนิยมเรียกว่า Empirical method คือวิธีวิเคราะห์ซึ่งใช้ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เท่านั้น และใช้ในการกำหนดค่ามาตรฐานของอาหาร ผลของการวิเคราะห์วิธีนี้สอบกลับได้ไปที่วิธีวิเคราะห์ (traceable to the method) ดังนั้น ผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีอื่นจึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์วิธีนี้ได้

2. Reference methods (Type II) คือวิธีวิเคราะห์ซึ่งกำหนดให้เป็นวิธีอ้างอิงเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 แต่เป็น Non-empirical method โดยวิธีอ้างอิงนี้จะใช้ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งเรื่องผลการวิเคราะห์ และใช้สำหรับการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการอาจใช้วิธีนี้ตามวัตถุประสงค์อื่นได้ และผลการวิเคราะห์ ด้วยวิธีนี้สามารถสอบกลับได้ไปที่วัสดุอ้างอิงรับรอง (traceable to the CRM)

3. Alternative methods (Type III) คือวิธีวิเคราะห์ซึ่งมีคุณลักษณะตามเกณฑ์ที่กำหนด เป็น Non-empirical method สามารถใช้วิธีนี้ในการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย ผลของการวิเคราะห์ ด้วยวิธีนี้สอบกลับได้ไปที่วัสดุอ้างอิงรับรอง (traceable to the CRM)

4. Tentative Methods (Type IV) เป็นวิธีวิเคราะห์ซึ่งมีการใช้ต่อๆ กันมา หรือเป็นวิธีใหม่ซึ่งยังไม่มีกำหนดเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งวิธี Type IV อาจเป็น Empirical method หรือ Non-empirical method ก็ได้

เกณฑ์การพิจารณาคัดเลือกวิธีวิเคราะห์ (Criteria for the Selection of Methods of Analysis)

การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี อันดับแรกจะเลือกวิธีมาตรฐานกำหนดโดยองค์กรระหว่างประเทศที่ยอมรับ เช่น AOAC, ISO เป็นต้น หากไม่มีวิธีมาตรฐานดังกล่าว จะพิจารณาเลือกวิธีจากแหล่งอื่น ซึ่งเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ มีความแม่นยำ ความเที่ยงตรง ขอบข่ายและช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ครอบคลุมตามวัตถุประสงค์การใช้ รวมทั้งแสดงค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) ที่สอดคล้องตามความต้องการและมาตรฐานที่กำหนด

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี ที่ดำเนินการโดยกองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมง แบ่งออกเป็น 5 ด้าน ได้แก่

1. ด้านยาปฏิชีวนะและสารตกค้าง ทั้งในกลุ่มที่อนุญาตและไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
2. ด้านสารปนเปื้อน
3. ด้านวัตถุเจือปนอาหาร
4. ด้านสารชีวพิษ
5. ด้านคุณภาพผลิตภัณฑ์

วิธีวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี

วิธีวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมีนี้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกองตรวจสอบคุณภาพสินค้าประมงใช้ในการปฏิบัติงาน ซึ่งมีการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ก่อนที่จะนำมาปฏิบัติใช้งานประจำ โดยวิธีทดสอบสินค้าประมงมีหลากหลาย และหลายรายการวิเคราะห์ไม่ได้เป็นวิธีมาตรฐานจึงต้องเลือกวิธีจากแหล่งอื่น ซึ่งเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ มีความแม่นยำ ความเที่ยงตรง ขอบข่าย และช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ครอบคลุมตามวัตถุประสงค์การใช้ รวมทั้งแสดงค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) ที่สอดคล้องตามมาตรฐานที่กำหนด ตามหลักเกณฑ์การพิจารณาคัดเลือกวิธีดังกล่าวข้างต้น

1. วิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะและสารตกค้าง

ยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลากหลายประเภท ซึ่งมีการแบ่งประเภทยา เป็น 2 ประเภทหลัก คือ ยาที่ไม่อนุญาตให้ใช้ ถือได้ว่าเป็นยาที่ห้ามมีการตรวจพบสารตกค้าง (Zero tolerance) และยาที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยง แต่ต้องมีสารตกค้างไม่เกินปริมาณสูงสุดที่กำหนด (Maximum Residues Limit; MRL) และมีระยะหยุดยา (Withdrawal period) แต่ละประเทศมีการกำหนดมาตรฐานในการวิเคราะห์เพื่อความปลอดภัยอาหารของผู้บริโภค

1.1 ยาที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่มีการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ แบ่งได้เป็น 4 ชนิด ดังนี้

1) ยาปฏิชีวนะ Oxolinic acid

ข้อมูลทั่วไป: เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (Quinolone) จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับยาตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา แต่จากข้อมูลในปัจจุบันนี้ พบว่ายานี้จัดเป็นยาควบคุมพิเศษ และไม่มีทะเบียนยานี้แล้วตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องยาควบคุมพิเศษ ฉบับที่ 50 (2562) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ออกฤทธิ์ได้ในขอบเขตกว้าง สารนี้มีลักษณะเป็นกรดอ่อน ละลายได้ดีในไขมัน และดูดซึมดีในระบบทางเดินอาหาร และถูกขับออกทางปัสสาวะ ยากลุ่มนี้ค่อนข้างปลอดภัย ไม่ค่อยทำให้เกิดอาการเป็นพิษ แต่อาจมีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทส่วนกลาง มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{11}NO_5$ น้ำหนักโมเลกุล 261.23 g/mol และสามารถออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียคล้ายคลึงกับสาร Nalidixic acid แต่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Enterobacteriaceae ได้สูงกว่า

2. ยาปฏิชีวนะ Tetracycline group (Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline)

ข้อมูลทั่วไป: เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับยาตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{24}N_2O_9$ และน้ำหนักโมเลกุล 460.434 g/mol มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง และละลายน้ำได้จำกัดที่มี pH เท่ากับ 7 ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์สูงสุดที่ pH ระหว่าง 5.5-6 ภายใต้อุณหภูมิและ pH ที่ไม่เหมาะสม ยากลุ่มเตตราซัยคลินจะเกิดการสลายตัวโดยการเกิดทั้ง degradation และ rearrangement ของสูตรโครงสร้างทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอเตตราซัยคลินจะเกิดการสลายตัวได้เร็วที่สุด จะเปลี่ยนเป็นไอโซคลอเตตราซัยคลินทันทีที่ pH 7.5 คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของ ยากลุ่มเตตราซัยคลินก็คือ สามารถที่จะรวมตัวกับไอออนของพวกไดวาเลนต์และไตรวาเลนต์ เป็นสารประกอบ ที่ไม่ละลายน้ำ เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่ายานี้ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบเชื้อ anaerobic bacteria, rickettsiae, chlamydiae, Mycoplasma, spirochetes และ protozoa

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำ มี 3 ชนิดหลัก คือ คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลิน ซึ่งยานี้จะมีการดูดซึมหลังจากที่ผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหารและลำไส้ หลังจากดูดซึมแล้วบางส่วนของยาจะเกิดเมตาบอลิซึม ออกซีเตตราซัยคลินที่ผสมในอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป หรืออาหารสด พบว่า ประมาณ 20-30% ของยาที่ผสมในอาหารเท่านั้นที่สัตว์น้ำจะได้รับเข้าไป ส่วนที่เหลือของยาบางส่วนก็อาจละลายน้ำและรวมตัวกับสารต่างๆ รวมทั้งตะกอนดินในน้ำ บริเวณที่มีการเลี้ยงปลา ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในบริเวณดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้เชื้อเหล่านั้นดื้อยาและได้มีการศึกษาผลของแสงที่มีต่อการสลายตัวของยา จากการศึกษาพบว่าทั้งอุณหภูมิและแสง

สว่างมีผลต่อการสลายตัวของยาออกซีเตตราซัยคลินในน้ำทะเล นอกจากนี้ ยากลุ่มนี้กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 21 วันสำหรับปลาและกุ้ง

3. ยาปฏิชีวนะ Fluoroquinolones group

ข้อมูลทั่วไป: เป็นกลุ่มยาที่พัฒนามาจากยาในกลุ่มควิโนโลน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพเพิ่มมากขึ้น ยากลุ่มนี้ไม่ได้แยกจากเชื้อรา แต่ได้มาจากการสังเคราะห์ ออกฤทธิ์ดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบมากกว่าแกรมบวก ยาตัวแรกในกลุ่มนี้คือ นาลิดิซิก แอซิด ตัวอย่างยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ได้รับการพัฒนา เช่น ยานอร์ฟล็อกซาซิน เอ็นโรฟล็อกซาซิน โซโปรฟล็อกซาซิน ฯลฯ

ยา Enrofloxacin เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีการดูดซับดี หลังจากผสมให้สัตว์กิน จากสูตรโครงสร้างมีการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ให้กว้างขึ้นทั้งต่อเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ เป็นผลึกสีเหลืองอ่อน นอกจากจะมีการเติม Piperazine ring แล้วยังมีการเพิ่มหมู่เอทิล (ethyl) เข้าที่ Piperazine ring ทำให้ Enrofloxacin มีคุณสมบัติเป็น lipophilic มากขึ้น คือ สามารถละลายได้ดีในไขมันของร่างกาย ยาจะสามารถเคลื่อนตัวผ่านชั้น lipoprotein ของ Cell Membranes ได้ง่ายและรวดเร็วจากนั้นตัวยาก็จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 359.4 g/mol และมีการกำหนดระยะเวลาหยุดยาของปลาที่ 21 วัน

ยา Sarafloxacin เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อีกทั้งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Fluoroquinolone ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase ซึ่งช่วยในการรักษาและควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ปีกที่เกิดจาก *E. coli*, และ *Salmonella* spp. มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{18}ClF_2N_3O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 421.825 g/mol และมีการกำหนดระยะเวลาหยุดยาของปลาและกุ้งที่ 5 วัน

ยา Norfloxacin เป็นยาที่ห้ามใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีการพัฒนายา Nalidixic acid โดยการเพิ่มฟลูออรีน (F) และเพิ่ม Piperazine ring ทำให้ประสิทธิภาพของยานี้สามารถทำลายแบคทีเรียได้กว้างขึ้น ทั้งแกรมลบและแกรมบวกซึ่งจากเดิมที่ Nalidixic acid มีฤทธิ์จำกัดเพียงแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น นอกจากนั้นการเพิ่ม Piperazine ring ทำให้สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียที่เป็นพิษ เช่น ชูโดโมแนส และไวรัสโอได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยานี้สามารถกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้ดี สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยถือว่ายา Norfloxacin เป็นยาตัวแรกๆในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำและใช้แก้ปัญหาในพื้นที่ที่มีคนพบการดื้อยา

ยา Flumequine เป็นยารุ่นแรกของยาปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนที่สังเคราะห์ขึ้นมา ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหาร มีลักษณะเป็นผงหรือผลึกสีขาว

ดูดซึมได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ในร่างกายสัตว์ เป็นสารก่อมะเร็ง และเกิดการบวมของเซลล์ตับ/พิษต่อระบบสืบพันธุ์และตัวอ่อน Flumequine มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{12}FNO_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 261.248 g/mol

ยาในกลุ่มนี้ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้แก่ Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Difloxacin, Sarafloxacin, Norfloxacin, และ Danofloxacin

4. ยาปฏิชีวนะ Sulfonamides group (Sulfa group)

ข้อมูลทั่วไป: ยากลุ่มซัลฟาออกฤทธิ์กว้างต่อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตและการขยายตัวของแบคทีเรีย โดยจะไปขัดขวางการสร้างเมทาบอลิท์ที่สำคัญของแบคทีเรีย โดยฤทธิ์ยาซัลฟาจะยังไม่เกิดในทันทีหลังรับยา การขยายตัวของแบคทีเรียยังคงเกิดขึ้น ขณะหนึ่ง ก่อนที่ยาจะออกฤทธิ์ กรณีที่สัตว์น้ำมีอาการป่วยอย่างเรื้อรังจะสังเกตได้ว่า การใช้ยาซัลฟารักษาจะไม่ค่อยได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากยาซัลฟาออกฤทธิ์เพียงไปยับยั้งการเจริญและขยายตัวของแบคทีเรียเท่านั้น ดังนั้น ยาซัลฟาจึงให้ผลรักษาไม่ดีในสัตว์น้ำที่มีการติดเชื้ออย่างเรื้อรัง จึงเหมาะสมที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์น้ำในระยะเริ่มต้นที่ยังไม่มีการเรื้อรัง

ยา Sulfadimethoxine และ Ormetoprim มีชื่อทางการค้าว่าโรเมต-30 จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้น้อยมาก ออกฤทธิ์ต่อจุลชีพโดยยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัว ซึ่งมีรายงานว่าใช้ยาโรเมต-30 ผสมในอาหารให้กุ้งกุลาดำจะสามารถลดอัตราการตายเนื่องจากเชื้อไวรัสได้ Sulfadimethoxine มีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ และน้ำหนักโมเลกุล 310.33 g/mol และ Ormetoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_2$ และน้ำหนักโมเลกุล 274.323 g/mol โดยการใช้ยาในปัจจุบันมักแนะนำให้ใช้เป็น 2 กรณี คือ 1) ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคลำไส้ โรคซัซาว โรคซัซาดตอน และ 2) ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งอายุ 20, 40 และ 60 วัน และมีการกำหนดระยะหยุดยาสำหรับปลาและกุ้ง โดยกำหนดที่ 42 วัน

ยา Sulfadimethoxine sodium และ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเช่นกัน ใช้ร่วมกันป้องกันโรคติดเชื้อและช่วยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ Dihydrofolate reductase ที่เปลี่ยน Dihydrofolate เป็น Tetrahydrofolate ของกระบวนการสร้าง Purines นอกจากนี้ยังมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ Sulfadimethoxine มีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ และน้ำหนักโมเลกุล 310.33 g/mol และ Trimethoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 290.318 g/mol และมีการกำหนดระยะหยุดยาสำหรับปลาและกุ้ง โดยกำหนดที่ 21 วัน

นอกจากนี้ ยา Sulfamonomethoxine และ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา วิชาการติดเชื้อจุลชีพในระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินปัสสาวะ Sulfamonomethoxine มีสูตรโมเลกุล $C_{11}H_{12}N_4O_5S$ และน้ำหนักโมเลกุล 280.30 g/mol และ Trimethoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 290.318 g/mol ทั้งนี้ ไม่มีการกำหนดระยะหยุดยาไว้

ยาในกลุ่มนี้ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้แก่ Sulfadimethoxine, Sulfamethazine, Sulfadiazine, Sulfathiazole, Sulfamonomethoxine และ Sulfamereazine และได้เพิ่มเติมการตรวจวิเคราะห์ยาชนิด Trimetoprim และ Ormetoprim

1.2 ยาที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำ ที่มีการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ แบ่งได้เป็น 7 ชนิด ดังนี้

1. Nitrofurans (metabolites)

ข้อมูลทั่วไป: ยากลุ่มไนโตรฟิวแรนส์คือยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้น นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของสัตว์จำพวกแพะ แกะ สุกร โค กระบือ เป็ด ไก่ และกิ้ง สุตรโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยวงแหวนฟูแรนเกาะด้วยไนโตรกรุป เรียกว่า 5-Nitrofuraldehyde มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำได้เล็กน้อย ยากลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมากได้แก่ฟูราโซลิโดน (Furazolidone) ฟูรัลทาโดน (Furaltadone) ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) และไนโตรฟูรานโทอิน (Nitrofurantoin) แต่จากผลการศึกษาพบว่ายากลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ถ้าได้รับการบริโภคในระยะเวลาอันยาวนาน จึงถูกห้ามใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงไว้เพื่อเป็นอาหารในหลายประเทศ เช่น อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ บังคลาเทศ และกลุ่มสหภาพยุโรป

ยากลุ่มไนโตรฟิวแรนส์ในรูปยาตั้งต้น (parent drugs) จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ กลายเป็น metabolites เป็นยาที่มีอายุสั้นเมื่อแพร่กระจายสู่ร่างกายสัตว์ในเวลาไม่กี่ชั่วโมงจะจับตัวตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เรียกว่า tissue-bound metabolites หรือ protein-bound metabolites ซึ่งจะมีความคงตัวกว่า parent drugs และจะตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ได้นานหลายสัปดาห์ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่มไนโตรฟิวแรนส์จึงอาศัยพื้นฐานการตรวจวัด metabolites ของ parent drugs ซึ่ง metabolites ของฟูราโซลิโดน ฟูรัลทาโดน ไนโตรฟูราโซน และไนโตรฟูรานโทอิน คือ 3-amino-2-oxazolididone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ Semicarbazide (SEM) ตามลำดับ

2. Chloramphenicol

ข้อมูลทั่วไป: เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการผลิตของ *streptomyces venezuelae* ค้นพบในปี 1947 จากตัวอย่างของดินที่ได้จากประเทศเวเนซุเอลา ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางต่อแบคทีเรียทั้งพวกแกรมบวกและแกรมลบ สารนี้มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อนมากนัก และสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นสารที่ไม่มีสี และไม่ค่อยละลายในน้ำ นอกจากนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 323.132 g/mol

คลอแรมฟินิคอลจะแพร่กระจายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียและจะเข้าไปจับกับไรโบโซม 50S ของแบคทีเรียทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่างไรโบโซม 50S และ tRNA ปฏิกริยาระหว่างเอ็นไซม์ peptidyl transferase กับกรดอะมิโนจาก tRNA จึงไม่เกิดขึ้นเป็นผลทำให้ไม่มีการสังเคราะห์

อวัยวะเป้าหมายที่มีความเสี่ยงต่อการใช้ยาคลอแรมฟินิคอลคือไขกระดูกโดยมีผลต่อระบบการผลิตเม็ดเลือด 2 ประการคือทำให้จำนวนเซลล์หรือองค์ประกอบในเลือดลดลง (pancytopenia) และการตอบสนองของร่างกาย (idiosyncrasy) อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือด กลไกความเป็นพิษของคลอแรมฟินิคอลต่อไขกระดูกยังไม่เป็นที่ชัดเจน ในรายของผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากผลกระทบของคลอแรมฟินิคอลต่อการเปลี่ยนแปลงในไขกระดูกนี้จะมีอัตราเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) จากผลการศึกษาพบว่าการลดลงของจำนวนเซลล์ที่ผลิตเม็ดเลือดในไขกระดูกขึ้นอยู่กับปริมาณของยาคลอแรมฟินิคอลที่ใช้ ในขณะที่การตอบสนองของร่างกายอันเนื่องมาจากการลดลงของจำนวนเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือดไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณยาคลอแรมฟินิคอลที่ใช้ แต่มีแนวโน้มว่าจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่มีการใช้ยาคลอแรมฟินิคอลติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากนี้คลอแรมฟินิคอลยังมีผลต่อเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงมีการพัฒนาอย่างไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ ผลกระทบของคลอแรมฟินิคอลต่อเม็ดเลือดแดงจะแปรผันตามปริมาณของคลอแรมฟินิคอลที่ใช้

3. Malachite green (MG) & Leuco-malachite green (LMG) และ Crystal violet (CV) & Leuco-crystal violet (LCV)

ข้อมูลทั่วไป: สารเคมีนี้จัดอยู่ในกลุ่มสีย้อม (Dyed) มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ ยังยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ฆ่าแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวก และแกรมลบ แต่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ ซึ่งออกฤทธิ์โดยไปรวมกับองค์ประกอบภายในเซลล์ได้เป็นคอมเพล็กซ์ที่ไม่แตกตัว ซึ่งทำให้ขัดขวางขบวนการทางชีววิทยาที่สำคัญๆ ในหลายๆประเทศได้พยายามจำกัดการใช้มาลาไคท์กรีนในสัตว์น้ำเนื่องจากพบว่า มาลาไคท์กรีนเป็นเคมีภัณฑ์ที่มีพิษสูง มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและมีผลต่อโครโมโซมของเซลล์ แต่ในบางประเทศใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากโปรโตซัวในสัตว์น้ำ โดยแนะนำให้ใช้ในขนาด 0.1-0.5 mg. ต่อน้ำ 1 ลิตร และมีการนำมาใช้ร่วมกับ Formalin ในการรักษาโรคจุดขาว นอกจากนี้กรมประมงอนุญาตให้ใช้ได้เฉพาะในปลาสวยงามเท่านั้น

สารนี้อยู่ในกลุ่มสีย้อมมีชื่อทางเคมีคือ 4-R (dimethylamine)-phenyl- benzyldene)-2, 5-cyclohexadienylidene dimethyl ammonium chloride มีสูตรโมเลกุล Malachite green $C_{23}H_{25}N_2Cl$ และ Leuco-malachite green $C_{23}H_{26}N_2$ ทั้งนี้น้ำหนักโมเลกุลของ Malachite green 365 g/mol และ Leuco-malachite green 330.47g/mol ได้นำมาใช้ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราและปรสิตเซลล์เดียว โดยทั่วไปจะใช้งานในโรงเพาะฟักในประเทศเขตที่มีอุณหภูมิค่อนข้างเย็น สำหรับในประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน จึงไม่ค่อยนิยมใช้ อีกทั้งราคาของยาในกลุ่มนี้มีราคาแพง ยาในกลุ่มนี้มีช่วงเวลากการสลายตัว ซึ่งหากนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ก็สามารถควบคุมช่วงเวลากการสลายตัวของยาให้หมดไป ก่อนจับปลาขายสู่ท้องตลาด ความเป็นพิษที่รุนแรงทำให้การใช้ Malachite green จำกัดอยู่ในโรงเพาะฟักเท่านั้น และเกษตรกรบางส่วน ก็เปลี่ยนมาใช้สารป้องกันเชื้อรากลุ่มอื่นแทน เช่น ไตรฟลูราลิน เป็นต้น สำหรับข้อมูลความเป็นพิษพบว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดกลายพันธุ์ (Mutagenic) โดยทำให้ไข่ของปลาที่แช่ด้วยสารชนิดนี้ มีการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนอย่างไม่สมบูรณ์ รวมทั้งเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogenic) ในสัตว์ทดลอง มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำสูงมาก โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1-2 ppm ก็จะทำให้ปลาน้ำจืดตายได้ในเวลา 1 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในกุ้งทะเล

2. วิเคราะห์สารปนเปื้อน

ถือได้ว่ามีความสำคัญและต้องมีการควบคุมคุณภาพ เพื่อความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค โดยการตรวจสอบสารที่ปนเปื้อนในอาหารจะช่วยให้ทราบชนิดและปริมาณสารปนเปื้อน ซึ่งเป็นการบ่งบอกคุณภาพของวัตถุดิบที่นำเข้าสู่อุตสาหกรรมแปรรูป ทั้งนี้ประเทศผู้นำเข้าต่าง ได้กำหนดมาตรฐานสารปนเปื้อนเพื่อเป็นการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภคในประเทศ ดังต่อไปนี้

1. โลหะหนัก

โลหะหนัก หมายถึง ธาตุที่มีค่าความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำ 5 เท่า ขึ้นไป ซึ่งโลหะหนักบางชนิดมีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น แมงกานีส (Mn), เหล็ก (Fe), ทองแดง (Cu) และสังกะสี (Zn) เป็นต้น แต่โลหะหนักบางชนิดมีความเป็นพิษต่อร่างกาย เช่น ปรอท (Hg), ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) นอกจากนี้ สารหนู (As) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มธาตุกึ่งโลหะ (Metalloid) แต่สารหนูมีความเป็นพิษต่อร่างกาย จึงมักจะถูกรวมอยู่ในกลุ่มโลหะหนักที่มีความเป็นพิษด้วย โลหะหนักเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ โดยอาจมาจากการทำเหมืองแร่ โรงงานผลิตสารเคมี โรงงานผลิตไฟฟ้าโดยใช้ถ่านหิน การทำแบตเตอรี่ การใช้ปุ๋ยและยากำจัดศัตรูพืชในการเกษตรกรรม แล้วจะถูกปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมและบรรยากาศ หากไม่มีการบริหารจัดการกากของเสียที่ดี จะทำให้เกิดการปนเปื้อนโลหะหนักเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมและเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ ในบทความนี้ จะขอสรุปเกี่ยวกับโลหะหนัก 3 ชนิดที่มีความเป็นพิษและกำหนดเป็นมาตรฐานในการควบคุมสินค้าประมงของประเทศผู้นำเข้าต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง

1.1 แคดเมียม (Cd)

ข้อมูลทั่วไป: แคดเมียม เป็นโลหะหนัก (heavy metal) ชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถปนเปื้อนกับสิ่งแวดล้อมและตกค้างในอาหาร เป็นอันตรายในอาหาร (food hazard) ประเภทอันตรายทางเคมี (chemical hazard) การได้รับแคดเมียมจำนวนมากอาจทำให้เกิดพิษเฉียบพลันได้ พิษเฉียบพลันส่วนใหญ่เกิดจากการหายใจเอาฝุ่นหรือไอระเหยแคดเมียม ทั้งนี้ เกณฑ์มาตรฐานปลอดภัยที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก กำหนดไว้ว่าคนปกติไม่ควรได้รับแคดเมียมเกินสัปดาห์ละ 0.40-0.50 มิลลิกรัม

อาหารที่มักมีการปนเปื้อนสารแคดเมียมได้แก่ ข้าว ผัก ผลไม้ อาหารทะเลต่าง ๆ เช่น ปลาหมึกและหอย ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารแคดเมียมที่เข้าสู่ร่างกายขึ้นอยู่กับระดับปริมาณสารแคดเมียมที่สะสมในอากาศ แหล่งน้ำและแหล่งดินที่ปลูกพืชผลทางเกษตร เมื่อแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารแล้วลำเลียงไปตามกระแสเลือดพร้อมกับเม็ดเลือดแดงและจะจับกับโปรตีนที่ชื่อว่า Metallothionein สร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนส่งไปที่ไต ทำให้เกิดโรคพิษเรื้อรังที่ไต

1.2 ตะกั่ว (Pb)

ข้อมูลทั่วไป: ปัจจุบันอุตสาหกรรมหลายประเภทมีการใช้ตะกั่วเป็นวัตถุดิบเป็นจำนวนมาก เช่น ใช้สังเคราะห์สารเตตระเอทิลเลด (tetraethyllead, TEL Pb (C₂H₅)₄) ในเบนซินเพื่อเพิ่มค่าออกเทน (octane number) เมื่อมีการออกซิไดซ์จะได้ PbO ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ได้โลหะตะกั่วออกสู่ภาวะแวดล้อม ตะกั่วสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ทางอาหาร ทางการหายใจ และทางผิวหนัง เมื่อสารตะกั่วเข้าสู่ร่างกาย ส่วนใหญ่จะจับยึดอยู่กับเม็ดเลือดแดงจะไปลดการสร้าง heme ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดแดงโดยไปยับยั้งเอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้าง heme นอกจากนี้ ตะกั่วยังมีผลต่อตับ หัวใจและเส้นเลือด ภาวะเจริญพันธุ์ โครโมโซม และก่อให้เกิดโรคมะเร็ง และความพิการแต่กำเนิดอีกด้วย ทั้งนี้ ปริมาณตะกั่วที่พบมากในสินค้าประมงเช่นหอย และปลา เป็นต้น

1.3 พรอท (Hg)

ข้อมูลทั่วไป: เป็นโลหะหนักที่ของเหลวระเหยเป็นไอได้ง่ายในภาวะปกติ พรอทพบมากในแหล่งที่มีการเผาไหม้น้ำมันเชื้อเพลิง โลหะ โรงงานผลิตปูนซีเมนต์ ในอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารประกอบของพรอท นอกจากนี้ยังใช้ในวงการแพทย์ เช่นเป็นสารอุดฟัน ไอปรอทที่เข้าสู่ร่างกาย จะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตทันที และกระจายไปยังสมองและส่วนอื่น ๆ ของร่างกายได้รวดเร็ว การได้รับสารพรอทสะสมเป็นเวลานานจะทำให้มีอาการมือ และใบหน้าเกิดอาการบวมและเจ็บ บางคนอาจเกิดอาการเหน็บชาบางส่วนจนเป็นอัมพาต ทั้งนี้ ปริมาณพรอทในรูป Total mercury ที่พบมากในสินค้าประมงในปลาบางชนิด ได้แก่ ปลาทูน่า ปลาฉลาม เป็นต้น

สารประกอบพรอทอินทรีย์ เป็นรูปแบบของพรอทที่ถูกเมทิลเลท และมีความเป็นพิษมากที่สุด ได้แก่สารประกอบ Alkyl mercury เช่น Methyl mercury, Dimethyl mercury และ Ethyl mercury

ซึ่ง Methyl mercury มีความเป็นพิษสูงมาก เนื่องจากละลายได้ดีในไขมันจึงสะสมในร่างกายได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อสมอง

3. วิเคราะห์วัตถุเจือปนอาหาร

ถือได้ว่าเป็นเรื่องสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมคุณภาพ เพื่อความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค เนื่องจากในปัจจุบันอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารมีการนำวัตถุเจือปนอาหารมาใช้อย่างกว้างขวาง ซึ่งวัตถุเจือปนอาหาร หมายความว่า วัตถุที่ตามปกติมิได้ใช้เป็นอาหารหรือส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การบรรจุ การเก็บรักษาหรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะอาหาร

ในการนี้ ประเทศผู้นำเข้าต่าง ๆ จึงให้ความสนใจและเพื่อคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภคในประเทศ จึงได้มีการกำหนดมาตรฐานวัตถุเจือปนอาหารไว้หลากหลาย ในส่วนของสินค้าประมงมีการควบคุมตรวจสอบวัตถุเจือปนอาหาร เพื่อควบคุมคุณภาพความปลอดภัยของสินค้าประมงก่อนการส่งออกดังต่อไปนี้

1. สารเบนโซอิก แอซิด และซอร์บิก แอซิด (Benzoic acid & Sorbic acid)

ข้อมูลทั่วไป: กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต เป็นวัตถุกันเสียที่มีประวัติการใช้มานานตั้งแต่ปี 2487 โดยใช้ทดแทนการใช้กรดซาลิซิลิก กรดนี้มีลักษณะเป็นผงผลึกหรือเป็นเกล็ดสีขาว น้ำหนักโมเลกุล 121.11 มีจุดหลอมเหลว 122 องศาเซลเซียส และจุดเดือด 249 องศาเซลเซียส มีความสามารถละลายน้ำได้น้อยมาก แต่ละลายดีขึ้นในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และน้ำมัน กรดนี้มีค่าความเป็นกรดต่าง 2.5-4.0 เหมาะสำหรับใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเป็นกรดสูงเช่นเครื่องดื่มชนิดต่างๆ น้ำหวาน น้ำผลไม้ แยม ผักดอง ผลไม้ดอง เป็นต้น มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ ซึ่งมีผลต่อผนังเซลล์และเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ทำให้ผิดปกติ ส่วนกรดซอร์บิกและเกลือ ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา และยีสต์ และที่นิยมใช้มักอยู่ในรูปเกลือโซเดียมและโพแทสเซียมซอร์เบต

กรดเบนโซอิก และซอร์บิก นิยมใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร ช่วยยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ ทั้งนี้ อันตรายจากการได้รับกรดนี้ มีการศึกษาความเป็นพิษในระดับปานกลาง ถ้าได้รับปริมาณน้อยไม่ทำให้เกิดการสะสมในร่างกาย เนื่องจากร่างกายมีกลไกในการขจัดกรดนี้ออกจากร่างกาย แต่ถ้าได้รับปริมาณสูงอาจทำให้เกิดการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของตับและไตลดลง เป็นต้น

2. กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติก (Ethylene diamine tetra acetic acid) (EDTA)

ข้อมูลทั่วไป: EDTA เป็นสารเคมีที่ใช้ทั้งในภาคอุตสาหกรรมและการแพทย์ เป็นสารเคมีไร้สีสามารถละลายน้ำได้ ใช้ในการขจัดคราบหินปูน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการแยกไอออนโลหะเช่น Ca^{2+}

และ Fe^{3+} นอกจากนี้ EDTA ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารจำพวกเกลือหลายประเภท ถนอมสีและกลีนิรสของอาหารกระป๋องให้คงสภาพเดิมป้องกันการเกิดผลึกแก้ว (Struvite crystal) ในอาหารกระป๋อง

3. สาร Sulfur dioxide (SO_2)

ข้อมูลทั่วไป: ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ใช้ในการฟอกสี และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร เกลือซัลไฟต์ที่ใช้ในอาหาร ได้แก่ โซเดียมไบซัลไฟต์ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โซเดียมซัลไฟต์ โพแทสเซียมไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมซัลไฟต์ เป็นต้น สารกลุ่มซัลไฟต์ เมื่อถูกความร้อนจะสลายให้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และจะเป็นก๊าซได้ดีที่สภาวะเป็นกรด

Sulfur dioxide (SO_2) ถูกใช้เป็นสารออกซิไดซ์ รีดิวซ์หรือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ การผลิตกรดซัลฟูริก สารป้องกันการเน่าเสีย การรมควัน และสารฟอกขาว

4. สารฟอสเฟต ในรูป P_2O_5

ข้อมูลทั่วไป: สารประกอบฟอสเฟตพบได้ทั่วไปในร่างกายมนุษย์ โดยสารอินทรีย์ฟอสเฟตพบมากในสิ่งมีชีวิตในรูปเอสเตอร์ (Ester) ของกรดฟอสฟอริก และอีกชนิดคือสารอนินทรีย์ฟอสเฟต พบทั่วไปตามธรรมชาติ เช่นเป็นธาตุที่หมุนเวียนในระบบนิเวศ ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต สารอนินทรีย์ฟอสเฟตที่พบในอาหารอุดมด้วยโปรตีน โดยสารนี้มีคุณสมบัติรักษาคุณภาพเนื้อสัตว์ ช่วยเพิ่มความสามารถอุ้มน้ำของเนื้อ ช่วยให้เนื้อมีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสและประสาทสัมผัสที่ดีขึ้น จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำเช่นกัน

คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของฟอสเฟต คือช่วยยืดอายุการเก็บรักษาโดยลด Freezer burn ซึ่งเกิดจากการสูญเสียน้ำบริเวณผิวหน้าของอาหาร ลดการสูญเสียน้ำภายหลังการทำละลาย (thaw drip losses) ยับยั้งการเหิน เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ป้องกันการเกิดผลึกแก้ว (Struvite crystal) ในอาหารกระป๋อง มีการใช้ในการทำปุ๋ยและผงซักฟอก สารประกอบฟอสเฟตที่ใช้ในอาหารทะเลส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกโพลีฟอสเฟต ซึ่งมีหลายชนิด เช่น Sodium acid pyrophosphate, Tetra-sodium pyrophosphate, Sodium tripolyphosphate และ Sodium hexametaphosphate

4. วิธีวิเคราะห์สารชีวพิษ

ถือได้ว่าเป็นหนึ่งรายการวิเคราะห์ที่ต้องควบคุมตรวจสอบอย่างเข้มงวด ทั้งนี้ กรมประมงมีการเฝ้าระวังการตรวจพบสารชีวพิษ สารปนเปื้อน เชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งเลี้ยงหอยสองฝา เพื่อเป็นการควบคุมเฝ้าระวังปัญหาการตรวจพบจากแหล่งเลี้ยง ในส่วนของสินค้าประมงส่งออก กรมประมงมีการสุ่มตรวจวัตถุดิบหอยสองฝาที่ใช้ในการแปรรูปส่งออก เพื่อควบคุมคุณภาพความปลอดภัยให้สอดคล้องตามมาตรฐานประเทศ

ผู้นำเข้าต่าง ๆ ผู้เขียนขอสรุปรายการสารชีวพิษหลักๆ ที่มีความสำคัญและกำหนดเป็นมาตรฐานสำหรับประเทศผู้นำเข้าต่าง ๆ

สารชีวพิษชนิด PSP, ASP และ DSP เป็นสารชีวพิษที่เกิดในแพลงก์ตอนชนิด *Gonyaulax catanella* และ *Gonyaulax tamarensis* ซึ่งเป็นอาหารของหอยสองฝาโดยจะดูดซึมสารพิษนี้จากแพลงก์ตอนสะสมไว้ในตัวเมื่อรับประทานหอยที่มีสารชีวพิษชนิด PSP จะออกฤทธิ์กับระบบประสาทหลังบริโภคประมาณ 30 นาที โดยจะมีอาการชาที่ปาก กล้ามเนื้อเกิดอัมพาต หากได้รับปริมาณมากจะเสียชีวิตภายใน 12 ชั่วโมง เนื่องจากระบบหายใจขัดข้อง การรักษามักใช้วิธีให้ผู้ป่วยอาเจียน หรือล้างกระเพาะด้วยผงถ่านเพื่อดูดซับสารพิษออกให้มากที่สุด รวมทั้งใช้เครื่องช่วยหายใจ

1. สาร Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

ข้อมูลทั่วไป: เกิดผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหาร กล่าวคือมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และปวดท้อง นอกจากนี้ ยังแสดงอาการทางระบบประสาท ทำให้เกิดความจำเสื่อมชั่วคราว รู้สึกสับสน หายใจลำบากและหมดสติในที่สุด

2. สาร Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

ข้อมูลทั่วไป: พิษท้องร่วงจากแพลงก์ตอนพืช เกิดจากการบริโภคหอยสองฝา เช่น หอยแมลงภู่ หอยแครง หรือหอยนางรม ที่กรองเอาแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต ในสกุล *Dinophysis* ได้แก่ *D. fortii* พบในประเทศ ญี่ปุ่น และ *D. acuta* พบในประเทศสวีเดน อาการของการได้รับพิษโดยทั่วไป คือ ท้องร่วง อาเจียน ส่วนสารที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพิษ คือ กรดโอคาไดค (okadaic acid) ซึ่งเป็นสารพิษที่ละลายในไขมัน และทนความร้อนได้ดี จึงไม่สามารถทำลายพิษด้วยการหุงต้มได้

นอกจากนี้ สารชีวพิษอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งพบได้ในหอยสองฝาคือกลุ่ม lipophilic toxins ได้แก่ Pectenotoxins (PTX); Yessotoxins (YTX) และ Azaspiracids (AZA) สารพิษเหล่านี้มักพบได้ในหอยเช่นกัน

3. สาร Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

ข้อมูลทั่วไป: เกิดจากการบริโภคหอยสองฝา เช่น หอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยนางรม ที่กรองแพลงก์ตอนพืชที่ผลิตสารพิษที่เป็นอาหาร แพลงก์ตอนพืชที่เป็นสาเหตุของพิษอัมพาต ได้แก่ แพลงก์ตอนในสกุล *Alexandrium* ได้แก่ *A. Catenella* พบบ่อยตามชายฝั่งตะวันตกของอเมริกา (ฝั่งแปซิฟิก) และ *A. tamarensis* พบตามฝั่งตะวันออกของแคนาดา และอเมริกา (ฝั่งแอตแลนติก) ทั้ง 2 ชนิด เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพิษในประเทศดังกล่าว และประเทศญี่ปุ่น ส่วนแพลงก์ตอนในสกุล *Pyrodinium* ได้แก่ *P. Phoneus* พบในเกาะบอร์เนียว และปาปัวนิวกินี และ *P. phoneus* พบในฝั่งทะเลของประเทศเนเธอร์แลนด์ การเกิดพิษอัมพาตจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี

สารที่เป็นสาเหตุของการเกิดพิษต่อระบบประสาทนี้จะอยู่ในกลุ่ม Saxitoxin (STX), Neosaxitoxin (NeoSTX) และ Gonyautoxin (GTX) สารพิษนี้จะละลายได้ในน้ำ และมีคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถทนต่อความร้อนที่ใช้ในการปรุงอาหารได้ จึงไม่สามารถทำลายสารพิษโดยการหุงต้มได้ สารพิษเหล่านี้จะเป็นตัวยับยั้งการส่งผ่านโซเดียมไอออนในระบบประสาท และกล้ามเนื้อ ผู้ที่ได้รับสารพิษจะมีอาการชาบริเวณปาก ลิ้น และปลายนิ้ว ซึ่งอาจเกิดขึ้นภายใน 2-3 นาที ภายหลังการบริโภค ต่อจากนั้นอาการรุนแรงที่จะตามมาคือ หายใจลำบาก กล้ามเนื้อเป็นอัมพาต โดยจะมีอาการรุนแรงขึ้นตามลำดับ และอาจถึงแก่เสียชีวิตเนื่องจากการล้มเหลวของระบบหายใจ หรือเนื่องจากกล้ามเนื้อหัวใจไม่ทำงาน

สารชีวพิษ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้แก่ ASP, PSP, DSP, PTX, YTX และ AZA

5. วิธีวิเคราะห์คุณภาพ (Quality index)

เป็นอีกรายการตรวจวิเคราะห์หนึ่งที่มีความสำคัญและจำเป็น โดยเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของวัตถุดิบสัตว์น้ำที่รับเข้าโรงงานแปรรูป และบ่งบอกถึงกระบวนการระยะเวลาการแปรรูป การตรวจวิเคราะห์คุณภาพความสดสำหรับสัตว์น้ำที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่

1. Histamine & Putrescine & Cadaverine

ข้อมูลทั่วไป: ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines) เป็นสารประกอบที่มีธาตุไนโตรเจนในองค์ประกอบของแอมโมเนียแทนที่ด้วยหมู่อัลคิลหรืออัลลิล (alkyl or aryl groups) สารประกอบกลุ่มนี้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น พิวตริซีน (putrescine) คาดาเวอรีน (cadaverine) แอคมาทิน (agmatine) สเปอ์มีน (spermine) และสเปอ์มิดิน (spermidine) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นอะลิฟาติก (aliphatic structure) ขณะที่ไทรามิน (tyramine) และฟีนีลเอทิลเอมีน (phenylethylamine) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก (aromatic structure) โครงสร้างที่เป็นเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic structure) ได้แก่ ฮิสตามีน (histamine) และทริปตามีน (tryptamine)

ไบโอจีนิกเอมีน เป็นสารประกอบที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ที่มีชีวิต พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น ปลาและ ผลิตภัณฑ์จากปลา ไวน์ เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากนม เบียร์ เนื้อ และผัก ไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นในระหว่างการเน่าเสียของอาหาร โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) ย่อยสลายกรด อะมิโนอิสระในอาหาร เหล่านั้นจนได้เป็นไบโอจีนิกเอมีน ฮิสตามีนเกิดจากแบคทีเรียที่สร้างฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) ย่อยสลายกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine) ที่มีอยู่มากในโปรตีนเนื้อปลาให้เปลี่ยนเป็นฮิสตามีน หรือ เรียกว่าสคอมโบรอกซิน (Scombrototoxin)

ความเป็นพิษของไบโอจีนิกเอมีนสัมพันธ์กับการได้รับประทานปลาในตระกูลสคอมบรอยด์ (Family Scombroid) เช่น ปลาทูน่า ปลาซาร์ดีน และปลาแมคเคอเรล เป็นต้น ปลาเหล่านี้เป็นอาหารทะเลที่ทำให้ผู้บริโภคส่วนใหญ่ได้รับสารฮิสตามีน ความเป็นพิษพบทั้งในผู้ป่วยที่บริโภค ปลาสด

และปลาที่ประกอบอาหารแล้ว การรับประทาน สารประกอบไฮโอจีนิกเอมีนที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร จะเป็นผลให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากฮิสตามีน และไทรามิน โรคอาหารเป็นพิษจากฮิสตามีน หรือจากสารพิษสคอมบรอยด์ (Scombroid poisoning) จึงได้มีความสำคัญต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ

บทที่ 3

วิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี

วิธีวิเคราะห์ที่รวบรวมในบทนี้ จะเป็นวิธีวิเคราะห์หลักที่ใช้ในการควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ซึ่งได้มีการกำหนดมาตรฐานสำหรับควบคุมสินค้านำเข้าในแต่ละประเทศ วิธีวิเคราะห์นี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของการทดสอบทั้งหมดที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ และได้นำมาเผยแพร่โดยเลือกวิธีวิเคราะห์หลัก เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการหรือหน่วยงานนำไปปฏิบัติใช้ ซึ่งก่อนที่จะนำวิธีวิเคราะห์เหล่านี้ไปปฏิบัติใช้ จะต้องดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ให้เหมาะสมและสอดคล้องกับสถานะของห้องปฏิบัติการทุกครั้ง

1. วิธีวิเคราะห์ Oxolinic acid โดยเทคนิค HPLC

ขอบข่าย

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Oxolinic acid ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Larocque, L., M. Schnurr, S. Sved and A. Weninger. 1991. Determination of Oxolinic Acid Residues in Salmon Muscle Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. ASSOC.OFF.ANAL.CHEM.Vol.74(4):pp 608-611.

หลักการ

Oxolinic acid จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดยใช้ ethyl acetate สารละลายที่สกัดได้จะถูกนำไประเหยแห้ง ละลาย residue ด้วย mobile phase และเติม hexane เพื่อกำจัดไขมัน และทำการวัดปริมาณ Oxolinic acid โดยใช้ Detector ชนิด Fluorescence ที่ Excitation wavelength (EX) 327 nm และ Emission wavelength (EM) 369 nm

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. Column : Symmetry ,ขนาด C 8 , 5 μm , 3.9 x 150 mm, reverse phase
3. Guard Column Symmetry C 18, 5 μm , 3.9 x 20 mm
4. เครื่องชั่ง ความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และ 0.0001 g
5. เครื่อง Centrifuge
6. เครื่อง Rotary evaporator
7. เครื่อง Homogenizer
8. เครื่อง pH meter
9. เครื่อง Ultrasonic bath
10. เครื่อง Vortex mixer
11. ชุดกรอง Mobile Phase ต่อกับ Vacuum pump
12. ปิเปต ชนิด Auto pipette ขนาด 10-100 μL , 100-1000 μL และ 5 ml
13. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 cm
14. ขวดวัดปริมาตรชนิดเกรด A ขนาด 5,10, 100, 500 และ 1000 ml
15. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 500 และ 1000 ml
16. Hyperclean Syringe Filter 0.20 μm ชนิด Nylon membrane เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm
17. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
18. Round Bottom Flask ขนาด 250 ml
19. Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm
20. Centrifuge tube ขนาด 15 ml

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Oxolinic acid ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$)
2. Sodium sulfate
3. Ethyl Acetate, AR grade
4. n-Hexane, AR grade
5. Sodium hydroxide
6. dimethyl sulfoxide AR grade

7. Sodium hydroxide 10%

ละลาย Sodium hydroxide 10 g ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

8. Acetonitrile HPLC grade

กรอง Acetonitrile ก่อนใช้งานโดยผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm จากนั้น degassed นาน 10 นาที

9. 50 % Acetonitrile (w/w)

เจือจาง Acetonitrile 50 ml ด้วย DI 50 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

10. 0.01 M Oxalic acid dehydrate

ละลาย Oxalic acid dehydrate 0.63 g ด้วย DI 50 ml จากนั้นนำไปปรับ pH ให้ได้ 3.3 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% แล้วปรับปริมาตรด้วย DI ให้ได้ 500 ml

11. Mobile phase (Acetonitrile: 0.01 M Oxalic acid, 30:70)

ผสม Acetonitrile ปริมาตร 30 ส่วน และ 0.01 M Oxalic acid pH 3.3 ปริมาตร 70 ส่วน นำไปกรองผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm จากนั้น degassed นาน 10 นาที

12. Stock standard oxolinic acid 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Oxolinic acid 0.0102 ± 0.0005 g ด้วย dimethyl sulfoxide ปริมาตร 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 50% Acetonitrile (เก็บรักษาในอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน)

หมายเหตุ : การเตรียม Stock standard solution จะนำ % ความบริสุทธิ์ของสารมาคิด และจะเปลี่ยนแปลงตาม % ความบริสุทธิ์ของสารในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

13. Intermediate standard oxolinic acid 10 $\mu\text{g/ml}$

ปิเปต Stock standard oxolinic acid 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase 10 ml เขย่าให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

14. Intermediate standard oxolinic acid 1 $\mu\text{g/ml}$

ปิเปต Intermediate standard oxolinic acid 10 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase 10 ml เขย่าให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

15. Working Standard oxolinic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 1 ปรับปริมาตรโดยเติม Mobile phase ที่กำหนด เขย่าให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

ตารางที่ 1.1 การเตรียม Working Standard oxolinic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Working Standard oxolinic acid ที่ ต้องการเตรียม ($\mu\text{g/ml}$)	Intermediate Standard oxolinic acid ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตร Intermediate Standard oxolinic acid ที่ใช้ (ml)	ปริมาตรที่ปรับ ด้วย Mobile phase (ml)
0.00	-	-	-
0.02	1	0.10	5
0.06	1	0.30	5
0.10	10	0.05	5
0.20	10	0.10	5
0.24	10	0.12	5

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 5.00 ± 0.10 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml
2. เติมโซเดียมซัลเฟต 10 g เพื่อดูดซับน้ำในตัวอย่าง
3. เติม Ethyl acetate ปริมาตร 30 ml
4. นำไปปั่นด้วย homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน
5. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41 ลงในขวดกั่นกลมขนาด 100-250 ml
6. เติม Ethyl acetate ปริมาตร 30 ml ลงในตัวอย่างที่เหลือในบีกเกอร์ขนาด 100 ml (สกัดซ้ำ)
7. นำไป homogenizes จนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง และกรองผ่านกระดาษกรองตามข้อ 5.
8. ระเหย Ethyl acetate ด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C จนแห้ง
9. ละลาย residue ที่ระเหยแห้งด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml และ n-Hexane ปริมาตร 1 ml (อาจนำไป sonicate เพิ่มเติมเพื่อให้ละลายได้ดีขึ้น) จากนั้นเทสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอด centrifuge
10. นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 5 นาที

11. ใช้ Pasture pipette ดูดสารละลายชั้นบนที่เป็น n-Hexane (เป็นชั้นไขมันมีลักษณะสีส้ม) ที่ นำสารละลายส่วนที่เหลือไปกรองผ่าน Hyperclean syringe filter 0.20 μm เก็บสารละลายใน vial สำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC

Condition ของเครื่อง HPLC

Flow rate : 1 ml / min ระบบ Isocratic mode

Detector : Fluorescence ที่ EX 327 nm, EM 369 nm

Mobile phase : Acetonitrile: 0.01 M Oxalic acid (pH 3.3) = 30:70

Injection volume: 100 μl

Run time : 8 นาที

หมายเหตุ: สามารถปรับ condition ได้ตามสภาวะของเครื่อง

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 1.2 การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ Oxolinic acid

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การทดสอบ System Suitability	ทุกครั้งที่ทดสอบ	% RSD ของ RT และ Peak area $\leq 1\%$ ($n \geq 5$)
2. การสร้าง Standard calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
3. การทดสอบ Reagent Blank	อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ใน 1 ชุดทดสอบ	ค่า Reagent Blank น้อยกว่า LOD
4. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80-110%
5. การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% RPD $\leq 10\%$
6. การทดสอบ Blank (Mobile phase)	อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ใน 1 ชุดทดสอบ	ไม่พบสัญญาณ Peak ที่สนใจ
7. การทดสอบ Standard 0.10 $\mu\text{g/ml}$ ปิดท้ายหลังการฉีดตัวอย่าง	ทุกครั้งที่ทดสอบ	Retention Time อยู่ในช่วง ± 0.50 นาที และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน % RPD $\leq 10\%$

[illegible]

2. วิธีวิเคราะห์ Tetracycline group (Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline) โดยเทคนิค HPLC

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Oxytetracycline, Tetracycline และ Chlortetracycline ใน
สัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

A.O.A.C.Official Method. 995.09. 2016. Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in
Edible Animal Tissues: Liquid Chromatographic method. pp 4.

หลักการ

ตัวอย่างถูกสกัดด้วย McIlvaine Buffer (pH 4) โดยนำส่วนที่สกัดได้มากรองและทำให้บริสุทธิ์
ผ่าน SPE C18 แล้วชะออก (Elute) ด้วย Methanol นำมาวิเคราะห์ปริมาณ โดยใช้ Detector ชนิด
Fluorescence ที่ความยาวคลื่น Excitation wavelength (EX) 380 nm , Emission wavelength (EM)
520 nm.

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. Columns : Symmetry , ขนาด C 8 , 5 μm ., 3.9 x 150 mm
3. Guard Column Symmetry C 18, 5 μm , 3.9 x 20 mm
4. เครื่องชั่ง ความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และ 0.0001 g
5. เครื่อง Centrifuge
6. เครื่อง Manifold สำหรับต่อกับ SPE เพื่อกรองสารละลายตัวอย่าง
7. เครื่อง Homogenizer
8. เครื่อง pH meter
9. เครื่อง Rotary evaporator

10. เครื่อง Vortex mixer
11. เครื่อง Ultrasonic bath
12. ชุดกรอง Mobile Phase ต่อกับ Vacuum pump
13. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 cm
14. หลอด Centrifuge ขนาด 50 ml ชนิด polypropylene
15. ปิเปต ชนิด Auto pipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L และ 5 ml
16. ขวดวัดปริมาตรชนิดเกรด A ขนาด 5, 10, 100, 500 และ 1000 ml
17. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 , 500 และ 1000 ml
18. Hyperclean Syringe Filter 0.2 μ m ชนิด Nylon membrane เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm
19. SPE (Solid Phase Extraction) cartridges : 3 ml (C18)
20. Round Bottom Flask ขนาด 250 ml
21. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
22. กระบอกฉีดยา ขนาด 10 ml
23. Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μ m

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Oxytetracycline hydrochloride ($C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$)
2. สารมาตรฐาน Tetracycline hydrochloride ($C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$)
3. สารมาตรฐาน Chlortetracycline hydrochloride ($C_{22}H_{23}ClN_2O_8 \cdot HCl$)
4. di-Sodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), AR grade
5. Citric Acid monohydrate, AR grade
6. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA), AR grade
7. Magnesium acetate tetrahydrate , AR grade
8. Imidazole, AR grade
9. Methanol, HPLC grade
10. Acetic acid Glacial, AR grade
11. Hydrochloric acid 0.1 N
 ปิเปต Hydrochloric acid 0.84 ml ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) ปรับปริมาตรเป็น 100 ml
12. Methylene chloride , AR grade

13. Acetonitrile, HPLC grade

14. McIlvaine Buffer (pH 4.0 ± 0.05)

14.1 ละลาย Citric Acid Monohydrate 21 g ด้วย DI และปรับปริมาตรเป็น 1000 ml
เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

14.2 ละลาย di-Sodium hydrogen phosphate heptahydrate 17.2 g ด้วย DI ปรับ
ปริมาตรให้ได้ 600 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับ pH ให้ได้ pH 4.0 ± 0.05 ด้วย Citric
Acid Monohydrate

14.3 ละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA) ตาม
อัตราส่วน ดังนี้

$$\text{Na}_2\text{EDTA (g)} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายข้อ 14.2 ภายหลังจากปรับ pH (ml)} \times 37.224 \text{ g Na}_2\text{EDTA}}{1000}$$

เช่น ปริมาตรสารละลายข้อ 14.2 ภายหลังจากปรับ pH ได้เท่ากับ 1200 ml ดังนั้น

$$\text{ปริมาณสาร Na}_2\text{EDTA ที่ใช้} = \frac{1200 \text{ ml} \times 37.224 \text{ g}}{1000} = 44.669 \text{ g}$$

1000

14.4 ผสมสาร Na_2EDTA ข้อ 14.3 และข้อ 14.2 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ
ตู้เย็น $2-8^\circ\text{C}$ นาน 1 เดือน

15. Mobile phase

15.1 ละลาย Imidazole 34.04 g, และ Magnesium acetate tetrahydrate 5.36 g
และ Disodiummethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA) 0.20 g ด้วย DI และ
ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย Glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml ด้วย DI

15.2 ละลายสารตามข้อ 15.1 ด้วย Methanol และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 85 : 10 : 5
นำไปกรองและ degassed นาน 10 นาที ก่อนใช้งาน

16. Stock Standard

16.1 Stock Oxytetracycline standard 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Standard Oxytetracycline hydrochloride $0.0113 \pm 0.0005 \text{ g}$ ด้วย
Methanol 10 ml คนให้ Standard ละลายปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 0.1 N HCl เขย่าให้สารละลาย
เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$ นาน 6 เดือน

16.2 Stock Tetracycline standard 100 µg/ml

ละลาย Standard Tetracycline hydrochloride 0.0110 ± 0.0005 g ด้วย Methanol 10 ml คนให้ Standard ละลายปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 0.1 N HCl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 6 เดือน

16.3 Stock Chlortetracycline standard 100 µg/ml

ละลาย Standard Chlortetracycline hydrochloride 0.0118 ± 0.0005 g ด้วย Methanol 10 ml คนให้ Standard ละลายปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 0.1 N HCl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 6 เดือน

หมายเหตุ : การเตรียม Stock standard จะนำ % ความบริสุทธิ์ของสารมาคิดและจะเปลี่ยนแปลงตาม % ความบริสุทธิ์ของสารในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

17. Intermediate standard 10 µg/ml (Oxytetracycline)

เจือจาง stock standard 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย Mobile phase เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

18. Intermediate Mix Standard 10 µg/ml (Tetracycline และ Chlortetracycline)

เจือจาง stock standard 100 µg/ml ตามข้อ 16.2 และ 16.3 ปริมาตรชนิดละ 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย Mobile phase เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

19. Intermediate standard 2 µg/ml (Oxytetracycline)

เจือจาง stock standard 100 µg/ml ปริมาตร 0.20 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

20. Intermediate Mix standard 2 µg/ml (Tetracycline และ Chlortetracycline)

เจือจาง stock standard 100 µg/ml ตามข้อ 16.2 และ 16.3 ปริมาตรชนิดละ 0.20 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

21. Working standard (Oxytetracycline Tetracycline และ Chlortetracycline) ที่ระดับ 0.00, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.20, 0.30 µg/ml

21.1 Working standard 0.00 µg/ml

ใช้ Mobile phase

21.2 Working standard Oxytetracycline 0.02 µg/ml และ Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 0.02 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard Oxytetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 10 µl และ Intermediate Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 10 µl ด้วย Mobile phase ปรับปริมาตรเป็น 5 ml และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (แยกเตรียม Standard)

21.3 Working standard Oxytetracycline 0.04 µg/ml และ Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 0.04 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard Oxytetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 20 µl และ Intermediate Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 20 µl ด้วย Mobile phase ปรับปริมาตรเป็น 5 ml และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (แยกเตรียม Standard)

21.4 Working standard Oxytetracycline 0.08 µg/ml และ Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 0.08 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard Oxytetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 40 µl และ Intermediate Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 40 µl ด้วย Mobile phase ปรับปริมาตรเป็น 5 ml และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (แยกเตรียม Standard)

21.5 Working standard Oxytetracycline 0.10 µg/ml และ Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 0.10 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard Oxytetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 50 µl และ Intermediate Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 50 µl ด้วย Mobile phase ปรับปริมาตรเป็น 5 ml และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (แยกเตรียม Standard)

21.6 Working standard Oxytetracycline 0.20 µg/ml และ Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 0.20 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard Oxytetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 100 µl และ Intermediate Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 100 µl ด้วย Mobile phase ปรับปริมาตรเป็น 5 ml และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (แยกเตรียม Standard)

21.7 Working mix standard Oxytetracycline 0.30 µg/ml และ Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 0.30 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard Oxytetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 150 µl และ Intermediate Mix standard Tetracycline & Chlortetracycline 10 µg/ml ปริมาตร 150 µl ด้วย Mobile phase ปรับปริมาตรเป็น 5 ml และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (แยกเตรียม Standard)

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 5.00 ± 0.10 g ใส่ในหลอด Centrifuge ขนาด 50 ml
2. เติม Methylene chloride ปริมาตร 3 ml ในตัวอย่างกึ่ง (สำหรับตัวอย่างปลา เติม Methylene chloride ปริมาตร 5 ml)
3. เติม McIlvaine Buffer pH 4.0 ± 0.05 ปริมาตร 20 ml
4. ปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Homogenizer จากนั้นปรับปริมาตรด้วย McIlvaine Buffer pH 4.0 ให้ได้ 45 ml
5. Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 8 นาที
6. เทส่วนใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายตัวอย่างในปิเก็ตเจอร์ ขนาด 100 ml
7. ทำซ้ำขั้นตอนข้อ 2 ถึง ข้อ 6
8. เตรียม SPE C18 ต่อกับเครื่อง Manifold
 - 8.1 Pre- wash SPE C18 (Activate Cartridge) ด้วย Methanol 10 ml และตามด้วย DI 10 ml
 - 8.2 นำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดในข้อ 7 ผ่าน SPE C18 (ระวังอย่าให้ Cartridge แห้งสนิท)
 - 8.3 ทำการชะ (Elute) สารละลายตัวอย่างที่ผ่าน Cartridge ด้วย Methanol 10 ml โดยรองรับสารละลายที่ได้ด้วย Round Bottom Flask
9. ระเหยสารละลายให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C
10. ละลาย Residues ใน Round Bottom Flask ด้วย mobile phase ปริมาตร 5 ml แล้วนำไปช่วยละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath
11. กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย Hyperclean Syringe Filter ขนาด $0.2 \mu\text{m}$
12. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

Condition ของเครื่อง HPLC

Flow rate: 1.00 ml/min ระบบ Isocratic mode

Injection volume: 50 μl

Detector: Fluorescence; EX 380 nm and EM 520 nm

Mobile Phase: สารละลายข้อ 15 : Methanol : Acetonitrile (85 : 10 : 5)

Run time: 8 นาที (เฉพาะ Oxytetracycline) 20 นาที (รวมทั้ง 3 ชนิดสาร)

หมายเหตุ: สามารถปรับ condition ได้ตามสถานะของเครื่อง

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 2.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบTetracycline group

วิธีการควบคุมคุณภาพ ของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การทดสอบ System Suitability	ทุกครั้งที่ทดสอบ	% RSD ของ Retention time $\leq 1\%$, Peak Area $\leq 1\%$, Number of theoretical plates > 700 , Tailing factor ≤ 2 และ Resolution > 1.5 ($n \geq 5$)
2. การสร้าง Standard calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
3. การทดสอบ Reagent Blank	อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ใน 1 ชุดทดสอบ	ค่า Reagent Blank น้อยกว่า LOD
4. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5 % ของตัวอย่าง (หากตัวอย่างมากกว่าหรือน้อย กว่า 5% ให้ทำเพิ่ม 1 ตัวอย่าง)	% Recovery อยู่ในช่วง 70-120%
5. การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% RPD $\leq 10\%$
6. การทดสอบ Blank (Mobile phase)	อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ใน 1 ชุดทดสอบ	ไม่พบสัญญาณ Peak ที่สนใจ
7. การทดสอบ Standard 0.20 $\mu\text{g/ml}$ ปิดท้าย หลังการฉีดตัวอย่าง	ทุกครั้งที่ทดสอบ	Retention Time อยู่ในช่วง ± 0.50 นาที และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน % RPD $\leq 10\%$

การคำนวณผล

คำนวณ ความเข้มข้น Tetracycline group ($\mu\text{g/g}$) = $(C \times E \times V) / (D \times W)$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการเทียบ calibration curve ($\mu\text{g/ml}$)

V = ปริมาตรสุดท้ายที่เตรียมตัวอย่าง (ml)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ Tetracycline group ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยที่

- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่าน้อยกว่าค่า LOQ
- ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

α α

3. วิธีวิเคราะห์ Fluoroquinolones group โดยเทคนิค LC-MS/MS

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาในกลุ่ม Fluoroquinolones ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Delephine, B. and D. Hurtaud-Pessel. 2004. Presentation of Liquid-chromatography/Tandem Mass-spectrometry ; Screening Method for Identification Residues of Antibiotics in Meat. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (afssa). France. pp. 12.

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยสารละลายที่มีความเป็นกรด คือ 5% TCA โดยเทคนิค Liquid-Liquid Extraction นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงจนได้สารละลายส่วนใส กรองด้วย Syringe filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง LC-MS/MS
2. เครื่องชั่ง ความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01g, 0.001 g และ 0.0001 g
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง Centrifuge
4. เครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Vortex Mixer) และ เครื่องเขย่าแบบ Shaker
5. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 50 ml ชนิด Polypropylene มีขีดบอกปริมาตร
6. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ชนิดเกรด A ขนาด 10, 500 และ 1,000 ml
7. ปิเปต ชนิด Autopipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L และ 1 - 10 ml
8. บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, และ 100 ml
9. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
10. หลอดทดลอง (Siliconised glass test tube) ขนาด 75 x 12 mm

11. Filter membrane ความละเอียด 0.45 ไมครอน
12. Syringe Filter ความละเอียด 0.2 ไมครอน
13. Column CLYPEUS C18 5 μm , 150 x 3.0 mm. และ Guard Column Haicart Higgin Clipeus C18 5 μm , 25 x 3.2 mm

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Difloxacin hydrochloride ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$)
2. สารมาตรฐาน Enrofloxacin ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$)
3. สารมาตรฐาน Ciprofloxacin hydrochloride ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$)
4. สารมาตรฐาน Norfloxacin ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$)
5. สารมาตรฐาน Flumequine ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FNO}_3$)
6. สารมาตรฐาน Sarafloxacin hydrochloride hydrate ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$)
7. สารมาตรฐาน Danofloxacin ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3$)
8. สารมาตรฐาน Oxolinic acid ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$)
9. Formic acid, AR grade
10. Acetonitrile, HPLC grade
11. Dimethyl Sulfoxide ,AR grade
12. Methanol, HPLC grade
13. Trichloroacetic acid, AR grade
14. 5% TCA

ละลาย Trichloroacetic acid 25 g ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) ปริมาตร 500 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)
15. 50% Acetonitrile

ตวง Acetonitrile ปริมาตร 50 ml ผสมกับ DI ปริมาตร 50 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
16. Stock Standard Solution: Difloxacin (DIF), Enrofloxacin (ENRO), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Flumequine (FLU), Sarafloxacin (SARA) และ Danofloxacin (DANO) : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - 16.1 ละลาย Difloxacin 0.0111 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน
 - 16.2 ละลาย Enrofloxacin 0.0101 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

16.3 ละลาย Ciprofloxacin 0.0118 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

16.4 ละลาย Norfloxacin 0.0101 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

16.5 ละลาย Flumiquine 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

16.6 ละลาย Sarafloxacin 0.0118 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

16.7 ละลาย Danofloxacin 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

หมายเหตุ : การเตรียม Stock Standard จะนำเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาคิดและจะเปลี่ยนแปลงตามเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

17. Mixed Standard 10 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Stock Standard 100 $\mu\text{g/ml}$ (ข้อ 16.1 – 16.7) อย่างละ 1000 μl ละลายด้วย 5% TCA ปรับปริมาตรเป็น 10 ml เขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

18. Mixed Standard 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Mixed Standard 10 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1000 μl ละลายด้วย 5% TCA ปรับปริมาตรเป็น 10 ml เขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

19. Mixed Standard 0.1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Mixed Standard 1 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1000 μl ละลายด้วย 5% TCA ปรับปริมาตรเป็น 10 ml เขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

20. Stock Internal Standard: Oxolinic acid 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Oxolinic acid 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Dimethyl sulfoxide 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 50% Acetonitrile 100 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

21. Internal Standard: Oxolinic acid 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Oxolinic acid 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ละลายด้วย 5% TCA ปรับปริมาตรเป็น 10 ml เขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

22. 0.001 M Oxalic acid: 0.2% Formic acid (Mobile Phase A)

ละลาย Oxalic acid 0.126 กรัม ด้วย DI แล้วเติม Formic acid 2 ml ปรับปริมาตรด้วย DI เป็น 1000 ml เขย่าให้เข้ากัน และนำไปกรองผ่าน Filter membrane แล้วทำการ Degassed ประมาณ 10 นาที ก่อนนำไปใช้

23. Acetonitrile, HPLC grade (Mobile Phase B)

นำ Acetonitrile 1000 ml กรองผ่าน Filter membrane แล้วทำการ Degassed ประมาณ 10 นาที ก่อนนำไปใช้

การเตรียม Mixed Matrix Standard Calibration Curve

เตรียม Mixed Matrix Standard Calibration Curve : DIF, ENRO, CIP, NOR, FLU, SARA และ DANO ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.30, 0.60 และ 1.00 µg/g ใน Negative sample น้ำหนัก 2.00 ± 0.10 g ตามตารางที่ 1 และทำการสกัดเหมือนตัวอย่างปกติตามวิธีการเตรียมตัวอย่าง

ตารางที่ 3.1 Mixed Matrix Standard Calibration Curve ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.30, 0.60 และ 1.00 µg/g

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการ (µg/g)	ปริมาตรของ Oxolinic acid 1 µg/ml (µl)	ปริมาตรของ Mixed Standard Solution ความเข้มข้น 0.1 ug/ml (µl)	ปริมาตรของ Mixed Standard Solution ความเข้มข้น 1 µg/ml (µl)	ปริมาตรของ Mixed Standard Solution ความเข้มข้น 10 µg/ml (µl)
0	200	-	-	-
0.005	200	100	-	-
0.010	200	200	-	-
0.050	200	-	100	-
0.100	200	-	200	-
0.300	200	-	-	60
0.600	200	-	-	120
1.000	200	-	-	200

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 2.00 ± 0.10 g ในหลอด Centrifuge ฝาเกลียวชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml และเติม Internal Standard Oxolinic acid $1 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 200 μl ในตัวอย่าง
2. เติม DI ปริมาตร 1 ml ลงในตัวอย่าง นำไปเขย่าให้เข้ากัน และเติม 5% TCA ปริมาตร 8 ml นำไปเขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง
3. นำสารละลายตัวอย่างที่ได้เขย่าด้วยเครื่อง Shaker นาน 10 นาที
4. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm นาน 10 นาที
5. นำส่วนใสที่ได้ กรองผ่าน Syringe filter ขนาด $0.20 \mu\text{m}$ เก็บใน vial ขนาด 1 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

Condition ของเครื่อง LC

Flow rate: 0.6 mL/min

Injection volume: 20 μl

Run time: 10 นาที

หมายเหตุ: สามารถปรับ condition ได้ตามสถานะของเครื่อง

ตารางที่ 3.2 ระบบ Gradient Mode

Time (min)	%A	%B
	(0.001 M Oxalic acid : 0.2%Formic acid)	(Acetonitrile)
0	90	10
5	15	85
7	15	85
8	90	10
10	90	10

Mass Condition:

FUNCTION ONE : DIF : 400 > 356, 400 > 299 (base)

FUNCTION TWO : ENRO : 360 > 324, 360 > 316 (base)

FUNCTION THREE : CIP : 332 > 314, 332 > 231 (base)

FUNCTION FOUR : NOR : 320 > 302, 320 > 276 (base)

FUNCTION FIVE : FLU : 262 > 244, 262 > 202 (base)

FUNCTION SIX : SARA : 386 > 342, 386 > 299 (base)

FUNCTION SEVEN : DANO: 358 > 340, 358 > 82 (base)

FUNCTION FOR INTERNAL STANDARD : OXO : 262 > 216

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 3.3 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Fluoroquinolone group

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. ทดสอบความเหมาะสมของระบบ (System Suitability) ด้วยสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.10 µg/g	1 ครั้ง/ชุดทดสอบ	ค่า Ion Ratio ของสารมาตรฐานอยู่ในช่วง %RSD ≤ 20 (n ≥ 3)
2. การสร้าง Calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า r ≥ 0.995
3. การทดสอบ Fortified sample และการทดสอบตัวอย่าง 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5% ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80 - 110 %, RPD ≤ 30%
4. การทดสอบตัวอย่าง 2 ซ้ำ (Duplicate Sample)	1 ชุดต่อครั้ง การทดสอบ	RPD ≤ 30%
5. การทดสอบ Reagent blank	1 ครั้ง / ชุดทดสอบ	ค่าที่ได้ < LOD

การคำนวณผล

1. การคำนวณ Ion ratio (R)

$$R = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Secondary ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion}}$$

2. ความแตกต่างของ ion ratio (ΔR)

$$\Delta R = \frac{R \text{ sample} - R \text{ mean}}{R \text{ mean}} \times 100$$

โดย R sample = ion ratio ของสารที่สนใจที่พบในตัวอย่าง

R mean = ion ratio เฉลี่ยของสารที่สนใจที่มีอยู่ในสารมาตรฐาน

3. การคำนวณ Response Factor (RF)

$$RF = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion ของสารที่สนใจ} \times \text{ความเข้มข้นของ internal standard ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Internal standard ion}}$$

4. ปริมาณสารที่สนใจที่พบในตัวอย่าง (X)

$$X = \frac{RF - b}{a}$$

โดย X = ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่มีอยู่ในตัวอย่าง ($\mu\text{g/g}$)

a = ความชันของ calibration curve

b = จุดตัดแกน Y ของ Calibration curve

RF = Response factor ของ Primary ion

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ Fluoroquinolone group ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยที่

- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่าน้อยกว่าค่า LOQ
- ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

α α

4. วิธีวิเคราะห์ Sulfonamides group โดยเทคนิค LC-MS/MS

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาในกลุ่ม Sulfonamides group, Trimethoprim และ Ormetoprim ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Juhel-Gaugain M. and Hurtaud-Pessel D. 2007. Confirmation of Sulphonamide residues in Muscle and Milk by LC/MS/MS. LABORATOIRE D' ETUDES ET DE RECHERCHES SUR LES MEDICAMENTS VETERINAIRES ET LES DESINFECTANTS (afssa). France. pp 10.

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยสารละลาย Acetonitrile และน้ำกลั่น จากนั้นนำตัวอย่างไประเหยแห้งและเติมสารละลาย 0.2% Formic acid : Acetonitrile ในอัตราส่วน 9:1 เป็นตัวทำละลาย ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง LC-MS/MS
2. LC Columns : Mightysil RP-18 GP, 3 μ m, 150 x 2.0 mm., Guard Cartridges
Hypersil Gold drop in, 5 μ m, 10 x 3 mm.
3. เครื่องชั่ง ความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 กรัม และ 0.0001 กรัม
4. เครื่อง Centrifuge
5. เครื่อง Vortex mixer
6. เครื่อง Shaker
7. เครื่องระเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน
8. Ultrasonic bath
9. หลอดพลาสติกชนิด polypropylene มีฝาเกลียวและขีดบอกปริมาตร ขนาด 50 ml
10. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ชนิดเกรด A ขนาด 5, 10, 100, 500, 1000 ml

11. ปิเปต ชนิด Autopipette ขนาด 20-200 μl , 100-1000 μl และ 1-10 ml
12. บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100 และ 500 ml
13. หลอดทดลองแก้ว (Test tube) ขนาด 20 x 150 mm และขนาด 13 x 100 mm
14. Hyperclean Syringe Filter ขนาด 0.20 μm ., เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm. ชนิด Nylon membrane
15. Nylon membrane filters ขนาด 0.45 μm ., เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm.
16. Insert Vial ขนาด 400 ml
17. ชุดกรอง Mobile Phase ต่อกับ Vacuum pump

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Trimethoprim (TMP) ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$)
2. สารมาตรฐาน Ormetoprim (OMP) ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$)
3. สารมาตรฐาน Sulfadiazine (SDZ) ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$)
4. สารมาตรฐาน Sulfathiazole (STZ) ($\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$)
5. สารมาตรฐาน Sulfamerazine (SME) ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$)
6. สารมาตรฐาน Sulfamethazine (SMT) ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$)
7. สารมาตรฐาน Sulfamonomethoxine (SMM) ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$)
8. สารมาตรฐาน Sulfadimethoxine (SDM) ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$)
9. Internal Standard Sulfamethazine-d4 (benzene-d4) ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{D}_4\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$)
10. Internal Standard Sulfadiazine-d4 (benzene-d4) ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{D}_4\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$)
11. Internal Standard Trimethoprim-d3 (4-methoxy-d3) ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{D}_3\text{N}_4\text{O}_3$)
12. Acetonitrile HPLC grade
13. Methanol HPLC grade
14. Formic acid HPLC grade
15. Hexane AR grade

การเตรียมสารเคมี

1. 0.2% Formic acid (Mobile Phase A)

เจือจาง Formic acid 1 ml ด้วย DI ปริมาตร 500 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกรองผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm และนำไป Degassed นาน 10 นาที (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

2. 100% Acetonitrile (Mobile Phase B)

นำ Acetonitrile ไปกรองผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm และนำไป Degassed นาน 10 นาที (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

3. 0.2% Formic acid: Acetonitrile ในอัตราส่วน 9:1

ปิเปต Acetonitrile 10 ml ผสมกับ 0.2% Formic acid ปริมาตร 90 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. Stock standard Trimethoprim 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Trimethoprim 0.0100 $\pm$ 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 3 เดือน

2. Stock standard Ormetoprim 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Ormetoprim 0.0101 $\pm$ 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 3 เดือน

3. Stock standard Sulfadiazine 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Sulfadiazine 0.0101 $\pm$ 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 3 เดือน

4. Stock standard Sulfathiazole 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Sulfathiazole 0.0100 $\pm$ 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 3 เดือน

5. Stock standard Sulfamerazine ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Sulfamerazine 0.0100 $\pm$ 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 3 เดือน

6. Stock standard Sulfamethazine 100 µg/ml

ละลาย Sulfamethazine 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 3 เดือน

7. Stock standard Sulfamonomethoxine 100 µg/ml

ละลาย Sulfamonomethoxine 0.0102 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 3 เดือน

8. Stock standard Sulfadimethoxine 100 µg/ml

ละลาย Sulfadimethoxine 0.0102 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 3 เดือน

หมายเหตุ : การเตรียม Stock standard solution จะนำค่า % ความบริสุทธิ์มาคิดและจะเปลี่ยนแปลงตาม % ความบริสุทธิ์ของสารจากใบรับรอง (Certificate) ในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

9. Intermediate mixed standard 10 µg/ml

ปิเปต Stock standard 100 µg/ml อย่างละ 1000 µl ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

10. Working mixed standard 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 µg/ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

10.1 Working mixed standard 0 µg/ml

ใช้ Methanol เป็น Working mixed standard solution ความเข้มข้น 0 µg/ml

10.2 Working mixed standard 0.2 µg/ml

ปิเปต Intermediate mixed standard 10 µg/ml ปริมาตร 100 µl ปรับปริมาตร 5 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.3 Working mixed standard 0.5 µg/ml

ปิเปต Intermediate mixed standard 10 µg/ml ปริมาตร 250 µl ปรับปริมาตร 5 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.4 Working mixed standard 1.0 µg/ml

ปิเปต Intermediate mixed standard 10 µg/ml ปริมาตร 500 µl ปรับปริมาตร 5 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.5 Working mixed standard 2.0 µg/ml

ปิเปต Intermediate mixed standard 10 µg/ml ปริมาตร 1000 µl ปรับปริมาตร 5 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.6 Working mixed standard solution 3.0 µg/ml

ปิเปต Intermediate mixed standard 10 µg/ml ปริมาตร 1500 µl ปรับปริมาตร 5 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.7 Working mixed standard 5.0 µg/ml

ปิเปต Intermediate mixed standard 10 µg/ml ปริมาตร 2500 µl ปรับปริมาตร 5 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

11. Stock Internal standard Trimethoprim-d₃ 1000 µg/ml

ละลาย Trimethoprim-d₃ 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Methanol 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส นาน 1 ปี

12. Stock Internal standard Sulfadiazine-d₄ 1000 µg/ml

ละลาย Sulfadiazine-d₄ 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Methanol 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส นาน 1 ปี

12.1 Intermediate Internal standard Sulfadiazine-d₄ 100 µg/ml

ปิเปต Stock Internal standard Sulfadiazine-d₄ 1000 µg/ml ปริมาตร 1000 µl ปรับปริมาตร 10 ml ด้วย Methanol เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

13. Stock Internal standard Sulfamethazine-d₄ 1000 µg/ml

ละลาย Sulfamethazine-d₄ 0.0100 ± 0.0005 g ด้วย Methanol 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส นาน 1 ปี

13.1 Intermediate Internal standard Sulfamethazine-d₄ 100 µg/ml

ปิเปต Stock Internal standard Sulfamethazine-d₄ 1000 µg/ml ปริมาตร 1000 µl ละลายด้วย Methanol 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส นาน 1 ปี

14. Stock Internal standard Trimethoprim-d₃ 100 µg/ml

ปิเปต Stock Internal standard Trimethoprim-d₃ 1000 µg/ml ปริมาตร 1000 µl ละลายด้วย Methanol 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

15. Working mixed Internal standard 1 µg/ml

ปิเปต Stock Internal standard Trimethoprim-d₃ 100 µg/ml, Stock Internal standard Sulfadiazine-d₄ 100 µg/ml และ Stock Internal standard Sulfamethazine-d₄ 100 µg/ml อย่างละ 100 µl ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 2.00 ± 0.10 g ใส่ลงในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 50 ml
2. เติม Working mixed Internal standard 1 µg/ml ปริมาตร 200 µl ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
3. เติม DI ปริมาตร 1000 µl แล้วนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Vortex Mixer 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
4. เติม Acetonitrile ปริมาตร 8 ml นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Shaker นาน 10 นาที
5. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 15 นาที
6. ปิเปตสารละลายส่วนใส 6 ml ในหลอดทดลอง นำไประเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน 60 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง
7. ละลายกลับด้วยสารละลาย 0.2% Formic acid: Acetonitrile ในอัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 600 µl
8. เติม Hexane ปริมาตร 1000 µl นำไปละลายด้วย Ultrasonic bath นาน 1 นาที
9. เทสารละลายในหลอดทดลอง นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm นาน 10 นาที
10. ดูดสารละลายชั้นบนที่นำสารละลายตัวอย่างที่เหลือมากรองด้วย Hyperclean nylon filter ขนาด 0.2 µm เก็บใน Vial
11. ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การเตรียม Matrix mixed standard calibration curve

ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.50 $\mu\text{g/ml}$ โดย ปิเปต Working mixed standard ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ใน negative sample น้ำหนัก 2.00 ± 0.10 g ตามตารางที่ 1 ทำตามขั้นตอนเดียวกับการเตรียมตัวอย่างทดสอบ ตั้งแต่ข้อ 1-11

ตารางที่ 4.1 การเตรียม Matrix mixed standard calibration curve ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ Matrix mixed standard calibration curve ($\mu\text{g/g}$)	ความเข้มข้นของ Working mixed standard solution ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตรของ Working mixed standard solution (μl)	ปริมาตรของ 1 $\mu\text{g/ml}$ Working mixed Internal standard (μl)
0	0	200	200
0.02	0.20	200	200
0.05	0.50	200	200
0.10	1.00	200	200
0.20	2.00	200	200
0.30	3.00	200	200
0.50	5.00	200	200

Condition ของเครื่อง LC

Column oven	:	$30 \pm 10^\circ\text{C}$
Injection volume	:	20 μl
Flow rate	:	0.2 ml/min
Run time	:	15 นาที
Mobile Phase A	:	0.2% Formic acid in deionized Water
Mobile Phase B	:	100% Acetonitrile HPLC grade

ตารางที่ 4.2 แสดงระบบ Gradient mode ของเครื่อง LC

Step	Total time (min)	Flow rate (ml/min)	0.2% Formic acid (%)	100%Acetonitrile (%)
1	0.00	0.20	95	5
2	1.00	0.20	95	5
3	3.00	0.20	60	40
4	4.00	0.20	10	90
5	8.50	0.20	10	90
6	9.00	0.20	95	5
7	15.00	0.20	95	5

หมายเหตุ : Condition อาจมีการปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสม

การคำนวณผล

1. การคำนวณ Ion ratio (R)

$$R = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Secondary ion}}$$

2. การคำนวณความแตกต่าง ion ratio

$$(\Delta R) = \frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{mean}}}{R_{\text{mean}}} \times 100$$

โดย R_{sample} = ion ratio ของสารที่สนใจที่พบในตัวอย่าง

R_{mean} = ion ratio เฉลี่ยของสารที่สนใจที่มีอยู่ในสารมาตรฐาน

3. การคำนวณ Response Factor (RF)

$$RF = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion ของสารที่สนใจ} \times \text{ความเข้มข้นของ Internal standard ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Internal Standard ion}}$$

4. การคำนวณความเข้มข้นของ Sulfonamides group, Trimethoprim และ Ormetoprim ในตัวอย่าง โดยอ้างอิงจาก Standard Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน ซึ่งรายงานผลที่ได้เป็นหน่วย $\mu\text{g/g}$ โดยมีทศนิยม 3 ตำแหน่ง

$$x = \frac{RF - b}{a}$$

โดย

x	=	ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่มีอยู่ในตัวอย่าง ($\mu\text{g/g}$)
RF	=	Response Factor ของ Primary ion
a	=	ความชันของ Calibration curve
b	=	จุดตัดแกน y ของ Calibration curve

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ Sulfonamides group (SDZ, STZ, SME, SMT, SMM, SDM), Trimethoprim (TMP) และ Ormetoprim (OMP) ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยที่

- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่าน้อยกว่าค่า LOQ
- ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

Mass condition

Scan type : MRM

Mode : ES+

ตารางที่ 4.3 แสดง Mass range (m/z)

Compound	Parent ion > Primary ion Parent ion > Secondary ion
SDZ	250 > 155 250 > 108
STZ	255 > 155 255 > 108
SME	264 > 155 264 > 108
SMT	278 > 155 278 > 108
SMM	280 > 155 280 > 108
SDM	310 > 155 310 > 108
TMP	291 > 229 291 > 123
OMP	274 > 259 274 > 123
SMT-d4	285 > 124
SDZ-d4	254 > 124
TMP-d3	294 > 230

α α

5. วิธีวิเคราะห์ Nitrofuran group โดยเทคนิค LC-MS/MS

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Nitrofuran (metabolites) ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

McCracken, R. J. and Kennedy D.G. 1997. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. Journal of Chromatography B, 691. pp. 87-94.

หลักการ

สาร AOX (2-amino 2 – oxazolidinone), AMOX (3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-one), AHD (1-aminohydantoin) และSEM (Semicarbazide) ซึ่งเป็น Metabolites ของ Furazolidone, Furaltadone, Nitrofurazone และ Nitrofurantoin นั้น ถูก hydrolysis ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้ส่วนของ Metabolites หลุดออกจากส่วนที่ Bound อยู่กับโปรตีนในตัวอย่าง พร้อมกับการเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ NPAOX, NPAMOX, NPAHD และ NPSEM โดยให้ทำปฏิกิริยากับ O-2-nitrobenzaldehyde ในขณะที่ตัวอย่างถูก Incubate ที่ 37 °C นานประมาณ 16 ชั่วโมง และสารดังกล่าวถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วย Ethyl acetate แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง LC-MS/MS
2. LC Columns : Mightysil RP-18 GP, 3 μ m, 150 x 2.0 mm., Guard Cartridges Hypersil Gold drop in, 5 μ m, 10 x 3 mm.
3. เครื่องชั่ง ความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และ 0.0001 g
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ช่วงใช้งาน 37 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส
5. เครื่อง Centrifuge
6. เครื่อง Micro-centrifuge

7. เครื่อง Vortex mixer
8. เครื่องระเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน
9. Ultrasonic bath
10. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml
11. Bottle flask สีชาและสีใส ขนาด 25, 50, 500 และ 1000 ml
12. ปิเปต ชนิด volumetric pipette เกรด A ขนาด 10 ml
13. ปิเปต ชนิด Autopipette ขนาด 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 40-200 μ l, 2-20 ml และ 1-5 ml
14. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml
15. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
16. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ชนิดเกรด A ขนาด 10, 25, 200, 250, 500, 1000 และ 2000 ml
17. หลอดทดลองแก้ว
18. Hyperclean syringe filter ขนาด 0.2 μ m
19. Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μ m
20. Insert Vial ขนาด 400 μ l และ Insert Spring Vial ขนาด 250 μ l
21. Vial สีชา และ Vial ใส ขนาด 2 ml
22. กระดาษวัด pH
23. ชุดกรอง Mobile phase ต่อกับ Vacuum pump

สารเคมี

1. 3-amino-2-oxazolidinone ($C_3H_6N_2O_2$) (AOZ)
2. 3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidine-2-one ($C_8H_{15}N_3O_3$) (AMOZ)
3. 1-aminohydantoin hydrochloride ($C_3H_5N_3O_2$) (AHD)
4. Semicarbazide hydrochloride ($CH_5N_3O.HCl$) (SEM)
5. Internal Standard D4-3-amino-2-oxazolidinone ($C_3H_2D_4N_2O_2$) (D4-AOZ)
6. Internal Standard D5-3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidine-2-one ($C_8H_{10}D_5N_3O_3$) (D5-AMOZ)

7. Internal Standard 1-Amino-imidazolidin-2,4-dione-[2,4,5- ^{13}C] ($^{13}\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$) ($^{13}\text{C}_3$ -AHD)
8. Internal Standard Semicarbazide hydrochloride- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ ($^{13}\text{CH}_6\text{CN}^{15}\text{N}_2\text{O}$) ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -SCA-HCL)
9. O-2-Nitrobenzaldehyde (2-NBA)
10. 1 M Hydrochloric acid
11. 1 M Sodium hydroxide
12. Di-potassium hydrogen phosphate trihydrate
13. Ethyl acetate, HPLC grade
14. Methanol, HPLC grade (และ Gradient grade)
15. Dimethyl sulfoxide
16. Ammonium acetate anhydrous

การเตรียมสารเคมี

1. 50 mM O-2-Nitrobenzaldehyde (2-NBA)
ละลาย 2-NBA 0.0378 ± 0.0005 g ด้วย Dimethyl sulfoxide 5 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)
2. 0.1 M Di-potassium hydrogen phosphate trihydrate ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
ละลาย $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 11.41 ± 0.10 g ด้วย DI 500 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)
3. 0.5 mM Ammonium acetate anhydrous (NH_4OAC)
ละลาย NH_4OAC 0.0385 ± 0.0005 g ด้วย DI 1000 ml (เก็บรักษานาน 1 สัปดาห์)
4. Mobile phase: ประกอบด้วย
 - 4.1 Ammonium acetate anhydrous : Methanol (80:20) (Mobile phase A)
ละลาย 0.5 mM NH_4OAC 800 ml กับ Methanol 200 ml ใน Volumetric flask ขนาด 1000 ml เขย่าให้ผสมเข้ากัน นำไปกรองผ่าน nylon filter ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ (เก็บรักษานาน 1 สัปดาห์)
 - 4.2 Methanol 100 % (Mobile phase B)
ตวง Methanol กรองผ่าน nylon filter ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ (เก็บรักษานาน 1 สัปดาห์)
 - 4.3 เตรียมสารละลาย Methanol: DI อัตราส่วน 50:50 หรือ 50 % Methanol

ตวง Methanol 100 ml ผสมกับ DI 100 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)

4.4 เตรียมสารละลาย Methanol: DI อัตราส่วน 75:25 หรือ 75 % Methanol

ตวง Methanol 150 ml ผสมกับ DI 50 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. Stock standard AOZ 1000 µg/ml

ละลาย AOZ 0.0251 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 1 ปี

2. Stock standard AMOZ 1000 µg/ml

ละลาย AMOZ 0.0251 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 1 ปี

3. Stock standard AHD 1000 µg/ml

ละลาย AHD 0.0251 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 1 ปี

4. Stock standard SEM 1000 µg/ml

ละลาย 0.0372 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 1 ปี

หมายเหตุ : การเตรียม Stock Standard Solution จะนำเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาคิด และจะเปลี่ยนแปลงตามเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

5. Intermediate standard AOZ 100 µg/ml

เจือจาง Stock standard AOZ 1000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 6 เดือน

6. Intermediate standard AMOZ 100 µg/ml

เจือจาง Stock standard AMOZ 1000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 6 เดือน

7. Intermediate standard AHD 100 µg/ml

เจือจาง Stock standard AHD 1000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 6 เดือน

8. Intermediate standard SEM 100 µg/ml

เจือจาง Stock standard SEM 1000 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 6 เดือน

9. Intermediate standard AOZ 10 µg/ml

เจือจาง Stock standard AOZ 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 3 เดือน

10. Intermediate standard AMOZ 10 µg/ml

เจือจาง Stock standard AMOZ 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 3 เดือน

11. Intermediate standard AHD 10 µg/ml

เจือจาง Stock standard AHD 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 3 เดือน

12. Intermediate standard SEM 10 µg/ml

เจือจาง Stock standard SEM 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 3 เดือน

13. Working mixed standard AOZ และ AMOZ 1 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard AOZ 10 µg/ml และ AMOZ 10 µg/ml แต่ละ Standard ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา รักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 1 เดือน

14. Working mixed standard AHD และ SEM 1 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard AHD 10 µg/ml และ SEM 10 µg/ml แต่ละ Standard ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C นาน 1 เดือน

15. Working mixed standard AOZ, AMOZ, AHD, SEM 10 ng/ml

เจือจาง Working mixed standard AOZ, AMOZ 1 µg/ml และ Working mixed standard solution AHD, SEM 1 µg/ml แต่ละ Standard mixture ปริมาตร 100 µl ปรับปริมาตรด้วย Methanol 10 ml เก็บในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 ° C เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน

การเตรียม Internal Standard

1. Stock internal standard D4-AOZ 1000 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง D4-AOZ 0.0251 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 1 ปี
2. Stock internal standard D5-AMAZ 1000 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง D5-AMAZ 0.0251 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 1 ปี
3. Stock internal standard $^{13}\text{C}_3$ -AHD 1000 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง $^{13}\text{C}_3$ -AHD 0.0253 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 1 ปี
4. Stock internal standard $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -SCA-HCL 1000 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -SCA 0.0370 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 25 ml เก็บใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 1 ปี
5. Intermediate internal standard D4-AOZ 100 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Stock standard D4-AOZ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน
6. Intermediate internal standard D5-AMAZ 100 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Stock standard D5-AMAZ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน
7. Intermediate internal standard $^{13}\text{C}_3$ -AHD 100 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Stock standard $^{13}\text{C}_3$ -AHD 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน
8. Intermediate internal standard $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -SCA 100 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Stock standard $^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2$ -SCA 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน
9. Intermediate internal standard D4-AOZ 10 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Intermediate standard D4-AOZ 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ นาน 6 เดือน

10. Intermediate internal standard D5-AMAZ 10 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard D5-AMAZ 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 3 เดือน

11. Intermediate internal standard ¹³C₃-AHD 10 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard ¹³C₃-AHD 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 3 เดือน

12. Intermediate internal standard ¹³C, ¹⁵N₂-SCA 10 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard ¹³C, ¹⁵N₂-SCA 100 µg/ml ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 3 เดือน

13. Working mixed internal standard D4-AOZ, D5-AMAZ, ¹³C₃-AHD, ¹³C, ¹⁵N₂-SCA 1 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard D4-AOZ 10 µg/ml, D5-AMAZ 10 µg/ml, ¹³C₃-AHD 10 µg/ml, ¹³C, ¹⁵N₂-SCA 10 µg/ml ของแต่ละ Intermediate standard ปริมาตร 1 ml ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C นาน 1 เดือน

14. Working mixed internal standard D4-AOZ, D5-AMAZ, ¹³C₃-AHD, ¹³C, ¹⁵N₂-SCA 10 ng/ml

เจือจาง Working mixed internal standard D4-AOZ, D5-AMAZ, ¹³C₃-AHD, ¹³C, ¹⁵N₂-SCA 1 µg/ml ปริมาตร 100 µl ด้วย Methanol ปรับปริมาตร 10 ml เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

การสกัดตัวอย่าง วิธี Tissue bound residue

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 1.00 ± 0.10 g ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml เติม Methanol : DI (50:50) ปริมาตร 6 ml และนำไป Vortex mixer นาน 1 นาที

2. นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm นาน 15 นาที ใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายตัวอย่างใสด้านบนทิ้งไป

3. เติม Methanol : DI (75:25) ปริมาตร 6 ml นำไป Vortex นาน 2 นาที

4. นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 rpm นาน 15 นาที ใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายตัวอย่างใสด้านบนทิ้งไป

5. เติม Methanol ปริมาตร 6 ml นำไป Vortex นาน 2 นาที และนำไปเหวี่ยงตกตะกอน ด้วยความเร็ว 4,500 rpm นาน 15 นาที

6. ใช้ Pasture pipette ดูดสารละลายตัวอย่างใสด้านบนทิ้งไป และเติม DI ปริมาตร 6 ml นำไป Vortex นาน 2 นาที

7. นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 rpm นาน 15 นาที และใช้ Pasture pipette ดูดสารละลายตัวอย่างใสด้านบนทิ้งไปทำตามขั้นตอน ข้อ 2 (การสกัดตัวอย่างรูป Total residue)

การสกัดตัวอย่าง ในรูป Total residue

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 1.00 ± 0.10 g ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml

2. เติม DI ปริมาตร 4 ml, เติม 1 M Hydrochloric acid ปริมาตร 500 μ l, เติม 50 mM 2-NBA ปริมาตร 150 μ l และ Working mixed internal standard 10 ng/ml ปริมาตร 100 μ l นำไปผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer

3. นำไปบ่มใน Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ± 2 ชั่วโมง

4. หลังจากครบ 16 ± 2 ชั่วโมงแล้ว นำมาเติมสารละลาย 0.1 M Di-potassium hydrogen phosphate trihydrate ปริมาตร 5 ml และสารละลาย 1M Sodium hydroxide ปริมาตร 400 μ l ผสมเข้ากันด้วย Vortex mixer และตรวจสอบค่า pH ด้วยกระดาษวัด pH ให้ได้ pH ประมาณ 7

5. เติม Ethyl acetate ปริมาตร 5 ml เขย่าช้าๆ นาน 1 นาที และนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 rpm นาน 15 นาที

6. ดูดสารละลายตัวอย่างด้านบนในหลอดทดลอง หลังจากนั้นทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติมสารละลาย Ethyl acetate อีกครั้ง

7. นำไประเหยให้แห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$

8. เติมสารละลายผสมระหว่าง Methanol: DI ที่อัตราส่วน 50:50 ปริมาตร 400 μ l นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Ultrasonic bath และนำไป Vortex ประมาณ 30 วินาที

9. เทสารละลายลงใน micro-centrifuge tube นำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง Microcentrifuge ความเร็วรอบ 7,000 rpm นาน 10 นาที

10. นำสารละลายตัวอย่างกรองด้วย Hyperclean nylon filter ขนาด $0.2 \mu\text{m}$ ใส่ใน vial ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การเตรียม Standard calibration curve

1. เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร, เติม 1 M Hydrochloric acid ปริมาตร 500 μl , เติม 2-NBA ปริมาตร 150 μl และเติม Working mixed internal standard 10 ng/ml ปริมาตร 100 μl ลงในหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/kg}$ โดยปิเปต Working mixed standard AOZ, AMOZ, AHD, SEM 10 ng/ml ปริมาตร 0, 10, 25, 50, 100 และ 200 μl ตามลำดับ ลงในหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml ตามตารางที่ 1
3. นำไปผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ทำตามขั้นตอนเดียวกับการเตรียมตัวอย่างทดสอบ ตั้งแต่ข้อ 2-10

ตารางที่ 5.1 การเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ และ Internal standard

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ($\mu\text{g/kg}$)	ปริมาตรของ Mixed standard 10 ng/ml (μl)	ปริมาตรของ Internal standard 10 ng/ml (μl)
0	0	100
0.1	10	100
0.25	25	100
0.5	50	100
1.0	100	100
2.0	200	100

สภาวะของเครื่อง LC

Flow rate	: 0.200 ml/min
Injection volume	: 20 μl
Run time	: 15 นาที
Temperature column	: $30 \pm 10^{\circ}\text{C}$

ตารางที่ 5.2 แสดงระบบ Gradient mode

Step	Total time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.00	0.200	90	10
1	2.00	0.200	55	45
2	6.90	0.200	55	45
3	7.00	0.200	5	95
4	10.00	0.200	5	95
5	10.10	0.200	90	10
6	15.00	0.200	90	10

หมายเหตุ : สามารถปรับ Condition ได้ตามสถานะของเครื่อง

สถานะของเครื่อง MS/MS

Scan type : MRM
 Scan Mode : Positive
 Ion source : Turbo Spray

ตารางที่ 5.3 แสดง Mass range (m/z)

Compound	Parent ion >Primary ion Parent ion > Secondary ion	Compound	Parent ion >Primary ion
AOZ	236 > 134 236 > 104	D4-AOZ	240 > 134
AMAZ	335 > 291 335 > 262	D5-AMAZ	340 > 296
AHD	249 > 134 249 > 104	¹³ C ₃ -AHD	252 > 134
SEM	209 > 166 209 > 192	¹³ C ¹⁵ N ₂ -SCA- HCL	212 > 168

การควบคุมคุณภาพการทดสอบ

ตารางที่ 5.4 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Nitrofurantoin group

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การสร้าง calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
2. การทดสอบ Negative Control	1 ครั้ง/ชุดการทดสอบ	$< LOD$
3. การทดสอบ Fortified Sample และ การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5% ของตัวอย่าง	$\% RPD \leq 30 \%$ และ $\% recovery$ อยู่ในช่วง 50 – 120 %
4. การทดสอบตัวอย่าง 2 ซ้ำ (Duplicate sample)	1 ครั้ง/ชุดการทดสอบ	$\% RPD \leq 30 \%$

การคำนวณ

1. การคำนวณ ion ratio (R)

$$\text{Ion ratio (R)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Secondary ion}} \quad \text{หรือ} \quad \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Secondary ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion}}$$

2. การคำนวณความแตกต่าง ion ratio

$$(\Delta R) = \frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{mean}}}{R_{\text{mean}}} \times 100$$

โดย R_{sample} = ion ratio ของสารที่สนใจที่พบในตัวอย่าง

R_{mean} = ion ratio เฉลี่ยของสารที่สนใจที่มีอยู่ในสารมาตรฐาน

3. การคำนวณ Response Factor (RF)

$$RF = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion ของสารที่สนใจ}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Internal standard ion}} \times \text{ความเข้มข้นของ Internal standard ion}$$

4. คำนวณความเข้มข้นของ Nitrofurantoin ในตัวอย่างโดยอ้างอิงจาก Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน ซึ่งรายงานผลที่ได้เป็นหน่วย $\mu\text{g/kg}$

$$X = \frac{RF - b}{a}$$

โดย X = ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่มีอยู่ในตัวอย่าง ($\mu\text{g/kg}$)

RF = Response Factor ของ Primary ion

a = ความชันของ Calibration curve

b = จุดตัดแกน Y ของ Calibration curve

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ Nitrofurantoin (metabolites) ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น µg/kg
ทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยที่

- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
- ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่าน้อยกว่าค่า LOQ
- ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

[illegible]

6. วิธีวิเคราะห์ Chloramphenicol โดยเทคนิค ELISA

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Cazemier, G. Haasnoot. W. and Stouten, P. 1996. Screening of chloramphenicol in urine, tissue, milk and eggs in consequence of prohibitive regulation. Proceedings Euroresidue III 1996, Eds. N. Haagsma and A. Ruiter, pp. 315.

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกสกัดด้วย Ethyl acetate แล้วทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยสารละลาย Iso-octane/ Chloroform (2:3 v/v) คลอแรมเฟนิคอล (CAP) ในรูปของ Glucuronide จับตัวกับ Enzyme immunoassay ที่เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ELISA ที่ความยาวคลื่น 450 และ 630 nm การแสดงผลการทดสอบจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจากการย่อย Substrate ที่เหมาะสมกับของ Enzyme นั้น

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ELISA Reader
2. เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 g
3. เครื่องเขย่าแบบ Shaker และ Vortex
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
5. เครื่องระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน
6. นาฬิกาจับเวลา
7. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ชนิด polypropylene ขนาด 50 ml มีขีดบอกปริมาตร
8. Multi channel pipette ขนาด 200 μ l

9. Auto Pipette ขนาด 1- 5 ml, 100 - 1000 μ l, 50 μ l, 10 - 100 μ l และ 200 μ l
10. Volumetric flask ขนาด 500 ml, 200 ml, 100 ml, 10 ml และ 5 ml
11. ปีกเกอร์ขนาด 10 ml และ 100 ml
12. กระบอกตวง ขนาด 50 ml และ 100 ml
13. หลอดทดลอง

สารเคมี

1. Ethyl acetate, AR Grade
2. Iso-octane ชนิด Organic Residue Analysis
3. Chloroform, AR grade
4. Chloramphenicol test kit

ชุดทดสอบคลอแรมฟิสิกอล

นำชุดทดสอบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียสออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที ก่อนการใช้งาน และหลังใช้งานแล้ว ให้เก็บสารเคมีและชุดทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารเคมีและสารละลายมาตรฐาน

Rinsing buffer

เจือจางด้วย DI (น้ำกลั่นปราศจากไอออน) ในอัตราส่วน 1 : 19 (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน) โดยใน 1 แถว (Strip) จะใช้ Rinsing buffer ในการล้างประมาณ 40 ml

Substrate Solution

สารละลาย Substrate อยู่ในรูปพร้อมใช้งาน ก่อนใช้งานให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที และเขย่าเบาๆ

Standard Solution

สารละลายมาตรฐาน ประกอบด้วยความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 2.0 ng/ml ใช้งานได้ทันที

Reconstitution/Zero standard buffers

Buffer นี้อยู่ในรูปพร้อมใช้งาน ใช้สำหรับละลาย Lyophilised conjugate และ Lyophilised Antibody สารส่วนที่เหลือใช้สำหรับทำ Blank และ Zero standard

Conjugate solution

Conjugate อยู่ในรูป Lyophilised ก่อนการใช้งาน ต้องละลายด้วย Reconstitution buffer ปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากัน (เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้องทั้งใช้งาน)

Antibody solution

ละลายด้วย Reconstitution buffer ปริมาตร 4 ml

Sample dilution buffer (4x Concentrated)

สารละลาย Sample dilution buffer อยู่ในรูปเข้มข้นต้องนำมาวางที่อุณหภูมิห้องและผสมให้เข้ากันก่อนทำการเจือจาง เนื่องจาก Sample dilution buffer เข้มข้นนี้สามารถตกตะกอนได้ในการใช้งานให้เจือจาง Sample dilution buffer ด้วย DI ในอัตราส่วน 1 : 3 (Sample dilution buffer 20 ml : DI 60 ml) (เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียสเมื่อยังไม่ใช้งาน)

สารมาตรฐานคลอแรมฟินิคอล 3 µg/L

ปิเปต 150 µl ของสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 ng/ml ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 5 ml เติม Sample dilution buffer จนถึงขีดบอกระดับ (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน)

Stop solution

อยู่ในรูปพร้อมใช้งาน

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบคลอแรมฟินิคอล

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 3.00 ± 0.05 g ใส่ลงในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 ml เติม Ethyl acetate ปริมาตร 6 ml ปิดฝา
2. นำไปเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) นาน 10 นาที
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 10 นาที
4. ดูดส่วนใส ปริมาตร 4 ml ใส่หลอดทดลอง
5. นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน
6. ละลายด้วย Iso-octane: Chloroform (2:3) ปริมาตร 1 ml และ Dilution buffer ปริมาตร 0.5 ml
7. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 10 นาที
8. ดูดส่วนใสชั้นบนสุด 50 µl ใส่ในชุดทดสอบคลอแรมฟินิคอล

การลงชุดทดสอบคลอแรมฟินิคอล

1. ปิเปต Reconstitution / Zero standard buffer 100 μl ในหลุม A1 และ B1
2. ปิเปต Reconstitution/ Zero standard buffer 50 μl ในหลุม C1 และ D1
3. ปิเปต สารละลายมาตรฐานคลอแรมฟินิคอล 50 μl ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 2.0 ng/ml อย่างละ 2 ซ้ำลงในหลุม E1 จนถึง H1
4. ปิเปต สารละลายตัวอย่าง 50 μl ในหลุมที่กำหนด ตัวอย่างละ 2 หลุม
5. เติม Conjugate (CAP-HRPO) 25 μl ยกเว้นหลุม A1 และ B1
6. เติม Antibody (Anti-CAP) 25 μl ยกเว้นหลุม A1 และ B1
7. นำ Parafilm มาปิดชุดทดสอบ เชย่ชุดทดสอบ เบาๆ 1 นาที แล้วบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
8. เทสารละลายในหลุมทดสอบทิ้ง ล้าง 3 ครั้งด้วย Rinsing buffer

วิธีการล้าง Plate

1. เทสารละลายหลังจากการบ่มแล้ว โดยคว่ำ Plate อย่างรวดเร็ว
2. เติมสารละลาย Rinsing buffer ให้เต็มหลุม (ปริมาตร 300 μl)
3. เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง
4. ทำ Plate ให้แห้งโดยซับน้ำ จนกระทั่งไม่เห็นหยดน้ำบนวัสดุซับน้ำ
5. นำ Plate ไปเติมสารขั้นตอนต่อไป (อย่าปล่อยให้ Plate แห้งสนิท)
6. เติม Substrate ปริมาตร 100 μl
7. ปิดด้วย Parafilm แล้วบ่มในที่มืด 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง สารละลายในชุดทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าใส ขั้นตอนนี้ควรทำในที่มืด เติม Stop solution ปริมาตร 100 μl ในทุกหลุม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
8. อ่านค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ช่วงการดูดกลืนแสง 450 nm และ 630 nm

[illegible]

7. วิธีวิเคราะห์ Malachite Green, Leuco-malachite Green, Crystal Violet และ Leuco-crystal Violet โดยเทคนิค LC-MS/MS

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Malachite Green, Leuco-malachite Green, Crystal Violet และ Leuco-crystal Violet ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Aldert A. Bergwerff and Peter Scherpenisse. 2003. Determination of Residues of Malachite green in Aquatic Animals. Journal of Chromatography. B 788. pp. 351 – 359.

หลักการ

ตัวอย่างถูกสกัดด้วยสารละลาย McIlvaine's buffer : methanol [50 : 50] แล้วทำการวิเคราะห์ Malachite green, Leuco-malachite green, Crystal violet และ Leuco-crystal violet โดยใช้ Internal standard เป็นตัวเปรียบเทียบ คือ Brilliant green (BG), d5-Leucomalachite green (d5-LMG), d6-Crystal violet (d6-CV) และ d6-Leuconcrystal violet (d6-LCV) ตามลำดับ แล้วนำสารละลายสกัดที่ได้นำไปผ่าน Solid phase extraction และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง LC-MS/MS
2. เครื่องชั่งสำหรับชั่งตัวอย่าง ที่ต้องการความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และ 0.0001 g
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง Centrifuge
4. เครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Vortex Mixer)
5. Column CLYPEUS C18, 5 μ m, 150 x 3.0 mm และ Guard Cartridges CLYPEUS C18, 5 μ m, 20 x 3.2 mm

6. Water Oasis MCX 3 cc, 60 mg columns (Solid phase extraction, SPE)
7. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ชนิด Polypropylene ขนาด 50 มล. มีขีดบอกปริมาตร
8. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ชนิดเกรด A ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ml
9. ปิเปต ชนิด Autopipette ขนาด 10-100 μ l, 100-1000 μ l , 5 ml และ 10 ml
10. ปีกเกอร์ ขนาด 10, 100, 250, 500 และ 1000 ml
11. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
12. นาฬิกาจับเวลา
13. หลอดทดลอง
14. Filter membrane ความละเอียด 0.45 μ m
15. Nylon Filter membrane ความละเอียด 0.20 μ m

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Malachite green Oxalate Salt ($C_{23}H_{25}N_2 \cdot C_2HO_4 \cdot 0.5C_2H_2O_4$)
2. สารมาตรฐาน Leuco-malachite green ($C_6H_5CH[C_6H_4N(CH_3)_2]_2$)
3. Internal Standard Brilliant green ($C_{27}H_{34}N_2O_4S$)
4. Internal Standard d5-Leucomalachite green ($C_{23}H_{21}D_5N_2$)
5. สารมาตรฐาน Crystal Violet ($C_{25}H_{30}ClN_3$)
6. สารมาตรฐาน Leuco-crystal Violet ($CH[C_6H_4N(CH_3)_2]_3$)
7. Internal Standard d6- Crystal Violet ($C_{25}H_{30}D_6ClN_3O_3$)
8. Internal Standard d6- Leuco-crystal Violet ($C_{25}H_{25}D_6N_3$)
9. สารละลาย A (0.1 M Citric acid monohydrate)

ละลาย Citric acid monohydrate 10.5 g ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 500 ml เขย่าให้
สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์

10. สารละลาย B (0.2 M diSodium hydrogen phosphate dihydrate)

ละลาย diSodium hydrogen phosphate dihydrate 14.2 g ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น
500 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์

11. McIlvaine's buffer (pH 2.6)

เจือจางสารละลาย A ปริมาตร 445.5 ml และสารละลาย B ปริมาตร 54.5 ml ผสมให้
สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH 2.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์

12. Elution solution (Ethyl acetate (50): Methanol (45): Ammonia (5))

เจือจางสารละลายแอมโมเนีย ปริมาตร 5 ml, Ethyl acetate ปริมาตร 50 ml และสารเมทานอล ปริมาตร 45 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์

13. สารละลาย N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) (1000 $\mu\text{g/ml}$)

ละลาย TMPD 100 mg ด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

14. 50% เมทานอล (ใช้สำหรับ SPE wash solution)

ตวงเมทานอล ปริมาตร 50 ml ด้วยกระบอกตวง เติม DI ปริมาตร 50 ml ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

15. Mobile phase A

15.1 ละลาย ammonium acetate 0.385 g ด้วย DI ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

15.2 เจือจางสารละลายข้อ 15.1 ปริมาตร 1 ml และเติม Formic acid ปริมาตร 200 μl แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วย DI เขย่าให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปกรองผ่าน Filter membrane แล้วทำการ Degassed ก่อนนำไปใช้ นาน 10 นาที

16. Mobile phase B

นำ Acetonitrile (HPLC grade) กรองผ่าน Filter membrane แล้วทำการ Degassed ก่อนนำไปใช้

17. 50% Acetonitrile

นำ Acetonitrile (HPLC grade) ปริมาตร 50 ml เติม DI ปริมาตร 50 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

18. Stock standard: Malachite green (MG), Leuco-malachite green (LMG), Crystal violet (CV) และ Leuco-crystal violet (LCV) 100 $\mu\text{g/ml}$

18.1 ละลาย Malachite Green 0.0148 ± 0.0005 g ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

18.2 ละลาย Leuco-malachite Green 0.0120 ± 0.0005 g ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

18.3 ละลาย Crystal Violet 0.0101 ± 0.0005 g ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

18.4 ละลาย Leuco-crystal Violet 0.0101 ± 0.0005 g ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

19. Intermediate standards Malachite green, Leuco-malachite green, Crystal violet และ Leuco-crystal violet 1 $\mu\text{g/ml}$ (W / V)

19.1 Malachite green 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Stock standard Malachite green 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เป็น 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

19.2 Leuco-malachite green 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Stock standard Leuco-malachite green 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เป็น 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

19.3 Crystal violet 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Stock standard Crystal violet 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เป็น 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

19.4 Leuco-crystal violet 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Stock standard Leuco-crystal violet 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เป็น 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

20. Mixed Working Malachite green/Crystal violet : 10 $\mu\text{g/L}$

เจือจาง Intermediate standard Malachite green/Crystal violet 1 $\mu\text{g/ml}$ อย่างละ 100 μl ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เป็น 10 ml เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

21. Mixed Working Leuco-malachite green/Leuco-crystal violet : 10 $\mu\text{g/L}$

เจือจาง Intermediate standard Leuco-malachite green/Leuco-crystal violet 1 $\mu\text{g/ml}$ อย่างละ 100 μl ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile เป็น 10 ml เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

22. Stock Internal standard: Brilliant Green (BG), d5-Leuco-malachite Green (d5-LMG), d6-Crystal Violet (d6-CV) และ d6-Leuco-crystal Violet (d6-LCV) 100 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย d5-Leuco-malachite green 0.0100 ± 0.0005 กรัม ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

ละลาย Brilliant Green 0.0103 ± 0.0005 กรัม ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

ละลาย d6-Crystal violet 0.0101 ± 0.0005 กรัม ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

ละลาย d6-Leuco-crystal violet 0.0100 ± 0.0005 กรัม ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

23. Intermediated standard Brilliant Green (BG): 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Intermediate standards Brilliant Green 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เตรียมทุกครั้งที่ใช้งาน

24. Intermediated standard d5-Leuco-malachite green (d5-LMG): 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Intermediate standards d5-Leuco-malachite green 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

25. Intermediated standard d6-Crystal violet (d6-CV): 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Intermediate standards d6-Crystal violet 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

26. Intermediated standard d6-Leuco-crystal violet (d6-LCV): 1 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Intermediate standards d6-Leuco-crystal violet 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ด้วย Acetonitrile ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

การเตรียม MCX 3cc 60 mg columns (SPE) สำหรับสกัดตัวอย่าง

1. ปิเปตเมทานอล ปริมาตร 2 ml ลงใน SPE column ปลอ่ยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด

2. ปิเปต DI ปริมาตร 2 ml ลงใน SPE column ปลอ่ยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด

3. ปิเปต McIlvaine's buffer (pH 2.6) ปริมาตร 2 ml ลงใน SPE column ปลอ่ยให้สารละลายไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง LC-MS/MS

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 1.00 ± 0.10 g ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml
2. เติมสารละลาย TMPD 1000 $\mu\text{g/ml}$ ลงในตัวอย่าง ปริมาตร 100 μl
3. เติม Internal standard BG 10 $\mu\text{g/L}$ ปริมาตร 100 μl , d5-LMG 10 $\mu\text{g/L}$ ปริมาตร 100 μl , d6-CV 10 $\mu\text{g/L}$ ปริมาตร 100 μl และ d-6 LCV 10 $\mu\text{g/L}$ ปริมาตร 100 μl ลงในตัวอย่าง
4. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเติม McIlvaine's buffer: Methanol (50:50 v/v) ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Vortex Mixer นาน 1 นาที
5. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm นาน 20 นาที
6. ถ่ายส่วนใสลงในหลอดแก้ว ประมาณ 9 ml แล้วนำไปผ่าน Solid phase extraction (SPE) โดยการใช้ MCX 3cc 60 mg columns ที่ผ่านการ Condition แล้ว ปล่อยให้สารละลายตัวอย่างไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด
7. เปิดสารละลาย 0.1 N HCl ปริมาตร 2 ml ลง SPE column ปล่อยให้ไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด และเติม DI ปริมาตร 5 ml ปล่อยให้ไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด ทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที
8. เติม 50% Methanol ปริมาตร 3 ml ปล่อยให้ไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด
9. เติม Hexane ปริมาตร 3 ml ปล่อยให้ไหลผ่าน SPE column อย่างช้าๆ จนหมด ทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที
10. เติม Elution Solution ปริมาตร 5 ml แล้วเก็บสารละลายที่ไหลผ่านในหลอดทดลอง
11. นำไประเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน อุณหภูมิ 65 ± 5 °C จนแห้ง และละลายกลับด้วยสารละลาย 50% Acetonitrile ปริมาตร 500 μl กรองผ่าน Syringe nylon filter ลงใน vial ปริมาตร 1 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การเตรียม Standard Calibration Curve

ตารางที่ 7.1 Mixed Standard Malachite green/Crystal violet และ Leuco-malachite green/Leucocrystal violet ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน ($\mu\text{g/kg}$)	ปริมาตร BG 10 $\mu\text{g/L}$ (μl)	ปริมาตร d5-LMG 10 $\mu\text{g/L}$ (μl)	ปริมาตร d6-CV 10 $\mu\text{g/L}$ (μl)	ปริมาตร d6-LCV 10 $\mu\text{g/L}$ (μl)	ปริมาตร Mixed MG / CV 10 $\mu\text{g/L}$ (μl)	ปริมาตร Mixed LMG / LCV 10 $\mu\text{g/L}$ (μl)
0	100	100	100	100	0	0
0.1	100	100	100	100	10	10
0.25	100	100	100	100	25	25
0.5	100	100	100	100	50	50
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	200	200
3	100	100	100	100	300	300
4	100	100	100	100	400	400

สภาวะของเครื่อง LC

Injection volume : 10 μl

ตารางที่ 7.2 ระบบ Gradient Mode

Time (min)	Flow rate ($\mu\text{l/min}$)	%A (0.05mM Ammonium Acetate : 0.02% Formic acid)	%B (Acetonitrile)
0.00	600	75	25
9.00	600	5	95
12.00	600	5	95
12.50	600	75	25
15.00	600	75	25

สภาวะ Mass

FUNCTION ONE :

- BG : 385 > 341
- MG : 329 > 208
329 > 313 (base)

FUNCTION TWO :

- d5-LMG : 336 > 239
- LMG : 331 > 165
331 > 239 (base)

FUNCTION THREE :

- d6 - CV : 378 > 358
- CV : 372 > 340
372 > 356 (base)

FUNCTION FOUR :

- d6 - LCV : 380 > 365
- LCV : 374 > 238
374 > 358 (base)

การคำนวณผล

1. การคำนวณ Ion ratio (R)

$$R = \frac{\text{Response Secondary ion}}{\text{Response Primary ion}}$$

2. ความแตกต่างของ ion ratio (ΔR)

$$\Delta R = \frac{R \text{ sample} - R \text{ mean}}{R \text{ mean}} \times 100$$

โดย R sample = ion ratio ของสารที่สนใจที่พบในตัวอย่าง

R mean = ion ratio เฉลี่ยของสารที่สนใจที่มีอยู่ในสารมาตรฐาน

3. การคำนวณ Response Factor (RF)

$$RF = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Primary ion ของสารที่สนใจ} \times \text{ความเข้มข้นของ Internal Standard ion}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Internal Standard ion}}$$

4. คำนวณความเข้มข้นของ Malachite green, Leuco-malachite green, Crystal Violet และ Leuco-crystal Violet ในตัวอย่างโดยอ้างอิงจาก Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน ซึ่งรายงานผลที่ได้เป็นหน่วย $\mu\text{g/kg}$

ปริมาณสารที่สนใจที่พบในตัวอย่าง (X)

$$X = \frac{RF - b}{A}$$

โดย X = ความเข้มข้นของสารที่สนใจที่มีอยู่ในตัวอย่าง ($\mu\text{g/kg}$)

a = ความชันของ calibration curve

b = จุดตัดแกน Y ของ Calibration curve

RF = Response factor ของ Ion product

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ Malachite green, Leuco-malachite green, Crystal Violet และ Leuco-crystal Violet ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/kg}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
2. ถ้าผลที่ได้มีค่าตั้งแต่ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ รายงานผลว่า น้อยกว่า LOQ (เช่น LOQ การวิเคราะห์ MG และ LMG มีค่า = $0.10 \mu\text{g/kg}$ ให้รายงาน $<0.10 \mu\text{g/kg}$)
3. ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD รายงานผลว่า ND (Not Detected)

[illegible]

8. วิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด(Total Mercury) โดยเครื่อง Mercury analyzer

ขอบข่าย

เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณ Total Mercury ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Association of Official Analytical Chemists. 2016. Official Methods 974.14. Mercury in Fish by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS). AOAC International 19th Edition. pp 36-37.

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกย่อยให้เป็นของเหลวโดยใช้กรดไนตริกเข้มข้นและความร้อน ปรับปริมาตรและนำไปทดสอบปริมาณปรอทด้วยเครื่อง Mercury analyzer โดยปรอทซึ่งอยู่ในรูป Hg^{2+} จะถูกรีดิวซ์ด้วย SnCl_2 กลายเป็น Hg^0 ซึ่งมีสภาพเป็นไอ และถูกวัดปริมาณที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Mercury analyzer สามารถใช้งานได้ที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร
2. เครื่องชั่งสำหรับชั่งตัวอย่างที่ต้องการความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g และ 0.0001 g
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) สามารถใช้งานได้ที่ 95 ± 5 องศาเซลเซียส
4. เครื่อง Auto-desiccator
5. Vortex mixer
6. หลอดพลาสติกฝาเกลียวชนิด polypropylene ขนาด 50 ml
7. Autopipette ขนาด 10-100 μl , 100-1000 μl และ 5 ml
8. ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml, 25 ml, 50 ml และ 2000 ml
9. ปีกเกอร์ขนาด 10 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml และ 1000 ml

10. กระบอกตวงขนาด 100 ml
11. แก๊สอาร์กอน ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.995 %

สารเคมี

1. กรดไนตริกเข้มข้นไม่น้อยกว่า 69% ชนิด AR grade
2. Hydrochloric acid 3% (V/V) (carrier solution)
 เจือจาง Hydrochloric acid ปริมาตร 30 ml ลงในขวดวัดปริมาตร ที่มี DI อยู่ในขวดและ
 ปรับปริมาตรด้วย DI เป็น 1000 ml ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)
3. Tin (II) chloride dihydrate [$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] 1.1 % (reducing agent)
 ละลาย Tin (II) chloride dihydrate 11 g ด้วย Hydrochloric acid เข้มข้น 3%
 ปริมาตร 1000 ml เขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)
4. Intermediate standard Mercury 10 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Standard mercury $1000 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย
 3 % HCl เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน
5. Intermediate standard Mercury 0.1 $\mu\text{g/ml}$
 เจือจาง Intermediate standard Mercury 10 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 500 ปรับปริมาตรเป็น
 50 ml ด้วย 3 % HCl เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน
6. Working standard Mercury 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 $\mu\text{g/L}$ (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน) ดัง
 แสดงในตารางที่ 8.1
 หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมีการเปลี่ยนแปลงตามใบรับรอง (Certificate
 of Analysis) ในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

ตารางที่ 8.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Mercury ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปรับปริมาตรด้วย 3% Hydrochloric acid

Standard Mercury ที่ต้องการเตรียม	ความเข้มข้น Standard Mercury ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตร Standard Mercury ที่ใช้ (μl)	ปริมาตรที่ปรับ (ml)
10 $\mu\text{g/ml}$	1000	100	10
0.1 $\mu\text{g/ml}$	10	500	50
1 $\mu\text{g/L}$	0.1	500	50
2 $\mu\text{g/L}$	0.1	1000	50
3 $\mu\text{g/L}$	0.1	1500	50
4 $\mu\text{g/L}$	0.1	2000	50
5 $\mu\text{g/L}$	0.1	2500	50
6 $\mu\text{g/L}$	0.1	3000	50

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง Mercury analyzer

- อุปกรณ์ที่นำมาวิเคราะห์ เช่น เครื่องแก้ว และหลอดพลาสติก ก่อนทำการทดสอบให้ทำความสะอาด โดยการล้างด้วยกรดไนตริก: DI (อัตราส่วน 1:9) 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย DI 2 ครั้ง
- ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 0.500 ± 0.050 g ใส่ลงในหลอดพลาสติก
- เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 4 ml (ปิดฝาคลายเกลียวออกเล็กน้อย) และวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 95 ± 5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตร 25 ml โดย rinse ภายในหลอดพลาสติกและฝาดด้วย DI ลงในขวดวัดปริมาตรนั้นหลายๆ ครั้ง และปรับปริมาตรด้วย DI เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- ปิเปตตัวอย่างที่ปรับปริมาตรแล้ว 1 ml ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีขีดบอกปริมาตร ปรับปริมาตรด้วย 3% HCl ให้เป็น 5 ml
- วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mercury Analyzer

สภาวะเครื่อง Mercury analyzer

เครื่องจะทำการดูด SnCl_2 โดยมีอัตราการไหลของสาร 4 ml/min

ดูด 3% HCl ด้วย อัตราการไหลของสาร 8 ml/min และ

อัตราการไหลของแก๊สอาร์กอน 60 – 100 ml/min

(SnCl_2 จะรีดิวซ์ ทำให้รูป Hg^{2+} ในตัวอย่างให้ กลายเป็น Hg^0 ซึ่งมีสภาพเป็นไอ และถูกวัด ปริมาณที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร)

ตารางที่ 8.2 การควบคุมคุณภาพของการทดสอบปรอท

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การสร้าง Standard calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
2. การทดสอบ Reagent blank	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	ค่า Reagent Blank น้อยกว่า LOD
3. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80 - 110 %
4. การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	%RPD ≤ 10 %
5. การทดสอบ Reslope	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	ค่า Reslope อยู่ในช่วง $\pm 20\%$ ของ Standard calibration curve
6. การทดสอบ CRM TORT 2 (หรือ TORT 3)	1 ครั้ง / เดือน	TORT 2 อยู่ในช่วง 0.21- 0.33 ug /g TORT 3 อยู่ในช่วง 0.270 - 0.314 ug /g

การคำนวณผล

1. โปรแกรมสำเร็จรูปของเครื่อง Mercury analyzer จะคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างให้ โดยเปรียบเทียบกับ Standard calibration curve ซึ่งเป็นกราฟของค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับค่าความเข้มข้นของสารละลาย Standard Mercury (ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 $\mu\text{g/L}$)

2. คำนวณความเข้มข้นของปรอทในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ได้จาก

$$\text{Hg } (\mu\text{g/g}) = (C \times 25 \times E) / (W \times D \times 1000)$$

โดยที่ C = ความเข้มข้นที่เครื่องวัดได้ ($\mu\text{g/L}$)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

D = ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่นำมาเจือจาง (ml)

E = ปริมาณสารละลายตัวอย่างหลังการเจือจาง (ml)

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณปรอทในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
โดยที่

1. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
2. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่า < LOQ
3. ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

αααααααααααααααααααααααααααα

9. วิธีวิเคราะห์ ปริมาณแคดเมียมโดยเทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ระบบ Graphite furnace

ขอบข่าย

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Association of Official Analytical Chemists. 2016. Official Methods 999.10. Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in Foods. AOAC International 19th Edition. pp 16-19.

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกย่อยให้เป็นของเหลวโดยใช้กรดไนตริกเข้มข้นและความร้อน ปรับปริมาตรและนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ระบบ Graphite furnace ที่ความยาวคลื่น 228.8 นาโนเมตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง AAS ระบบ Graphite furnace ประกอบด้วยหลอดไฟชนิด Hollow cathode cadmium lamp และ Electrodeless discharge cadmium lamp ความยาวคลื่น 228.8 นาโนเมตร
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.0001 g
3. ตู้อบ ช่วงใช้งาน 101 ± 1 องศาเซลเซียส
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ช่วงใช้งาน 95 ± 5 องศาเซลเซียส
5. เครื่อง Auto-dessiccator สามารถทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้ต่ำกว่า 50%
6. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml มีขีดบอกปริมาตร
7. Auto pipette ขนาด 10-100 μ l, 1 ml และ 5 ml
8. ขวดวัดปริมาตร ชนิดเกรด A ขนาด 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 ml
9. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 ml
10. ปิเปต ชนิด Volume pipette เกรด A ขนาด 1, 2, 5, 10 และ 20 ml

สารเคมี

1. กรดไนตริกเข้มข้นไม่น้อยกว่า 69 %, AR grade

2. สารละลายกรดไนตริก เข้มข้น 0.3 % (V / V)

เจือจางกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 3 ml ปรับปริมาตรด้วย DI 1000 ml เขย่าให้สารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 16% (v/v)

เจือจางกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 16.4 ml ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

4. Mixed Modifier: 1% Ammonium dihydrogenphosphate และ 100 mg/L Modifier magnesiumnitrate (V / V)

เจือจาง 10% Ammonium dihydrogenphosphate ปริมาตร 1 ml และ Magnesium nitrate 10,000 mg/L ปริมาตร 0.1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย DI เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5. Standard cadmium 8 µg/L

เตรียม Standard cadmium 8 µg/L ตามตารางที่ 1 ปรับปริมาตรโดยเติมสารละลาย กรดไนตริก เข้มข้น 16% จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 9.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน cadmium 8 µg/L

Standard cadmium ที่ต้องการเตรียม	Standard cadmium ที่ใช้เตรียม	ปริมาตร Standard cadmium ที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้
10 µg/ml	1,000 µg/ml	0.1 ml	10 ml
1 µg/ml	10 µg/ml	1.0 ml	10 ml
8 µg/L	1 µg/ml	0.08 ml	10 ml

6. Working standard cadmium 0.8, 2.0, 3.6, 4.8, 6.4 และ 8.0 µg/L

ตารางที่ 9.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Cadmium ความเข้มข้นต่างๆ

ID	Concentration Std. ($\mu\text{g/L}$)	Stock Std. 8 $\mu\text{g/L}$ (μL)	0.3% Nitric acid (μL)
Standard 1	0.8	2	18
Standard 2	2.0	5	15
Standard 3	3.6	9	11
Standard 4	4.8	12	8
Standard 5	6.4	16	4
Standard 6	8.0	20	0

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง AAS

- อุปกรณ์ที่นำมาวิเคราะห์ เช่น เครื่องแก้ว และหลอดพลาสติก ก่อนทำการทดสอบให้ทำความสะอาด โดยการล้างด้วยกรดไนตริก: DI (อัตราส่วน 1:9) 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย DI 2 ครั้ง
- ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 0.500 ± 0.050 g ใส่ลงในหลอดพลาสติก
- เติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 4 ml (ปิดฝาคลายเกลียวออกเล็กน้อย) และวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 95 ± 5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตร 25 ml โดย rinse ภายในหลอดพลาสติกและฝาด้วย DI ลงในขวดวัดปริมาตรนั้นหลายๆ ครั้ง และปรับปริมาตรด้วย DI เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- ปิเปตตัวอย่างที่ปรับปริมาตรแล้ว 1 ml ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีขีดบอกปริมาตร ปรับปริมาตรด้วย 3% HCl ให้เป็น 5 ml
- วิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS

ตารางที่ 9.3 ขั้นตอนการฉีดสารละลายสำหรับวัดด้วยเครื่อง AAS

ชนิด	ปริมาตรของสารละลาย (μl)	Mixed Modifier (μl)	0.3% Nitric acid (μl)
Reagent Blank	20	5	-
สารละลาย	20	5	-
CRM	20	5	-
Std.3.6 $\mu\text{g/L}$ (Reslope)	9	5	11

ตารางที่ 9.4 แสดง Condition ของเครื่อง AAS

Step	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Ramp Time (sec)	Hold Time (sec)	Internal Flow (ml)
Drying	110	1	30	250
Drying	130	15	30	250
Ashing	500	10	20	250
Atomization	1500	0	5	0
Cleaning	2450	1	3	250

หมายเหตุ: Condition ของเครื่องสามารถปรับได้ตามสภาวะของเครื่องมือ

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 9.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบแคดเมียม

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การสร้าง Standard Calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
2. การทดสอบ Reagent blank	5% ของตัวอย่าง	ค่า Reagent blank น้อยกว่า LOD
3. การทดสอบ Fortified sample	5% ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80-110%
4. การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	5% ของตัวอย่าง	% RPD $\leq 10\%$
5. การทดสอบ Re-slope	5% ของตัวอย่าง	$\pm 20\%$ ของค่า Abs ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 3.6 $\mu\text{g/L}$ จาก Standard Calibration Curve
6. การทดสอบ CRM DORM- 3 (หรือ DORM- 4)	ทุก 1 ครั้งต่อเดือนที่ทดสอบ	DORM- 3 อยู่ในช่วง 0.270 - 0.310 $\mu\text{g/g}$ DORM- 4 อยู่ในช่วง 0.281 - 0.317 $\mu\text{g/g}$

การคำนวณผล

1. โปรแกรมสำเร็จรูปของเครื่อง AAS จะคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างให้ โดยเปรียบเทียบกับ Standard Calibration curve ซึ่งเป็นกราฟของค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) กับค่าความเข้มข้นของสารละลาย Standard cadmium 0.8, 2.0, 3.6, 4.8, 6.4 และ 8.0 $\mu\text{g/L}$

2. คำนวณความเข้มข้นของแคดเมียมในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ได้จาก

$$\text{Cd } (\mu\text{g/g}) = (C \times 25 \times E) / (W \times D \times 1000)$$

โดยที่ C = ความเข้มข้นที่เครื่องวัดได้ ($\mu\text{g/L}$)
 W = น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)
 D = ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่นำมาเจือจาง (ml)
 E = ปริมาณสารละลายตัวอย่างหลังการเจือจาง (ml)

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณแคดเมียมในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
 โดยที่

1. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
2. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่า $< \text{LOQ}$
3. ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

αααααααααααααααααααααααα

10. วิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วโดยเทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ระบบ Graphite furnace

ขอบข่าย

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Association of Official Analytical Chemists. 2016. Official Methods 999.10. Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in Foods. AOAC International 19th Edition. pp 16-19.

หลักการ

ตัวอย่างจะถูกย่อยให้เป็นของเหลวโดยใช้กรดไนตริกเข้มข้นและความร้อน ปรับปริมาตรและนำไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วยเครื่อง AAS ระบบ Graphite furnace ที่ความยาวคลื่น 283.3 นาโนเมตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง AAS ระบบ Graphite furnace ประกอบด้วยหลอดไฟชนิด Hollow cathode Lead lamp และ Electrodeless discharge Lead lamp ความยาวคลื่น 283.3 นาโนเมตร
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.0001 g
3. ตู้อบ ช่วงใช้งาน 101 ± 1 องศาเซลเซียส
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ช่วงใช้งาน 95 ± 5 องศาเซลเซียส
5. เครื่อง Auto-dessiccator สามารถทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้ต่ำกว่า 50%
6. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml มีขีดบอกปริมาตร
7. Auto pipette ขนาด 10-100 μ l, 1 ml และ 5 ml
8. ขวดวัดปริมาตร ชนิดเกรด A ขนาด 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 ml
9. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 ml
10. ปิเปต ชนิด Volume pipette เกรด A ขนาด 1, 2, 5, 10 และ 20 ml

สารเคมี

1. กรดไนตริกเข้มข้นไม่น้อยกว่า 69 % , AR grade

2. สารละลายกรดไนตริก เข้มข้น 0.3 % (V / V)

เจือจางกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 3 ml ปรับปริมาตรด้วย DI 1000 ml เขย่าให้สารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 16% (v/v)

เจือจางกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 16.4 ml ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

4. Mixed Modifier: 1% Ammonium dihydrogenphosphate และ 100 mg/L Modifier magnesiumnitrate (V / V)

เจือจาง 10% Ammonium dihydrogenphosphate ปริมาตร 1 ml และ Magnesium nitrate 10,000 mg/L ปริมาตร 0.1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย DI เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5. Standard Lead 50 µg/L

เตรียม Standard Lead ที่ความเข้มข้น 50 µg/L ตามตารางที่ 1 ปรับปริมาตรด้วยเติมสารละลายกรดไนตริก 16% เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำไปใช้งาน

ตารางที่ 10.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Lead 50 µg/L

Standard Lead ที่ต้องการเตรียม	Standard ที่ใช้เตรียม	ปริมาตร Standard Lead ที่ใช้	ปริมาตรที่ปรับ
10 µg/ml	1,000 µg/ml	0.1 ml	10 ml
1 µg/ml	10 µg/ml	1.0 ml	10 ml
50 µg/L	1 µg/ml	0.5 ml	9.5 ml

6. Working Standard Lead 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/L

ตารางที่ 10.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Lead ความเข้มข้นต่างๆ

ID	Concentration Std. ($\mu\text{g/L}$)	Stock Std. 50 $\mu\text{g/L}$ (μL)	0.3% Nitric acid (μL)
Standard 1	5	2	18
Standard 2	10	4	16
Standard 3	20	8	12
Standard 4	30	12	8
Standard 5	40	16	4
Standard 6	50	20	0

ตารางที่ 10.3 ขั้นตอนการฉีดสารละลายสำหรับวัดด้วยเครื่อง AAS

ชนิด	ปริมาตรของสารละลาย (μL)	Mixed Modifier (μL)	0.3% Nitric acid (μL)
Reagent Blank	20	5	-
สารละลาย	20	5	-
CRM	20	5	-
Std. 30 $\mu\text{g/L}$ (Reslope)	12	5	8

10.2 การเตรียม Standard Lead ความเข้มข้นต่างๆ

10.3 ขั้นตอนการฉีดสารละลายสำหรับวัดด้วยเครื่อง AAS

10.4 แสดง Condition ของเครื่อง AAS

10.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบตะกั่ว

Condition ของเครื่อง AAS

ตารางที่ 10.4 แสดง Condition ของเครื่อง AAS

Step	Temp. (°C)	Ramp Time (sec)	Hold Time (sec)	Internal Flow (ml)
Drying	110	1	30	250
Drying	130	15	30	250
Ashing	850	10	20	250
Atomization	1550	0	5	0
Cleaning	2450	1	3	250

หมายเหตุ : Condition ของเครื่องสามารถปรับได้ตามสภาวะของเครื่องมือ

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 10.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบตะกั่ว

วิธีการควบคุมคุณภาพการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การสร้าง Standard Calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
2. การทดสอบ Reagent Blank	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	ค่า Reagent Blank น้อยกว่า LOD
3. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80-110%
4. การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% RPD $\leq 10\%$
5. การทดสอบ Reslope	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	$\pm 20\%$ ของค่า Abs ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/L}$ จาก Standard Calibration Curve
6. การทดสอบ CRM TORT-2 (หรือ TORT-3)	ทุก 1 ครั้งต่อเดือนที่ทดสอบ	TORT-2 อยู่ในช่วง 0.22 - 0.44 $\mu\text{g/g}$ TORT-3 อยู่ในช่วง 0.207 - 0.243 $\mu\text{g/g}$

[illegible]

11. วิธีวิเคราะห์ ปริมาณ Benzoic acid & Sorbic acid เทคนิค HPLC

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Kiatkungwalkrai, P., J. Yamprayoon, S. Saito, and R. Matsudaira. 1998. Determination of benzoic acid and sorbic acid in fish balls by HPLC. Fish Technology Research & Inspection. Vol II. pp. 1-19.

หลักการ

ตัวอย่างถูกสกัดด้วย Sodium acetate และ Acetonitrile จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณ โดยเครื่อง HPLC ที่สัญญาณ UV ความยาวคลื่นของ 235 nm และคำนวณปริมาณ Benzoic acid และ Sorbic acid โดยวิธี External calibration curve

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. LC Columns: Pinnacle II C18 5 μ m 250 x 4.6 mm / Guard Column : Symmetry C18, 5 μ m, 3.9 x 20 mm
3. เครื่องชั่ง ความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.0001 g
4. เครื่อง Centrifuge
5. pH meter
6. Ultrasonic bath
7. Volumetric flask ชนิดเกรด A ขนาด 5, 10, 50, 100, 200, 500 และ 1000 ml
8. หลอดพลาสติกชนิด polypropylene มีฝาและซีตบอกริมาตรขนาด 50 ml

9. ปิเปต ชนิด Autopipette ขนาด 10-100 μL , 100-1000 μL และ 5 ml
10. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml
11. กระดาษกรองเบอร์ 41 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 cm
12. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
13. Hyperclean Syringe Filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm. 0.20 μm ชนิด Nylon membrane
14. Membrane Nylon filters ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm. 0.45 μm .
15. Vial ขนาด 2 ml พร้อมฝาปิดชนิด silicone septa
16. ชุดกรอง Mobile Phase ต่อกับ Vacuum pump
17. Vortex mixer

สารเคมี

1. Acetonitrile, HPLC grade
2. Glacial acetic acid
3. Methanol, HPLC grade
4. Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa), AR grade
- 4.1 20 mM Sodium acetate (w /v)

ละลาย Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa) 1.640 ± 0.050 g ด้วย DI ปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 4.30 ± 0.05 เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้วิเคราะห์

5. Extraction Solution 20 mM Sodium acetate: Acetonitrile; 50:50

เจือจาง Sodium acetate ความเข้มข้น 20 mM กับ Acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้วิเคราะห์

6. Mobile phase 20 mM Sodium acetate: Acetonitrile; 65:35

เจือจาง Sodium acetate 20 mM กับ ในอัตราส่วน 65:35 ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองผ่านด้วย Membrane Nylon filter ขนาด 0.45 μm นำไป degassed นาน 10 นาที เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้วิเคราะห์

7. Stock standard Benzoic acid 1000 µg/ml

ละลายสารมาตรฐาน Benzoic acid 0.1002 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุก 3 เดือน

8. Stock standard Sorbic acid 1000 µg/ml

ละลาย Sorbic acid 0.1005 ± 0.0005 g ด้วย Methanol ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุก 3 เดือน

หมายเหตุ : การเตรียม Stock standard จะนำค่า %ความบริสุทธิ์มาคิดและจะเปลี่ยนแปลงตาม % ความบริสุทธิ์ของสารจากใบรับรอง (Certificate) ในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

9. Intermediate mixed standard 100 µg/ml

เจือจาง Stock standard Benzoic acid 1000 µg/ml และ Stock standard Sorbic acid 1000 µg/ml ปริมาตรอย่างละ 1000 µl ด้วย Mobile phase ให้ได้ปริมาตร 10 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

10. Working mixed standard 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 และ 75 µg/ml (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

10.1 Working mixed standard 0 µg/ml

โดยใช้ Mobile phase เป็น Standard 0 µg/ml

10.2 Working mixed standard 0.5 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 25 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.3 Working mixed standard 1 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 50 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.4 Working mixed standard 5 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 250 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.5 Working mixed standard 10 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 500 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.6 Working mixed standard 25 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 1250 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.7 Working mixed standard 50 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 2500 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10.8 Working mixed standard 75 µg/ml

เจือจาง Intermediate mixed standard 100 µg/ml ปริมาตร 3750 µl ด้วย Mobile phase ปริมาตร 5 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างบดละเอียด 5.000 ± 0.050 g ลงในหลอด Centrifuge ขนาด 50 ml เติม Extraction solution ปริมาตร 40 ml ลงในตัวอย่าง และนำไป Vortex นาน 1 นาที
2. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 8 นาที
3. กรองส่วนใสที่ได้ ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 ml
4. ทำซ้ำขั้นตอนเดิม Extraction solution ถึง กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41
5. ปรับปริมาตรด้วย DI ให้ได้ปริมาตร 200 ml
6. กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วย Hyperclean Nylon Membrane ขนาด 0.20 µm ใส่ใน vial
7. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

Condition ของเครื่อง HPLC

Column oven: 40 °C

Injection volume: 20 µl

Flow rate: 1.0 ml/min

Run Time: 8 นาที

Detector: UV ที่ความยาวคลื่น 235 nm

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 11.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Benzoic acid & Sorbic acid

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1.การทดสอบ System suitability	ทุกครั้งที่ทดสอบ	% RSD ของ Retention time และ Peak Area $\leq 1\%$ ($n \geq 5$)
2. การสร้าง Standard calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
3. การทดสอบ Reagent blank	อย่างน้อย 1 ตัวอย่างใน 1 ชุดทดสอบ	ค่า Reagent blank น้อยกว่า LOD
4. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80-110%
5. การทดสอบ 2 ซ้ำ (Duplicate)	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% RPD $\leq 10\%$
6.การทดสอบ Blank (Mobile phase)	ทดสอบทุกครั้งก่อนฉีดสารและหลังการทดสอบ Fortified sample	ไม่พบสัญญาณ Peak ที่สนใจ
7.การทดสอบ Standard 10 $\mu\text{g/ml}$ ปิดท้ายหลังฉีดตัวอย่าง	ทุกครั้งที่ทดสอบ	Retention time อยู่ในช่วง ± 0.50 min และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน %RPD $\leq 10\%$

การคำนวณผล

1. โปรแกรมสำเร็จรูปของเครื่อง HPLC จะคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างให้ โดยเปรียบเทียบกับ Standard calibration curve ซึ่งเป็นกราฟความเข้มข้นของสารละลาย Standard 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 และ 75 $\mu\text{g/ml}$ กับ Peak area โดยใช้สมการ Linear Regression ดังนี้

สมการ

$$Y = mx + b$$

$$Y = \text{Peak area}$$

x = Concentration, $\mu\text{g/ml}$

m = Slope of Curve (ความชัน)

b = Intercept of y

สูตรคำนวณ

$$\text{Benzoic acid } (\mu\text{g/g}) = \frac{(\text{C1} \times \text{E} \times \text{V})}{(\text{W} \times \text{D})}$$

$$\text{Sorbic acid } (\mu\text{g/g}) = \frac{(C2 \times E \times V)}{(W \times D)}$$

โดยที่ C1 = ความเข้มข้นของ Benzoic acid ในสารละลายตัวอย่าง ที่ได้จากการเทียบ Callibration curve ($\mu\text{g/ml}$)

C2 = ความเข้มข้นของ Sorbic acid ในสารละลายตัวอย่าง ที่ได้จากการเทียบ Callibration curve ($\mu\text{g/ml}$)

V = ปริมาตรสุดท้ายที่เตรียมตัวอย่าง (ml)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

D = ปริมาณสารละลายตัวอย่างที่นำมาเจือจาง (ml)

E = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างหลังการเจือจาง (ml)

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ Benzoic acid & Sorbic acid ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

โดยที่

1. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
2. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่า $< LOQ$
3. ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

[illegible]

12. วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตด้วยเทคนิค Spectrophotometer

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Marine Fisheries Research Department. 1992. Laboratory Manual on Analysis Methods and Procedures for Fish and Products. Southeast Asian Fisheries Development Center. Singapore. 2nd edition. pp 4.

หลักการ

ฟอสเฟตจะถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดยใช้สารละลาย Trichloroacetic acid จากนั้นเติม Ammonium molybdate ลงในสารละลายของ Phosphate ทำให้เกิด Phosphomolybdate เป็นสารประกอบสีส้ม-เหลือง สารประกอบนี้จะถูกรีดิวซ์ด้วย Tin chloride เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน (Molybdenum blue) วัดการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ความยาวคลื่น 830 nm

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g
3. Water bath
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารตกตะกอน (Centrifuge)
5. กระดาษวัดความเป็นกรด-ด่าง ช่วง pH 0.5 – 5.0
6. หลอดทดลองแก้วฝาเกลียว ขนาด 16 x 150 mm
7. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 50 ml
8. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
9. ปิเปต ชนิด Volume pipette หรือ Autopipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L และ 5 ml
10. ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml และ 1000 ml

11. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml

สารเคมี

1. Trichloroacetic acid (CCl_3COOH) 10 %

ละลาย Trichloroacetic acid 100 g ด้วย DI ปริมาตร 900 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 M

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 g ด้วย DI ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 เดือน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 M

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำหนัก 40 g ด้วย DI ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 เดือน

4. Hydrochloric acid (HCl) ชนิด AR grade 37%

5. Ammonium molybdate tetrahydrate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1.5%

ละลาย Ammonium molybdate tetrahydrate น้ำหนัก 1.5 g ด้วย Conc.HCl ปริมาตร 35 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

6. Tin (II) chloride dihydrate ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1 %

ละลาย Tin chloride dihydrate น้ำหนัก 0.25 g ด้วย DI ปรับปริมาตร 25 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมใหม่ทุกครั้ง

7. Potassium dihydrogen phosphate (potassium phosphate monobasic, KH_2PO_4)

10,000 $\mu\text{g/ml}$

ละลาย Potassium dihydrogen phosphate น้ำหนัก 10.9850 g ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 250 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

8. Potassium Dihydrogen phosphate 10 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Potassium dihydrogen phosphate 10,000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl ด้วย DI ปริมาตร 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมใหม่ทุกครั้ง

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง Spectrophotometer

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 10 g ใส่ในหลอดพลาสติก เติม 10% TCA ปริมาตร 30 ml
2. นำไป Vortex นาน 5 นาที
3. นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 15 นาที
4. กรองส่วนใสผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml
5. ปรับ pH ของสารละลายที่กรองด้วย 10 M NaOH และ 1 M NaOH จนได้ pH อยู่ในช่วง 4.5 - 5.0 และปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย DI เขย่าให้เข้ากัน
6. ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรด้วย DI 25 ml เขย่าให้เข้ากัน
7. ปิเปตสารละลายที่ได้จากข้อ 6. ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม DI ปริมาตร 9 ml
8. เติม 1.5 % Ammonium molybdate ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง
9. เติม 1 % Tin chloride dihydrate ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ไปอุ่นในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง
10. นำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 830 nm

การเตรียม Standard curve

1. ปิเปต Potassium dihydrogen phosphate 10 µg/ml ปริมาตร 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 3 ml แยกใส่ในหลอดทดลอง 6 หลอด (ความเข้มข้นฟอสเฟต 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 µg/ml) และเติม DI ปริมาตร 10, 9.8, 9.5, 9, 8 และ 7 ml ตามลำดับ เพื่อให้สารละลายในแต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเป็น 10 ml
2. นำแต่ละหลอดมาเติม 1.5 % Ammonium molybdate ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง
3. นำแต่ละหลอดมาเติม 1 % Tin chloride dihydrate ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ไปอุ่นในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง
4. นำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 830 nm

[illegible]

13. วิธีวิเคราะห์ปริมาณ EDTA เทคนิค HPLC

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ EDTA ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Perfetti, G.A., and C.R. Warner. 1979. Reverse Phase Ion Pair High Pressure Liquid Chromatographic Determination of EDTA in Crabmeat and Mayonnaise. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62(5) : pp.1092-1095.

หลักการ

EDTA ในอาหารจะถูกจับกับไอออนของเหล็ก (Fe^{+1}) หรือไอออนของทองแดง (Cu^{+2}) เกิดสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น (FeEDTA^{-1} หรือ CuEDTA^{-2}) ซึ่งละลายด้วยน้ำ ดังนั้นการแยกสารประกอบนี้โดยการสกัดด้วย Acetic acid 0.11% แล้วนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.0001 g
3. Column: Partisil, 5 μm ODS-3, 4.6 x 250 mm
4. เครื่อง Centrifuge
5. เครื่อง Homogenizer
6. Ultrasonic bath
7. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml

8. ปิเปต ชนิด Autopipette ขนาด 10-100 μL , 100-1000 μL และ 5 ml
9. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml
10. ขวดวัดปริมาตรชนิดเกรด A ขนาด 25, 100 และ 1000 ml
11. Hyperclean Syringe Filter Nylon 0.2 μm ชนิด Nylon membrane เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm
12. กระดาษกรอง เบอร์ 541, 41 และ 42 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 mm
13. Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm
14. ชุดกรอง Mobile Phase พร้อม Vacuum pump

สารเคมี

1. Acetonitrile, HPLC grade
2. Acetic acid, AR grade
3. Tetrabutylammoniumhydroxide (TBA^+) 25% in methanol
4. Copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
5. Disodium ethylene diaminetetraacetate dihydrate ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
6. สารสกัด acetic acid;
เจือจาง acetic acid 1.1 ml ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 1 L
7. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 M
ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.25 g ด้วย DI ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml. เก็บในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นาน 1 ปี
8. สารละลายมาตรฐาน EDTA 1000 ppm
ละลาย $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10 ± 0.001 g ด้วย DI ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml
9. Standard Calibration curve
เจือจาง Standard EDTA 1000 ppm ปริมาตร 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 ml ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml. เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 ml. แล้วปรับปริมาตรด้วยสารสกัด acetic acid
10. Mobile phase; Solution A: Solution B = 60:40
10.1 Mobile phase A; ปิเปต 0.8 M TBA^+ 12 ml และ acetic acid 1.1 ml ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วย DI

10.2 Mobile phase B; ปิเปต 0.8 M TBA⁺ 15 ml และ acetic acid 1.1 ml ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วย Acetonitrile

การเตรียมสารละลายตัวอย่างทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่างที่ปั่นแล้วมา 10 g ใส่ในหลอดพลาสติก 50 ml.
2. เติมสารสกัด acetic acid 0.11% ปริมาตร 25 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Vortexนาน 5 นาที
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 10 นาที
4. กรองส่วนที่ใสด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 541 ลงในขวดปรับปริมาตร 100 ml
5. นำตะกอนที่เหลือทำการสกัดอีก 2 ครั้ง ด้วยสารสกัด 25 ml ทำเช่นเดียวกับข้อ 2-4
6. รวมสารสกัดทั้ง 3 ครั้ง ปรับปริมาตรด้วยสารสกัด acetic acid 0.11% ให้ได้ 100 ml
7. ปิเปตสารละลายที่ได้ 20 ml. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25ml เติมCopper sulfate 1 ml ปรับปริมาตรด้วยสารสกัดให้ได้ 25 ml
8. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน
9. นำสารละลายใส่หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 10 นาที
10. กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ลงในบีกเกอร์ ขนาด 100 ml.
11. กรองสารละลายผ่าน Hyperclean Syringe Filter 0.20 µm ลงใน Vial
12. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

α α

14. วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Sulfur dioxide (SO₂) เทคนิค Titration

ขอบข่าย

เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

Yamagata, M. and Kim, L.1992. Determination of Sulphur dioxide (residual SO₂) by Rankine method A : Alkali Titration method. Laboratory Manual on Analysis Methods and Procedures for Fish and Products. 2nd edition. Marine Fisheries Research Department Southeast Asian Fisheries Development Center. Singapore. pp 5.

หลักการ

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) ที่อยู่ในอาหาร จัดอยู่ในสารกลุ่มซัลไฟต์ เมื่อถูกความร้อนจะสลายให้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และจะเป็นก๊าซได้ดีที่สภาวะเป็นกรด (H₃PO₄) เมื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) จับกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จะถูกเปลี่ยนมาอยู่ในรูปกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) และกรดซัลฟิวริกสามารถไตเตรตได้โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือกลั่น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1.1 Cooling tube
 - 1.2 Glass capillary
 - 1.3 Flow meter N₂ gas
 - 1.4 เตาให้ความร้อน
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.0001 g
3. ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask) ขนาด 125 ml

4. Pear Shape Flask (Receiving Flask) ขนาด 50 ml
5. Burette class A ขนาด 10 ml, Tolerance ± 0.02 ml
6. Volumetric Flask เกรด A ขนาด 100, 200 และ 500 ml
7. Beaker ขนาด 100 ml, 250 ml และ 500 ml
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 125 ml
9. Autopipette ขนาด 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 1-10 ml
10. กระบอกตวงขนาด 100 ml
11. แก๊สไนโตรเจน ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.995 %

สารเคมี

1. Hydrogen peroxide (H_2O_2) 0.3%
 เจือจาง Hydrogen peroxide 30% 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI ที่ผ่านการต้ม
 เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
2. Phosphoric acid (H_3PO_4) 25%
 เจือจาง Phosphoric acid (H_3PO_4) 29.4 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI เขย่าให้
 สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
3. 0.01 M Sodium hydroxide (NaOH)
 เจือจาง 1 N Sodium hydroxide ปริมาตร 5 ml ปรับปริมาตรด้วย DI ที่ผ่านการต้ม ในขวด
 วัดปริมาตรขนาด 500 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 เดือน
4. 0.25 % Mixed Indicator
 ละลาย Methyl red 0.2000 ± 0.0005 g และ Methylene blue 0.1000 ± 0.0005 g ด้วย
 Ethanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml
5. 1% Phenolphthalein
 ละลาย Phenolphthalein 0.5000 ± 0.0005 g ด้วย Ethanol 50 ml เขย่าให้สารละลายเป็น
 เนื้อเดียวกัน เก็บใส่ขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 เดือน
6. Stock Sodium hydroxymethylsulfonate ($\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$) 1000 $\mu\text{g/ml}$
 ละลาย Sodium hydroxymethylsulfonate 0.2147 ± 0.0005 g ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น
 100 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

หมายเหตุ : - การเตรียม Stock standard solution จะนำค่า % ความบริสุทธิ์มาคิดและจะเปลี่ยนแปลงตาม % ความบริสุทธิ์ของสารจากใบรับรอง (Certificate) ในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

7. Potassium hydrogen phthalate

อบ Potassium hydrogen phthalate ที่อุณหภูมิ 120 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง นำไปชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนในขวดรูปชมพู่ น้ำหนัก 0.0200 ± 0.0005 g เติมน้ำ DI ที่ผ่านการต้ม และทำให้เย็นแล้ว ปริมาตร 50 ml เขย่าให้ Potassium hydrogen phthalate ละลายจนหมด เติมน้ำ 1% Phenolphthalein จำนวน 10 หยด เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปไทเทรตด้วย 0.01 M Sodium hydroxide นำสารละลาย Potassium hydrogen phthalate ที่ได้มาหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทดสอบ 3 ซ้ำ (ทำการทดสอบทุกครั้งที่มีการวิเคราะห์ตัวอย่าง) บันทึกปริมาตรของ 0.01 M Sodium hydroxide ที่ใช้ในการไทเทรต

8. 10 % Sucrose

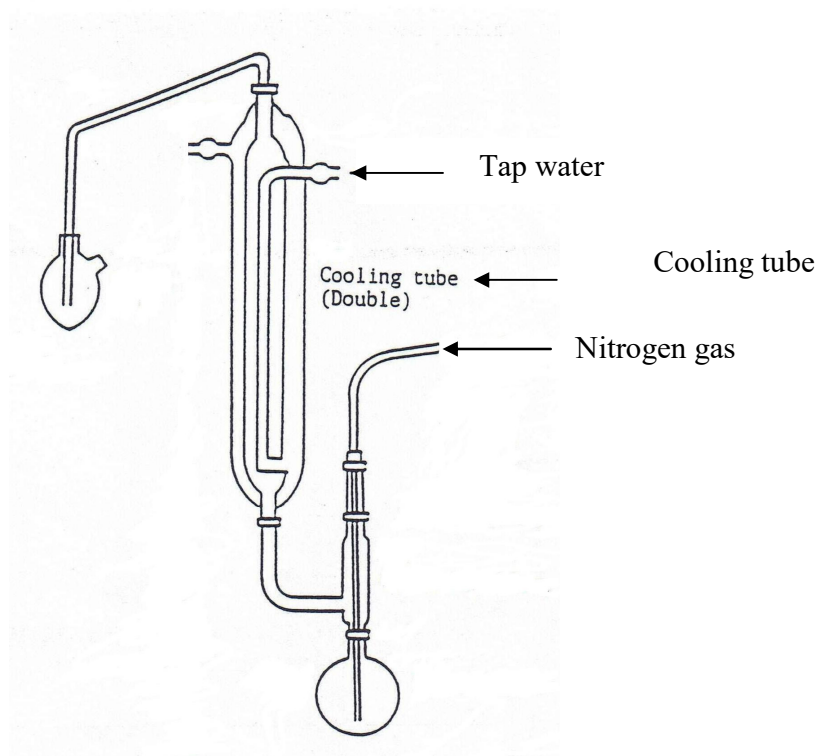
ละลาย Sucrose น้ำหนัก 10.000 ± 0.050 g ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดสีชา (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

9. Silicone antifoam

10. Ethanol, AR grade

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. เตรียมชุดกลั่นดังรูปที่ 1 ใช้วาสลีนทาบริเวณจุดเชื่อมต่อ (Joint) ของแต่ละอุปกรณ์ เพื่อป้องกันไม่ให้ก๊าซซิลิโคนฟอโรไดออกไซด์ที่เกิดในระหว่างการกลั่นรั่วซึมออกนอกชุดกลั่น



ภาพที่ 1 ชุดกลั่นตามวิธี Rankine

2. ปรับ Nitrogen gas ให้มีอัตราการไหล 0.2 L/min (สำหรับตัวอย่างกึ่ง กึ่ง ปลา หอย และปู แช่เย็น แช่แข็ง และกระป๋อง) และปรับ Nitrogen gas ให้มีอัตราการไหล 0.6 L/min (สำหรับตัวอย่างกึ่งแห้ง ปลาแห้งและปลาหมึกแห้ง)
3. ปิเปต 0.3 % Hydrogen peroxide 10 ml ใส่ใน Pear Shape flask หยดสารละลายอินดิเคเตอร์ 0.25 % Mixed Indicator 3 หยด แล้วหยด 0.01 M Sodium hydroxide จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว(Olive green) ต่อเข้ากับ Cooling tube ทันที
4. ชั่งตัวอย่างกึ่ง กึ่ง ปลา หอย และปู แช่เย็น แช่แข็ง และกระป๋อง ที่บดละเอียดน้ำหนัก 10.000 ± 0.050 g (สำหรับตัวอย่างกึ่งแห้ง ปลาแห้งและปลาหมึกแห้ง ชั่งน้ำหนัก 5.000 ± 0.050 g) ใส่ลงในขวดก้นกลม เติม DI ที่ผ่านการต้มแล้วปริมาตร 20 ml หลังจากนั้นเติม Silicone antifoam 1 หยด และเติมสารละลาย 25% Phosphoric acid ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำมาต่อเข้ากับ Glass capillary ทันที
5. นำขวดก้นกลมตั้งบนเตาให้ความร้อน ทำการกลั่น 40 นาที ถ้ามีซิลเฟอร์ไดออกไซด์ สารละลายใน Pear shape flask จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง
6. นำขวดก้นกลมและ Pear shape flask ออกจากระบบ หลังจากนั้นทำการ rinse ชุดกลั่นด้วย DI เพื่อล้างระบบชุดกลั่นไม่ให้เกิดการปนเปื้อนในการทำตัวอย่างต่อไป

7. นำ Pear shape flask ที่เปลี่ยนเป็นสีม่วง ไปไทเตรตด้วย 0.01 M Sodium hydroxide จนได้จุดยุติ เป็น สีเขียว (Olive green) บันทึกปริมาตรของ 0.01 M Sodium hydroxide ที่ใช้ในการไทเตรต

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 14.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ Sulfur dioxide

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. Reagent blank	ทุก 5% ของตัวอย่าง	ค่า Reagent blank น้อยกว่า LOD
2. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5% ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110 %
3. การทดสอบซ้ำ (duplicate)	ทุก 5% ของตัวอย่าง	$RPD \leq 10 \%$

การคำนวณผล

1.การคำนวณปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ($\mu g/g$)

$$\text{ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO}_2\text{) (}\mu\text{g/g)} = \frac{32.0324 \times C_{NaOH} \times (V_s - V_b) \times 1000}{W}$$

โดยที่ V_s = ปริมาตรของ 0.01 M NaOH ที่ใช้ในการไทเตรตกับสารละลายตัวอย่าง (ml)

V_b = ปริมาตรของ 0.01 M NaOH ที่ใช้ในการไทเตรตกับ Reagent blank (ml)

C_{NaOH} = ความเข้มข้นของ 0.01 M NaOH ที่ได้จากการหาความเข้มข้นที่แน่นอน (M)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

32.324 = 1 ml ของ 0.01 M NaOH ประกอบด้วย 32.0324 g ของ SO_2

2. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (M)

$$\text{ความเข้มข้นของ NaOH (M)} = \frac{\text{น้ำหนัก Potassium Hydrogen phthalate (W}_{\text{KHP}}) \times 1000}{\text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (V)} \times 204.223}$$

โดยที่ V = ปริมาตร NaOH ที่ได้ไทเทรตกับ potassium hydrogen phthalate (ml)

W_{KHP} = น้ำหนัก potassium hydrogen phthalate (g)

204.223 = มวลโมเลกุล ของ Potassium hydrogen phthalate

การรายงานผล

รายงานผลปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น $\mu\text{g/g}$ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยที่

1. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
2. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่า $< \text{LOQ}$
3. ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

αααααααααααααααααααααααααααα

15. วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) เทคนิค HPLC

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP) ในหอยสองฝาและผลิตภัณฑ์หอยสองฝา

เอกสารอ้างอิง

Quilliam. M.A. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson & A.D. Cembella (Eds), Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology, Vol.11, Chapter 9. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, pp 247-266.

หลักการ

สกัดตัวอย่างด้วย 50% Methanol แล้วนำมาวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC, PDA detector ความยาวคลื่น 242 nm และคำนวณระดับความเป็นพิษบนพื้นฐานของการเตรียมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Photodiode Array Detector
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.01 g และไม่น้อยกว่า 0.0001g
3. เครื่อง Centrifuge
4. เครื่อง Homogenizer
5. Vortex Mixer
6. เครื่อง Ultrasonic bath
7. หลอด Centrifuge ชนิด Polypropylene ขนาด 50 ml
8. ปิเปตชนิด Auto Pipette ขนาด 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 5 ml และ 10 ml
9. ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 150, 500 และ 1000 ml
10. ขวดวัดปริมาตรขนาด 5, 10, 100 และ 1000 ml

11. ชุดกรอง Mobile phase
12. Hyperclean Syringe Filter ขนาด 0.20 μm , เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm
13. Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm
14. Column Symmetry C18, 5 μm , 3.9 x 150 μm พร้อม Guard cartridge

สารเคมี

1. CRM Domoic Acid 130.3 $\mu\text{g/ml}$
2. Methanol, AR grade
3. Acetonitrile, HPLC grade
4. Trifluoroacetic acid (TFA)
5. 50 % Methanol

เจือจาง Methanol ปริมาตร 500 ml ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

6. 1 % Acetonitrile

เจือจาง Acetonitrile ปริมาตร 1 ml ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7. Mobile phase: 10 % Acetonitrile: 0.1 % TFA

นำ Acetonitrile 100 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml และเติม Trifluoroacetic acid ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วย DI จนถึงขีดปริมาตรและเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

8. กรองผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm จากนั้น degassed โดยใช้ Ultrasonic bath

การเตรียม Standard solution

1. Intermediate Standard 103.30 $\mu\text{g/ml}$

เจือจาง Stock Standard Domoic Acid 103.3 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 0.25 ml และเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 2.25 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บใน Vial สีชา ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2. Working Standard Calibration Curve 0.00, 0.258, 0.517, 2.066, 10.330, 20.660, 30.810

µg/ml

2.1 Working standard 0.00 µg/ml

ปิเปต 1 % Acetonitrile ใส่ใน Vial สีชา

2.2 Working standard 0.258 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard 10.330 µg/ml ปริมาตร 100 µl ใส่ใน vial สีชาและเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 3.9 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2.3 Working standard 0.517 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard 10.330 µg/ml ปริมาตร 100 µl ใส่ใน vial สีชา และเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 1.9 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2.4 Working standard 2.066 µg/ml

เจือจาง Intermediate standard 10.330 µg/ml ปริมาตร 100 µl ใส่ใน vial สีชา และเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 400 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2.5 Working standard 10.330 µg/ml

เจือจาง Stock standard 103.3 µg/ml ปริมาตร 50 µl ใส่ใน vial สีชา และเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 450 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2.6 Working standard 20.660 µg/ml

เจือจาง Stock standard 103.3 µg/ml ปริมาตร 100 µl ใส่ใน vial สีชา และเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 400 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

2.7 Working standard 30.810 µg/ml

เจือจาง Stock standard 103.3 µg/ml ปริมาตร 85 µl ใส่ใน vial สีชา และเติม 1 % Acetonitrile ปริมาตร 200 µl เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง HPLC

1. ชั่งตัวอย่าง 4.00 ± 0.02 g ใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml
2. เติม 50 % Methanol ปริมาตร 16 ml
3. นำไปปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Homogenizer นาน 1 นาที
4. นำตัวอย่างหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 15 นาที
5. ปิเปตสารละลายส่วนใสกรองผ่าน nylon filter 0.20 μ m ใส่ลงใน vial สีชา
6. ตรวจวัดด้วย HPLC

สภาวะเครื่อง HPLC

Flow rate	: 1.0 ml/min ระบบ Isocratic mode
Injection volume	: 20 μ l
Run time	: 13 นาที
Temperature column	: 40 °C

หมายเหตุ condition เหล่านี้อาจมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 15.1 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ ASP

วิธีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. Standard calibration curve		$r \geq 0.995$
2.Reagent Blank	1 ตัวอย่าง ใน 1 Batch	< LOD
3. การทดสอบ Fortified sample	ทุก 5% ของตัวอย่าง	% Recovery อยู่ในช่วง 80 – 110 %
4. การทดสอบซ้ำ(duplicate)	ทุก 5% ของตัวอย่าง	$RPD \leq 10 \%$
5.การทดสอบ Blank	1 ตัวอย่าง ใน 1 Batch	ไม่พบสัญญาณพีค
6.Standard solution 0.517 μ g/ml	1ครั้ง ปิดท้ายหลังการฉีดตัวอย่างตัวสุดท้าย	Retention Time อยู่ในช่วง ± 0.50 นาที และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน %RPD จะต้อง $\leq 10 \%$

การคำนวณผล

1. โปรแกรมสำเร็จรูปของเครื่อง HPLC จะคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างให้จากกราฟความเข้มข้นของ Standard calibration curve 0.00, 0.258, 0.517, 2.066, 10.330, 20.660, 30.810 µg/ml กับ Peak area โดยใช้สมการ Linear Regression

2. ความเข้มข้น Domoic acid หรือ Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) ในตัวอย่างทดสอบได้จาก

$$\text{ASP } (\mu\text{g/g}) = \frac{(C \times E \times V)}{(D \times W)}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง จากการเทียบ Standard calibration curve (µg/ml)

V = ปริมาตรสุดท้ายที่เตรียมตัวอย่าง (ml)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

D = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่นำมาเจือจาง (ml)

E = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างหลังการเจือจาง (ml)

การรายงานผล

รายงานผลในรูปของปริมาณ ASP ในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น µg/g ทศนิยม 2 โดยที่

1. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOQ ให้รายงานผลเป็นค่าที่คำนวณได้
2. ถ้าผลที่ได้มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ LOD แต่ต่ำกว่า LOQ ให้รายงานผลว่า < LOQ
3. ถ้าผลที่ได้มีค่าต่ำกว่า LOD ให้รายงานผลว่า ND (not detected)

αααααααααααααααααααααααα

16. วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Histamine เทคนิค Fluorometric method

ขอบข่าย

เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์ปลา

เอกสารอ้างอิง

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2019b. Official Methods 977.13. Fish and other marine products. AOAC International 21st edition. pp 16-19.

หลักการ

ฮิสตามีนจะถูกสกัดจากตัวอย่างโดยใช้ methanol สารละลายที่สกัดได้จะถูกนำไปผ่าน column anion exchange resin จากนั้นนำไปสร้างอนุพันธ์กับ o-Phthalaldehyde (OPA) และวิเคราะห์หาปริมาณของอนุพันธ์ฮิสตามีนด้วยเครื่อง Fluorometer

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Fluorometer: excitation wavelength 360 nm และ emission wavelength 450 nm
2. เครื่องชั่งความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 g และความละเอียดไม่น้อยกว่า 0.0001 g
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ช่วงใช้งาน 60 ± 5 องศาเซลเซียส
4. เครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer)
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเบอร์ 41 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร
6. ขวดวัดปริมาตร ชนิดเกรด A ขนาด 10, 25, 50, 100, 500 และ 1,000 ml
7. ปิเปต ชนิด volume pipette เกรด A ขนาด 1, 5 และ 10 ml
8. ปิเปต ชนิด autopipette ขนาด 10-100 μ L, 100-1000 μ L และ 5 ml
9. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 150, 250, 500 และ 1000 ml

10. กระบอกตวง ขนาด 50 และ 100 ml
11. หลอดทดลองพร้อมฝา
12. นาฬิกาจับเวลา
13. หลอดพลาสติกชนิด Polypropylene มีฝา และขีดบอกปริมาตรขนาด 50 ml

สารเคมี

1. สารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 1.19 M
 เจือจาง กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85% ปริมาตร 7.933 ml ด้วย DI และปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 N
 ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 g ด้วย DI และปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 N
 ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 g ด้วย DI และปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
4. เมทานอล 75 %
 เจือจางMethanol 750 ml ผสมกับน้ำกลั่น 250 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
5. Orthophthalicdicarboxaldehyde (OPA) 0.1 %
 ละลาย OPA 0.1000 g ด้วยเมทานอล 100 ml เก็บในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์
6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 N
 เจือจางกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 8.39 ml ด้วย DI ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
7. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N
 เจือจาง กรดไฮโดรคลอริก 1 N ปริมาตร 8.39 ml ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
8. Ion exchange resin ใช้ Bio Rad AG 1 x 8, 50 - 100 mesh
 8.1 เปลี่ยน resin ให้อยู่ในรูป OH form โดยการเติม 2N NaOH ปริมาตร 1,200 ml ต่อ resin น้ำหนัก 80 g แช่ไว้ไม่เกิน 30 นาที เทสารละลายทิ้งไป แล้วแช่ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นล้าง resin ด้วย DI

จนไม่มีความเป็นต่าง (ทดสอบด้วยกระดาษวัดความเป็นกรด-ด่างทุกสัปดาห์ ก่อนการใช้งาน) และเก็บ resin ไว้ใน DI

8.2 เมื่อต้องการใช้งาน ให้นำ resin ที่ได้จากข้อ 9.1 ไปบรรจุลงใน column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 mm และยาว 20 cm ด้วยวิธี wet-packing โดยใช้ DI ใส่ในคอลัมน์ให้ resin สูงประมาณ 8 cm ปรับระดับน้ำให้อยู่เหนือ resin ใน column ประมาณ 0.5 cm

9. Standard Histamine dihydrochloride 1000 µg /ml

ละลาย standard histamine dihydrochloride 0.1670 ± 0.0005 g ด้วย 0.1 N HCl ปรับปริมาตร เป็น 100 ml เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน

หมายเหตุ : การเตรียม Stock Standard Solution จะนำเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาคิดและจะเปลี่ยนแปลงตามเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารในแต่ละ Lot ที่รับเข้า

10. Standard histamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 1 ปรับปริมาตรโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

การเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง Fluorometer

1. ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 10.000 ± 0.050 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 ml (ยกเว้นน้ำปลาให้ชั่ง 2.000 ± 0.050 g) เติม 75 % เมทานอล ปริมาตร 50 ml นำไป homogenize นาน 1 นาที
2. เทสารละลายตัวอย่างในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml และ rinse แกนปั่นของเครื่อง homogenizer ด้วย 75 % เมทานอล (ยกเว้นน้ำปลา เมื่อเติม 75 % เมทานอล 50 ml แล้วไม่ต้อง homogenize ให้ Vortex นาน 1 นาทีจนเป็นเนื้อเดียวกัน)
3. อุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 ± 5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรด้วย 75 % เมทานอลจนถึงขีดปริมาตร 100 ml เขย่าให้เข้ากัน และกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 41 ลงในบีกเกอร์
5. เปิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ใน column anion exchange resin ที่เตรียมไว้ในข้อ 8.2 เติม DI ปริมาตร 5 ml ปลอ่ยให้สารละลายไหลจาก column ลงสู่บีกเกอร์ ขนาด 50 ml โดยให้สารละลายไหลจากคอลัมน์เมื่อระดับของสารละลายอยู่เหนือ resin 2-3 mm ให้ rinse ด้วย DI ภายใน column (ระวังอย่าให้ resin แห้ง) ทำเช่นนี้จนกระทั่งสารละลายในบีกเกอร์มีปริมาตรเกือบถึง 50 ml นำบีกเกอร์ออกจาก column และถ่ายสารละลายนี้ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml ที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N อยู่ 5 ml เติม DI จนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน (ก่อนที่จะใส่สารละลายตัวอย่างต่อไปจะต้องล้าง column ด้วย DI ปริมาตร 25 ml)

6. การเตรียม Reagent Blank ทำเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ โดยเริ่มตั้งแต่ข้อ 2 ถึง 5 (ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง)

การทำให้เกิดสารอนุพันธ์ของฮีสตามีน

1. Blank

1.1 ใส่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N ปริมาตร 15 ml ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากัน

1.2 ภายใน 5 นาที เติมสารละลาย OPA 0.1 % ปริมาตร 1 ml ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที จับเวลา 4 นาที หลังจากใส่ OPA เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก 1.19 M ปริมาตร 3 ml ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที

2. Standard

2.1 ปิเปตสารละลาย Standard histamine 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 $\mu\text{g/ml}$ อย่างละ 5 ml แยกเติมลงไปในแต่ละหลอดทดลอง

2.2 ใส่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N ปริมาตร 10 ml ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากันทันที

2.3 ภายใน 5 นาที เติมสารละลาย OPA 0.1 % ปริมาตร 1 ml ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที

2.4 จับเวลา 4 นาที หลังจากใส่ OPA เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก 1.19 M ปริมาตร 3 ml ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที

3. สารละลายตัวอย่าง

3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5 (ขั้นตอนเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง Fluorometer) ปริมาตร 5 ml ลงไป ในหลอดทดลอง

3.2 ใส่สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N ปริมาตร 10 ml ลงในหลอดทดลอง

3.3 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากัน

3.4 ภายใน 5 นาที เติมสารละลาย OPA 0.1 % ปริมาตร 1 ml ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที

3.5 จับเวลา 4 นาที หลังจากใส่ OPA เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก 1.19 M ปริมาตร 3 ml ลงไป เขย่าให้เข้ากันทันที

ตารางที่ 16.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน histamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Standard histamine ที่ต้องการเตรียม ($\mu\text{g/ml}$)	Standard histamine ที่ใช้ ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตร Standard ที่ใช้ (μl)	ปริมาตรที่ใช้ปรับ (ml)
10	1,000	100	10
0.30	10	300	10
0.25	10	250	10
0.20	10	200	10
0.15	10	150	10
0.10	10	100	10
0.05	10	50	10
0.00	-	-	-

การควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

ตารางที่ 16.2 การควบคุมคุณภาพของการทดสอบฮิสตามีน

วิธีการควบคุมคุณภาพของการ ทดสอบ	ความถี่	เกณฑ์การยอมรับ
1. การสร้าง Standard calibration curve	ทุกครั้งที่ทดสอบ	ค่า $r \geq 0.995$
2. การทดสอบ fortified sample	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	% recovery อยู่ในช่วง 80 – 110 %
3. การทดสอบ 2 ซ้ำ (duplicate)	ทุก 5 % ของตัวอย่าง	RPD ≤ 10 %
4. การทดสอบ Reagent Blank	อย่างน้อย 1 ตัวอย่างต่อ ชุดทดสอบ	Reagent Blank $< \text{LOD}$

- α

บทที่ 4

มาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำสำหรับการส่งออก เป็นการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยข้อกำหนดมาตรฐานอ้างอิงตามประเทศผู้นำเข้าเป็นหลัก ทั้งนี้ผู้สนใจสามารถค้นข้อมูลมาตรฐานได้ทางเว็บไซต์

<https://www.fisheries.go.th/quality/standard.php> ซึ่งข้อกำหนด/มาตรฐาน ประกอบด้วย

1. การควบคุมยาปฏิชีวนะและสารตกค้าง เช่นไนโตรฟิวแรส (เมตาโบไลต์) มาลาไคท์ กรีน และเกลือของสารนี้ คลอแรมฟินิคอลและเกลือของสารนี้ ยากลุ่ม Tetracycline ยากลุ่ม Fluoroquinolones และยา กลุ่ม Sulfonamides
2. การควบคุมวัตถุเจือปนอาหาร เช่น Benzoic acid & Sorbic acid, Phosphate, Sulfur dioxide และ EDTA
3. การควบคุมสารปนเปื้อนในอาหาร เช่น โลหะหนัก (ปรอท แคดเมียม ตะกั่ว) และ 3 – MCPD
4. การควบคุมคุณภาพความสด เช่น ฮีสตามีน
5. การควบคุมสารชีวพิษในอาหาร เช่น สารชีวพิษ (PSP, ASP, DSP, PTX, YTX, AZA)
6. การควบคุมคุณภาพทางโภชนา เช่น Salt, Total nitrogen, pH, Aw, Moisture เป็นต้น

เนื่องจากมาตรฐานที่แต่ละประเทศกำหนดมีความหลากหลาย ผู้จัดทำจึงได้จัดทำสรุปเปรียบเทียบมาตรฐานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องที่กำหนดโดยประเทศคู่ค้าหลักของไทย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมตรวจสอบและเฝ้าระวังคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ทั้งนี้ รายละเอียดแต่ละข้อกำหนดดังที่แจ้งข้างต้น สามารถสืบค้นข้อมูลได้ที่เว็บไซต์ข้างต้น โดยมาตรฐานทางเคมีที่กำหนดในแต่ละประเทศนั้น ล้วนมีความเชื่อมโยงกับความปลอดภัยอาหารเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคในแต่ละประเทศ ทั้งนี้หากผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามมาตรฐานจะมีผลให้สินค้าถูกกักกันหรือปฏิเสธการนำเข้า ดังนั้น ผู้เกี่ยวข้องพึงต้องศึกษาข้อกำหนดและกฎระเบียบของค่ามาตรฐาน ซึ่งมีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์ของข้อมูลในเอกสารดังกล่าวนี้ ควรมีการตรวจสอบ ความถูกต้องและความทันสมัยของมาตรฐานในแต่ละประเทศด้วย เนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยที่ไม่มีการแจ้งให้กรมประมงทราบ

ตารางที่ 1 สรุปเปรียบเทียบมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้าที่สำคัญ

ชนิดยา	USA	Japan	Australia& New Zealand	Canada	China	Vietnam	Korea	EU	Russia	Hong Kong	South Africa	Malaysia	Taiwan	Singapore
Oxolinic acid	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	√	√
Tetracycline group	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	√	√	√	√
Fluorquinolone group	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	√	√
Sulfonamide group	√	√	-	√	√	√	√	√	-	-	√	-	√	√
Nitrofur group	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	√	√
Chloramphenicol	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	√	√	√
Malachite green &metabolites	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	-	√	√
Nitroimidazole	√	√	-		-	-	√	-	√	-	-	-	-	-
Avermectins	-	-	-	√	-	-	-	√	√	-	-	-	-	-
Dioxins	-	-	-	√	-	-	-	√	√	-	-	-	-	-
PCBs	-	√	√	√	√	-	√	√	√	-	-	-	-	-
Benzo (a) pyrene	-	-	-		√	-	√	√	√	-	-	-	-	-
Pesticide	-	√	√	√	√	-	-	√	-	-	-	-	-	-
Trace elements (Hg, Cd, Pb, etc)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

หมายเหตุ: √ = มีการกำหนด - = ไม่มีการกำหนด

ตารางที่ 1 สรุปเปรียบเทียบมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้าที่สำคัญ (ต่อ)

ชนิดยา	USA	Japan	Australia& New Zealand	Canada	China	Vietnam	Korea	EU	Russia	Hong Kong	South Africa	Malaysia	Taiwan	Singapore
3-MCPD	-	-	√	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√
Sulfur dioxide	-	√	√	√	√	-	√	√	-	√	√	√	√	√
Phosphate as P ₂ O ₅	-	√	√	√	√	-	-	√	-	-	-	√	-	-
Benzoic acid& Sorbic acid	-	√	√	√	√	-	√	√	√	√	√	√	√	√
Ethoxyquine	√	√	√	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Biotoxins (PSP, DSP, ASP, Lipophilic toxins)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	√	-	-	√
Histamine	√	-	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	-	√
Total Volatile Base Nitrogen (TVBN)	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salt	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moisture	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water activity	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total nitrogen	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-
Radionuclide	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: √ = มีการกำหนด

- = ไม่มีการกำหนด

การควบคุมคุณภาพสัตว์น้ำนำเข้า เป็นการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่นำเข้าสู่ราชอาณาจักรไทย โดยกำหนดรายการวิเคราะห์ที่ต้องควบคุม และค่ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังนี้

1. การควบคุมยาและสารตกค้างที่ไม่อนุญาตให้พบในอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299 พ.ศ.2549 (2549) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีบางชนิด (ฉบับที่ 2) ควบคุมยาและสารเคมี 6 ชนิดได้แก่

- 1.1 คลอแรมฟินิคอลและเกลือของสารนี้
- 1.2 ไนโตรพิวราโซนและเกลือของสารนี้
- 1.3 ไนโตรพิวแรนโทอินและเกลือของสารนี้
- 1.4 ฟูราโซลิโดนและเกลือของสารนี้
- 1.5 พิวแรลทาโดนและเกลือของสารนี้
- 1.6 มาลาไคท์ กรีนและเกลือของสารนี้

ทั้งนี้ ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร พ.ศ.2549 (2549) ได้กำหนดให้การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร จะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนได้ อย่างน้อยต่ำถึงระดับที่กำหนดตามตารางแนบท้ายประกาศนี้ โดยระบุค่าไว้ ดังนี้

1. คลอแรมฟินิคอลและเกลือของสารนี้ กำหนดค่า 0.3 µg/kg
กลุ่มไนโตรพิวแรนส์ ชนิด 3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ) และ 5-Methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ) กำหนดค่า 0.3 µg/kg
กลุ่มไนโตรพิวแรนส์ ชนิด Aminohydantoin (AHD) และ Semicarbazide (SEM) กำหนดค่า 1.00 µg/kg
2. มาลาไคท์ กรีนและเกลือของสารนี้ กำหนดค่า 2.00 µg/kg

2.การควบคุมสารปนเปื้อนในอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 (2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน โดยควบคุมโลหะหนักชนิดปรอทและตะกั่วปนเปื้อนในอาหาร และประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของแคดเมียมในอาหารบางชนิด ในราชกิจจานุเบกษา วันที่ 30 สิงหาคม 2561 (2561) ดังนี้

- 2.1 ปรอท กำหนดค่า 0.5 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับอาหารทะเล และไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับอาหารอื่น
- 2.2 ตะกั่ว กำหนดค่า 1 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2.3 แคดเมียม กำหนดค่าในสัตว์น้ำจำพวกหมึกชนิดปลาหมึกกระดอง ปลาหมึกสาย ปลาหมึกกล้วย ที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และสัตว์น้ำจำพวกหอยสองฝาและหอยฝาเดียว ชนิดหอยกาบตลับ หอยแครง หอยแมลงภู่ และหอยหวาน ที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ ปลาน้ำจืดและปลาทะเล กำหนดค่าที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม รวมทั้งสาหร่าย กำหนดค่าที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

3. การควบคุมคุณภาพความสดของสัตว์น้ำนำเข้า ตามมาตรฐาน Codex STAN 94-1981 (1981) กำหนดปริมาณสารฮีสตามีนที่บ่งบอกคุณภาพความสดที่ระดับ 10 mg/100 g

4. การควบคุมสารชีวพิษ (Marine Biotoxins) ในหอยสองฝา Codex STAN 292-2008 (2008) กำหนดปริมาณสารชีวพิษชนิด

4.1 Saxitoxin (STX) group ≤ 0.8 milligrams (2HCL) of saxitoxin equivalent

4.2 Okadaic acid (OA) group ≤ 0.16 milligrams of okadaic equivalent

4.3 Domoic acid (DA) group ≤ 20 milligrams domoic acid

4.4 Azaspiracid (AZP) group ≤ 0.16 milligrams

เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2529. เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ฉบับที่ 98 ใน: ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 103 ตอนที่ 23 ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529. 2 หน้า.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2549. เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีบางชนิด (ฉบับที่ 2) ฉบับที่ 299 ใน: ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 97 ง ลงวันที่ 18 กันยายน 2549. 1 หน้า.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2550. เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง ฉบับที่ 303 ใน: ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 108 ง ลงวันที่ 4 กันยายน 2550. 16 หน้า.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2562. เรื่องยาควบคุมพิเศษ ฉบับที่ 50. ใน: ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 43 ง ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2562. 1 หน้า.

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2561. เรื่องกำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของแคดเมียม ในอาหารบางชนิด ใน: ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 209 ง ลงวันที่ 30 สิงหาคม 2561. 1 หน้า.

Aldert A. Bergwerff and Peter Scherpenisse. 2003. Determination of Residues of Malachite green in Aquatic Animals. Journal of Chromatography. B 788. pp 351 – 359.

- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C).2016a.Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues: Liquid Chromatographic method. Official Method 995.09. 19th Edition. pp 4.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C). 2016b. Mercury in Fish by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS). Official Method 974.14. 19th Edition. pp 36-37.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C). 2016c. Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in Foods. Official Method 999.10. 19th Edition. pp 16-19.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C).2019. Fish and other marine products. Official method 977.13. 21st edition. pp 16-19.
- Cazemier, G. Haasnoot. W. and Stouten, P. 1996. Screening of chloramphenicol in urine, tissue, milk and eggs in consequence of prohibitive regulation. Proceedings Euroresidue III 1996, Eds. N. Haagsma and A. Ruiter, pp. 315.
- Codex STAN 94-1981. 1981. Standard for canned sardines and sardine-type products. pp 5.
- Codex STAN 292-2008. 2008. Standard for live bivalve molluscs and to raw bivalve molluscs. pp 9.
- Delepnine, B. and D. Hurtaud-Pessel. 2004. Presentation of Liquid-chromatography/Tandem Mass-spectrometry ; Screening Method for Identification Residues of Antibiotics in Meat. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (afssa). France. pp 12.
- Juhel-Gaugain M. and Hurtaud-Pessel D. 2007. Confirmation of Sulphonamide residues in Muscle and Milk by LC/MS/MS. LABORATOIRE D' ETUDES ET DE RECHERCHES SUR LES MEDICAMENTS VETERINAIRES ET LES DESINFECTANTS (afssa). France. pp 10.
- Kiatkungwalkrai, P., J. Yamprayoon, S. Saito, and R. Matsudaira.1998.Determination of benzoic acid and sorbic acid in fish balls by HPLC. Fish Technology Research & Inspection. Vol II. pp. 1-19.
- Larocque, L., M. Schnurr, S. Sved and A. Weninger. 1991. Determination of Oxolinic Acid Residues in Salmon Muscle Tissue by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. ASSOC.OFF.ANAL.CHEM.Vol.74(4): pp 608-611.
- Marine Fisheries Research Department. 1992. Laboratory Manual on Analysis Methods and Procedures for Fish and Products. Southeast Asian Fisheries Development Center. Singapore.2nd edition.pp 4.

- McCracken, R. J. and Kennedy D.G. 1997. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *Journal of Chromatography B*, 691. pp. 87-94.
- Perfetti, G.A., and C.R. Warner. 1979. Reverse Phase Ion Pair High Pressure Liquid Chromatographic Determination of EDTA in Crabmeat and Mayonnaise. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62(5): pp.1092-1095.
- Quilliam, M. A., M. Xie and W. R. Hardstaff. 2003. Chemical methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) Toxin. In: G. M. Anderson & A. D. Cembella (eds.). *Manual on Harmful Marine Micoralgae, Monographs on Oceanograhic Methodology*, Vol.2, Chapter 9. Intergovernmental Oceanograhic Commission (UNESCO). p. 247-266.
- Yamagata, M. and Kim, L.1992. Determination of Sulphur dioxide (residual SO₂) by Rankine method A : Alkali Titration method. *Laboratory Manual on Analysis Methods and Procedures for Fish and Products*. 2nd edition. Marine Fisheries Research Department Southeast Asian Fisheries Development Center. Singapore. pp 5.