รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง

การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

(Determination of malachite green and its metabolite residue in aquacultures using LC-MS/MS and HPLC-UV-VISIBLE)

โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

(Innovation for the improvement of food safety and food quality for new world economy)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาดา จูอนุวัฒนกุล

ภาควิชาเคมี และห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใน โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550-51

i2810284

ABSTRACT

In this study, the determination methods of Malachite green (MG) and its metabolite Leucomalachite green (LMG) were developed by introducing the fast and easy sample preparation using microwave oven assisted in extraction and clean-up step. In the LC-MS/MS determination technique, Crystal violet (CV) was used as the internal standard, the analysis performed at the following ion pairs: MG 329.3/208.2, 329.3/313.1, LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3 and CV (internal standard) 372.2/356.3. The quantitative analysis was the combination of standard addition method and internal standard calibration curve.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ MG และ LMG พร้อมกันในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ให้มีความถูกต้องแม่นยำสูง ด้วยการเตรียมตัวอย่างที่มีขั้นตอนง่ายและรวดเร็วขึ้น ใช้เตาอบไมโครเวฟในการสกัดและคลีนอัพ และวิเคราะห์ MG และ LMG ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีสารคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet, CV) เป็น internal standard ที่ ion pairs ดังนี้ : MG 329.3/208.2, 329.3/313.1, LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3 และ CV (internal standard) 372.2/356.3 วิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี standard addition method ร่วมกับ internal standard calibration method วิธีวิเคราะห์อีกวิธีหนึ่งคือการตรวจวิเคราะห์มาลาไคด์กรีน ลิวโคมาลาไคด์กรีน คริสตัลไวโอเล็ต ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ตตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง เช่น ปลา กุ้ง พร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC-DAD (multiwavelength) คอลัมน์ชนิด Zorbax stable bond C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm พร้อม guard column ชนิดเดียวกัน mobile phase คือ ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile และใช้ gradient elution ตรวจวัดสารทั้งสี่ชนิดพร้อมกันด้วยเครื่องตรวจวัดแบบ diode array detector (DAD) ที่หลายความยาวคลื่นได้แก่ 618 nm (0.00-7.00 min), 585 nm (7.01-12.00 min), 265 nm (12.01-20.00 min) วิเคราะห์ปริมาณโดยอาศัย external calibration curve ของ total MG (ปริมาณ MG + LMG) และของ total CV (ปริมาณ CV + LCV)

จฬ
เลขหมู่ วท 15
เลขทะเบียน 017898
2551
วัน. เดือน. ปี 18 ก.ย. 61

ABSTRACT

In this study, the determination methods of Malachite green (MG) and its metabolite Leucomalachite green (LMG) were developed by introducing the fast and easy sample preparation using microwave oven assisted in extraction and clean-up step. In the LC-MS/MS determination technique, Crystal violet (CV) was used as the internal standard, the analysis performed at the following ion pairs: MG 329.3/208.2, 329.3/313.1, LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3 and CV (internal standard) 372.2/356.3. The quantitative analysis was the combination of standard addition method and internal standard calibration curve. In the HPLC-DAD (multi-wavelength) technique to determine Malachite green, Leucomalachite green, Crystal violet and Leucocrystal violet (LCV) simultaneously, this study used Zorbax stable bond C18 column, 150 x 4.6 mm, 5 µm with guard column, ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) and acetonitrile as mobile phase with gradient elution, diode array as detector at time-programmed multi-wavelength: 618 nm (0.00-7.00 min), 585 nm (7.01-12.00 min), 265 nm (12.01-20.00 min). The quantitation method used the external calibration curve of the total MG (the amount of MG + LMG) and the total CV (the amount of CV + LCV).

รายงานฉบับนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS
(Determination of malachite green and its metabolite residue in aquacultures using LC-MS/MS)

ส่วนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE
(Determination of malachite green and its metabolite residue in aquacultures using HPLC-UV-VISIBLE)

รายงานการวิจัยเรื่อง

การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

(Determination of malachite green and its metabolite residue in aquacultures using LC-MS/MS)

โครงการนวตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหาร
สู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่
(Innovation for the improvement of food safety and food quality for new world economy)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาดา จูอนุวัฒนกุล

ภาควิชาเคมี และห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใน โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550-51

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์มาลาไคต์กรีน (Malachite green, MG) และลิวโคมาลาไคต์กรีน (Leucomalachite green, LMG) พร้อมกันในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ให้มีความถูกต้องแม่นยำสูง ด้วยการเตรียมตัวอย่างที่มีขั้นตอนง่ายและรวดเร็วขึ้น ใช้เตาอบไมโครเวฟในการสกัดและคลีนอัพ และวิเคราะห์ MG และ LMG ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีสารคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet, CV) เป็น internal standard ที่ ion pairs ดังนี้ : MG 329.3/208.2, 329.3/313.1, LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3 และ CV (internal standard) 372.2/356.3 วิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี standard addition method ร่วมกับ internal standard calibration method

ABSTRACT

In this study, the determination methods of Malachite green (MG) and its metabolite Leucomalachite green (LMG) were developed by introducing the fast and easy sample preparation using microwave oven assisted in extraction and clean-up step. In the LC-MS/MS determination technique, Crystal violet (CV) was used as the internal standard, the analysis performed at the following ion pairs: MG 329.3/208.2, 329.3/313.1, LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3 and CV (internal standard) 372.2/356.3. The quantitative analysis was the combination of standard addition method and internal standard calibration curve.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อภาษาไทย		ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		iii
สารบัญเรื่อง		iv
สารบัญตาราง		vi
สารบัญภาพ		vii
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	1.1 มูลเหตุจูงใจและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 สมมติฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2	**การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและลิวโคมาลาไคต์กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค LC-MS/MS**	**8**
	2.1 การทดลอง	
	2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS	8
	2.1.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG ตกค้างในเนื้อปลาด้วยเทคนิค LC-MS/MS	8
	2.2 ผลการทดลอง	
	2.2.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS	13
	2.2.2 ผลการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG ตกค้างในเนื้อปลาด้วยเทคนิค LC-MS/MS (sample extraction and clean-up)	14
	2.3 วิจารณ์ผลการทดลอง	15
บทที่ 3	**สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย**	**16**
	3.1 สรุปผลการทดลอง	16

3.2 ข้อเสนอแนะ 16

บรรณานุกรม **17**

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 19

ภาคผนวก ข 20

ภาคผนวก ค 21

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 1.1	การแจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG, และ LCV ในเนื้อปลาแช่แข็งจากประเทศต่างๆ ของระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและอาหารสัตว์ ของสหภาพยุโรป	3
ตารางที่ 2.1	Linearity ของ calibration curve	13
ตารางที่ 2.2	ผลการวิเคราะห์ปริมาณ MG และ LMG ในตัวอย่างชนิดต่างๆ	14

สารบัญภาพ (List of Illustration)

หน้า

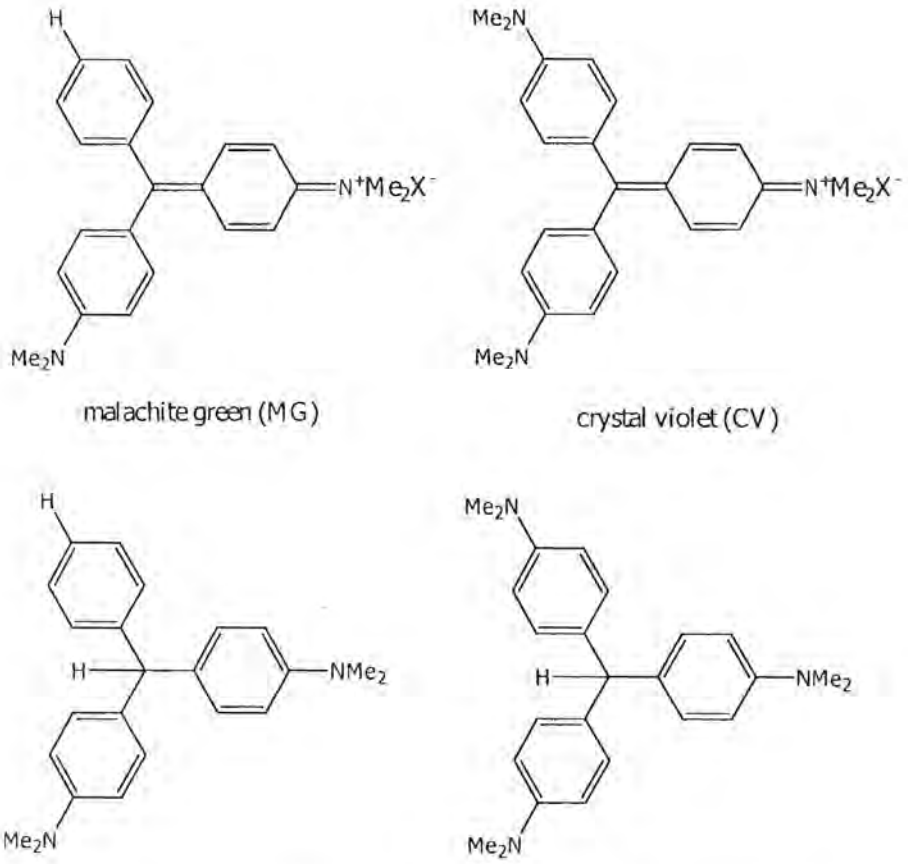
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ malachite green,crystal violet, leucomalachite green และ leucocrystal violet 1

รูปที่ 2.1 โครงสร้างเมตะบอไลต์ของ MG 15

บทที่ 1
บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจและความสำคัญของปัญหา

malachite green (MG) และ crystal violet (CV) เป็นสารเคมีที่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบางส่วนนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา จุลินทรีย์ ปรสิต และโปรโตซัวในน้ำ ซึ่งเป็นความเข้าใจที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากสารดังกล่าวไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ malachite green, crystal violet, leucomalachite green และ leucocrystal violet

MG และ CV เป็นสารสี จัดอยู่ในกลุ่ม N-methylated triphenylmethane[1,2] เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[3] ถูกดูดซับได้ง่ายผ่านทางกระแสน้ำโดยซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ เมื่อมีการสะสมสารเหล่านี้ในปริมาณหนึ่ง อาจทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้[3-7] ดังนั้นในปี ค.ศ.1978 ประเทศสหรัฐอเมริกาจึงควบคุมการใช้ MG อย่างเข้มงวดและอนุญาตให้ใช้เฉพาะหน่วยงานเพาะเลี้ยงเพื่อแพร่พันธุ์เท่านั้น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้เช่นกัน

ระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed : RASFF) ของสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้แจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาแช่แข็งซึ่งเป็นสินค้าส่งออกจากประเทศต่างๆ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1-1 นอกจากนี้ Commission Regulation No. 2002/657/EC ได้กำหนด minimum required performance limit (MRPL) สำหรับการหาปริมาณ MG และ LMG ที่ตกค้างเป็น 2 µg/kg[6-8] ประเทศไทยจึงต้องมีวิธีการตรวจวัดปริมาณของ MG และ CV ที่ตกค้างในเนื้อปลาเพื่อควบคุมไม่ให้สินค้าส่งออกของไทยมี MG และ CV ตกค้าง เพื่อเป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจในด้านการส่งออกสินค้า

ในอดีตจะมีการวิเคราะห์เฉพาะปริมาณของ MG และ CV ที่ตกค้างในเนื้อปลาเท่านั้น ต่อมามีผู้ศึกษาพบว่า เมื่อ MG และ CV เข้าสู่เนื้อเยื่อของปลา จะเกิดเมแทบอลิซึม กลายเป็น leucomalachite green (LMG) และ leucocrystal violet (LCV) ตามลำดับ[2-7] ทำให้ตรวจไม่พบ MG และ CV แต่เมื่อมีการตรวจวัดปริมาณ LMG และ LCV ที่เดิมไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ พบว่ามี LMG และ LCV ตกค้างในเนื้อปลา ทำให้เกิดความเสียหายในด้านการส่งออก ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณสารทั้ง 4 ชนิดที่ตกค้างในเนื้อปลา โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatograph (HPLC) ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์และทดสอบอาหารโดยทั่วไป

ตารางที่ 1.1 การแจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาแช่แข็งจากประเทศต่างๆ ของระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed : RASFF) ของสหภาพยุโรป

Date	Notified by	Reason for Notifying	Country of origin
03/01/2006	Spain	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen fillets of pangasius	Vietnam
19/01/2006	United Kingdom	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen catfish	Indonesia
24/01/2006	Spain	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen pangasius fillets	Vietnam
14/02/2006	Poland	Unauthorized substance crytal violet and leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
14/02/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen gutted eel	China
27/03/2006	United Kingdom	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen Mekong catfish slices	Vietnam
07/04/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen panga fillets	Vietnam
18/04/2006	Greece	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen pangasius fillets	Vietnam
01/05/2006	Belgium	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen fillets of pangasius hypophthalmus	Vietnam
17/07/2006	Poland	Unauthorized substance crystal violet and leucomalachite green in eel	Indonesia
17/07/2006	Poland	Unauthorized substance malachite green, crystal violet, leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
17/07/2006	Poland	Unauthorized substance crystal violet in frozen gutted eel	Indonesia
24/07/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
24/07/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
18/08/2006	Poland	Unauthorized substance malachite green and leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
18/08/2006	Poland	Unauthorized substance malachite green and leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
27/09/2006	Greece	Unauthorized substance malachite green and leucomalachite green in frozen gutted eel	Vietnam
12/12/2006	United Kingdom	Unauthorized substance crystal violet in frozen salmon skewers	Thailand
23/01/2007	Spain	Unauthorized substance malachite green in trout	Spain
08/03/2007	Denmark	Unauthorized substance leucomalachite green in eel	China via Poland

1.2 สมมติฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

MG, CV, LMG และ LCV มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 1.1) MG และ CV เป็นสารที่มีขั้วและมีสี จึงสามารถดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลได้ โดยจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 และ 585 nm ตามลำดับ[2] ต่างจาก LMG และ LCV ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้วและไม่มีสี จึงดูดกลืนแสงได้ในช่วงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 265 nm[2] การวิเคราะห์สารทั้งสี่ให้ได้พร้อมกันในการวิเคราะห์ครั้งเดียว ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเครื่องตรวจวัดแบบ diode array (diode array detector, DAD) จึงอาจทำได้โดยการตั้งโปรแกรมให้เครื่องตรวจวัดที่ค่าความยาวคลื่นหลายค่า (multi-wavelength) และจากสภาพมีขั้วที่แตกต่างกันของสารเหล่านี้ การเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีขั้วต่างกัน ในสัดส่วนที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด (gradient elution) อาจทำให้สามารถแยกสารทั้งสี่ได้อย่างสมบูรณ์

ปัจจุบันการวิเคราะห์ปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างอยู่ในเนื้อปลา ส่วนใหญ่ใช้เทคนิค liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง[2,4,6,7] จึงอาจดัดแปลงมาใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-VIS) ซึ่งมีราคาถูกกว่า แต่เนื่องจากเทคนิค HPLC-VIS มีความไว (sensitivity) ต่ำกว่าเทคนิค LC-MS/MS ในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยจึงจำเป็นต้องมีการปรับเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) และลดการรบกวนจากเมทริกซ์ด้วยวิธีคลีนอัพ (clean up) ที่เหมาะสม ซึ่งการใช้ solid-phase extraction (SPE) เพื่อคลีนอัพสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว

ในปี ค.ศ. 1997 Rushing และ Thompson[3] ได้วิเคราะห์หาปริมาณ MG, gentian violet (GV), leucogentian violet (LGV) และ LMG ในเนื้อปลาดุกและปลาเทร้าท์ โดยใช้เทคนิค HPLC-VIS คลีนอัพด้วย neutral alumina และ propylsulfonic acid cation-exchange solid phase extraction cartridges และใช้ short-chain deactivated (SCD) reversed-phase column (i.d. 250 × 4.6 mm) ที่ต่อด้วย post-column reactor เพื่อออกซิไดส์ LMG และ LGV ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีให้เปลี่ยนเป็นสารที่มีสีคือ MG และ GV ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ของ LMG, MG, LGV และ GV ที่ความเข้มข้น 10 μg/kg ในเนื้อปลาดุกมีค่าเท่ากับ 75.4 ± 3.0, 61.3 ± 4.1, 72.6 ± 3.7 และ 87.9 ± 2.5 (n = 4) ในเนื้อปลาเทร้าท์มีค่าเท่ากับ 82.6 ± 2.3, 48.6 ± 1.8, 72.1 ± 2.1 และ 83.8 ± 4.6 (n = 4)

ในปี ค.ศ. 1998 Tarbin และคณะ[2] ได้เสนอวิธีการสกัดและคลีนอัพเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ malachite green และ crystal violet และ metabolites (leucomalachite green และ leucocrystal violet) ในเนื้อปลาเทร้าท์ และตรวจวิเคราะห์แบบ screening ด้วยเทคนิค HPLC-visible ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS (ESP-MS) โดยใช้คอลัมน์ของ lead(IV) oxide สำหรับ on-line oxidation เพื่อเปลี่ยน LMG และ LCV เป็น MG และ CV ตามลำดับ ก่อนเข้าตรวจวัด

ด้วย visible detector การวิเคราะห์ที่ระดับ 2 μg/kg มีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (recovery) อยู่ในช่วง 66-116% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าเท่ากับ 1-17% ส่วนการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS (ESP-MS) มี recovery อยู่ในช่วง 61-94% และ RSD 4-15%

ในปี ค.ศ. 2003 Bergwerff และ Scherpenisse [4] ได้เสนอวิธีสกัด MG จากเนื้อปลาเพาะเลี้ยงด้วย McIlvaine buffer (pH 3.0) – acetonitrile และนำไปคลีนอัพด้วย aromatic sulfonic acid solid-phase extraction column หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ liquid chromatography/ tandem mass spectrometry ชนิด electrospray ionization (LC-ESI-MS-MS) มีการเติม ascorbic acid และ N,N,N',N',-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride เพื่อลด de-methylation ของ MG และยังคงใช้ PbO_2 post-column oxidation ก่อนที่ตัวอย่างจะเข้าสู่ visible detector (620 nm) หรือ LC-MS/MS โดยใช้ multiple reaction monitoring (MRM) mode สามารถตรวจวิเคราะห์ MG หรือ LMG ที่ระดับ 2.5-2000 μg/kg ใน catfish, eel, rainbow trout, salmon, tropical prawn, turbot โดยมี detection limit 1 μg/kg สำหรับ HPLC และ 0.2 μg/kg สำหรับ LC-MS/MS มี recovery ของ LMG เท่ากับ 86 $\pm$ 15% สำหรับกุ้ง และ 105 $\pm$ 14% สำหรับปลาไหล นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าการแช่เยือกแข็งและละลาย การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C มีผลกระทบต่อ recovery ของ MG และ LMG

ในปี ค.ศ. 2005 Scherpenisse และ Bergwerff [6] ได้เสนอวิธีหาปริมาณ LMG ในเนื้อปลาเทร้าท์และแพนกาเซียสด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยสกัดเนื้อปลาด้วย McIlvaine buffer-acetonitrile แล้วคลีนอัพด้วย aromatic sulfonic solid phase extraction column จากนั้นเปลี่ยน LMG ให้เป็น MG โดย post-column oxidation ด้วย PbO_2 และวิเคราะห์ปริมาณด้วย LC-MS/MS โดยใช้ multiple reaction monitoring (MRM) mode (m/z 329 $\rightarrow$ m/z 313) detection limit = 0.11 μg/kg quantification limit = 0.18 μg/kg และ recovery = 66% ที่ระดับ 0.4 μg/kg และ 112% ที่ระดับ 0.1 μg/kg

ในปีเดียวกันนี้ Valle และคณะ[7] ได้พัฒนาวิธีการหาปริมาณของ MG และ LMG ในเนื้อปลาแซลมอนโดยใช้ oxidative pre-column เปลี่ยน LMG ให้เป็น MG ก่อนที่จะตรวจวัดปริมาณโดยเทคนิค liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC-APCI-MS) recovery ของ MG และ LMG ในเนื้อปลาแซลมอนมีค่าเท่ากับ 85 % และ 70 % ตามลำดับ (ที่ 2 μg/kg) ค่า RSD ของ LMG และ MG มีค่าเท่ากับ 1.3 % และ 3.1 % ตามลำดับ

นอกจากนี้ Mitrowska และคณะ[11] ได้ใช้เทคนิค liquid chromatography-visible/ fluorescence detection ในการหาปริมาณ MG และ LMG ในเนื้อปลาคราฟท์ โดยนำเนื้อปลามาสกัดด้วย acetonitrile-buffer mixture และ dichloromethane คลีนอัพด้วย SCX solid phase extraction column และวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยไม่ใช้ PbO_2 post column ตรวจวัด

MG ด้วย visible (620 nm) และตรวจวัด LMG ด้วย FLD (λ_{ex} = 265 nm และ λ_{em} = 360 nm) MG และ LMG มีค่าเท่ากับ 62.8 % และ 91.5 % ตามลำดับ (ที่ 2 μg/kg) ค่า RSD ของ MG และ LMG มีค่าเท่ากับ 8.8 % และ 6.1 % ตามลำดับ วิธีนี้ให้ recovery ตั้งแต่ 60.4-63.5% ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, และ 2 μg/kg สำหรับ MG และ 89.0-91.5% สำหรับ LMG มีค่า RSD เท่ากับ 10.9 และ 8.6% ตามลำดับ detection limit เท่ากับ 0.15 และ 0.13 μg/kg และ quantification limit เท่ากับ 0.37 และ 0.32 μg/kg สำหรับ MG และ LMG ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตาม minimum required performance limit (MRPL) 2 μg/kg

ในปี ค.ศ. 2006 Lee และคณะ[12] ได้เสนอวิธีหาปริมาณ MG และ LMG ในส่วนที่กินได้ของเนื้อปลาทองด้วยวิธี liquid chromatography-ion trap mass spectrometry โดยใช้เทคนิค "time segment" และมี atrazine-d_5 เป็น internal standard การสกัด MG และ LMG ทำโดยใช้ perchloric acid และ acetonitrile ตามด้วย dichloromethane คลีนอัพด้วย Strata-x polymeric solid-phase extraction column ระบบ HPLC คือ reversed-phase, gradient mode และส่วน MS/MS เป็นแบบ multiple-reaction-monitoring, positive ESI-MS linearity ของ matrix calibration curve อยู่ในช่วง 5-500 ng/mL สำหรับ MG และ 1-100 ng/mL สำหรับ LMG recovery มีค่ามากกว่า 71% สำหรับ MG ที่ระดับ 2, 10, 30 ng/g และมากกว่า 89% สำหรับ LMG ที่ระดับ 0.4, 2, 6 ng/g RSD ไม่เกิน 8% detection limit เท่ากับ 0.13 ng/g สำหรับ MG และ 0.06 ng/g สำหรับ LMG

Halme และคณะ[13] ได้วิเคราะห์ MG และ LMG ในปลาเทร้าท์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS, positive-ion electrospray โดยใช้ LMG-D_5 เป็น internal standard ในการวิเคราะห์ LMG และ brilliant green (BG) เป็น internal standard ในการวิเคราะห์ MG ปรากฏว่าได้ recovery อยู่ในช่วง 58-65% (RSD = 7.8-11.2%) สำหรับ MG และ 59-68% (RSD = 9.7-16.9%) สำหรับ LMG และ detection limit เท่ากับ 0.13 และ 0.16 μg/kg สำหรับ MG และ LMG ตามลำดับ ส่วน quantification limit เท่ากับ 0.22 และ 0.27 μg/kg ตามลำดับ

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ MG และ LMG ที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง
2. พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ MG และ LMG ที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์ MG และ LMG ที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงที่ถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว หรือง่ายขึ้น

2. ได้ข้อมูลสถานะการดกค้างของ MG และ LMG ในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง

บทที่ 2
การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค LC-MS/MS

2.1 การทดลอง

2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

จากข้อมูล วิธีวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ ที่ค้นคว้าจากเอกสารต่างๆข้างต้น ได้นำไปสู่การวางแผนการวิเคราะห์ดังนี้

หลักการของวิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์หาปริมาณ MG และ LMG ด้วยเทคนิค LC-MS/MS, ESI-positive ion MRM โดยใช้ crystal violet (CV) เป็น internal standard

สภาวะที่เหมาะสมของ LC-MS/MS

นำ MG, LMG, และ CV standards มา tune เครื่อง LC-MS/MS เพื่อหา optimum conditions ในการวิเคราะห์

2.1.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG ตกค้างในเนื้อปลาด้วยเทคนิค LC-MS/MS (sample extraction and clean-up)

ได้ทำการทดลองเพื่อหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม โดยออกแบบการเตรียมตัวอย่างทดสอบความใช้ได้โดยการเตรียม spiked sample ที่ระดับ 5, 100, 500 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ ดำเนินการวิเคราะห์ความใช้ได้ของวิธีพิจารณาจากค่า % recovery และ % RSD ตัวอย่าง คือ ปลาทับทิม ซึ่งเป็นปลาเลี้ยง และมีความเป็นไปได้ในการที่จะใช้ malachite green ใส่ในบ่อปลา

วิธีที่ 1 (E1) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย 5% TCA

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 $\pm$ 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต TCA 5% ใส่ลงไป 2.00 mL
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง

- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ใช้ Pasteur pipet ดูดส่วนใส กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 5, 100, 500 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 2 (E2) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย milli Q H_2O ตามด้วย Acetonitrile

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต milliQ H_2O 1.00 mL ใส่ลงไป
- ปิเปต acetonitrile 7.00 mL ใส่ลงไป
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง
- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ใช้ autopipet ดูดส่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.2 M NH_4OAc 1.00 mL (ด้วยการปิเปต)
- กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 5, 100, 500 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 3 (E3) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย 5% TCA ตามด้วย Acetonitrile

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต TCA 5% ใส่ลงไป 2.00 mL, vortex-mixed
- ปิเปต acetonitrile 6.00 mL ใส่ลงไป
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง
- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ใช้ autopipet ดูดส่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:1) ปริมาตร 1.00 mL (ด้วยการปิเปต), vortex-mixed
- กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 5, 10, 20 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการ

เตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 4 (E4) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย 5% TCA ตามด้วย Acetonitrile และ N_2 purge ที่ 50 °C

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต TCA 5% ใส่ลงไป 2.00 mL, vortex-mixed
- ปิเปต acetonitrile 6.00 mL ใส่ลงไป
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง
- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ใช้ autopipet ดูดส่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 ใน water bath ที่ 40-50 °C จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:1) ปริมาตร 1.00 mL (ด้วยการปิเปต), vortex-mixed
- กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 5, 10, 20 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 5 (E5) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม Ammonium acetate buffer pH 4.5 : Acetonitrile (1:1)

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:3) ปริมาตร 8.00 mL ใส่ลงไป, vortex-mixed
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง
- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ใช้ autopipet ดูดส่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 ใน water bath ที่ 40-50 °C จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:1) ปริมาตร 1.00 mL (ด้วยการปิเปต), vortex-mixed
- กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 5, 10, 20 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 6 (E6) **เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม Ammonium acetate buffer pH 4.5 : Acetonitrile (1:3) และเติม Crystal Violet (CV) เป็น internal standard**

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 $\pm$ 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:3) ปริมาตร 8.00 mL ใส่ลงไป, vortex-mixed
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง
- ปิดปากขวดด้วย parafilm แล้ว incubate พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 500 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- ใช้ autopipet ดูดส่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 จนแห้ง
- เติม 50 µL ของ 100 ppb crystal violet (CV) เพื่อเป็น 5 ppb internal standard และเติม 950 µL 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:1), vortex-mixed
- กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 1, 2, 3, 5 ppb ระดับละ 5 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 7 (E7) **เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม Ammonium acetate buffer pH 4.5 : Acetonitrile (1:3) และใช้เตาอบไมโครเวฟช่วยในการสกัด เติม Crystal violet (CV) เป็น internal standard**

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 $\pm$ 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปต 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:3) ปริมาตร 8.00 mL ใส่ลงไป, vortex-mixed
- Homogenize ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง
- ปิดปากขวดด้วย parafilm อย่าให้สนิท (partially covered) แล้วนำไปใส่ในเตาอบไมโครเวฟ ที่ 270 watts เป็นเวลา 5 นาที ในอ่างแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้วสูง 2 นิ้ว ที่บรรจุน้ำ 600 mL
- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- ใช้ autopipet ดูดส่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 จนแห้ง

- เติม 50 µL ของ 100 ppb crystal violet (CV) เพื่อเป็น 5 ppb internal standard และเติม 950 µL 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acetonitrile (1:1), vortex-mixed
- กรองผ่าน 0.45 µm syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 1, 2, 3, 5 ppb ระดับละ 5 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีที่ 8 (E8) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม Ammonium acetate buffer pH 4.5 : Acetonitrile (1:3) และใช้เตาอบไมโครเวฟช่วยในการสกัด เติม Crystal violet (CV) เป็น internal standard สร้าง calibration curve บนเมทริกซ์

ชั่งเนื้อปลา (หรือกุ้ง) สดที่บดแล้ว 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวดแก้วรูปทรงกระบอกขนาด 50 mL เติมตัวทำละลายผสม 0.05 M ammonium acetate pH 4.5 : acetonitrile (1:3) ปริมาตร 8.00 mL นำไปโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง ปิดปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์มโดยเผยอบางส่วน นำไปวางในอ่างแก้วกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว ที่บรรจุน้ำ 600 mL นำอ่างทั้งชุดใส่ในเตาอบไมโครเวฟ ให้คลื่นไมโครเวฟที่ 270 watts เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4400g เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสมา 4.00 mL ใส่ในขวดอีกใบหนึ่ง นำไปพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C จนแห้ง ปิเปต internal standard CV (100 µg/L) ปริมาตร 50 µL และตัวทำละลาย 0.05 M ammonium acetate pH 4.5 : acetonitrile (1:1) ปริมาตร 950 µL ผสมให้เข้ากันดี นำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 µm ลงสู่ขวด HPLC vial

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ

วิธีวิเคราะห์คือ standard addition method และ internal standard calibration curve โดยเตรียมชุดตัวอย่างดังนี้

ตัวอย่าง 2.00 g

ตัวอย่าง 2.00 g + 1 µg/kg MG + 1 µg/kg LMG

ตัวอย่าง 2.00 g + 2 µg/kg MG + 2 µg/kg LMG

ตัวอย่าง 2.00 g + 3 µg/kg MG + 3 µg/kg LMG

ตัวอย่าง 2.00 g + 5 µg/kg MG + 5 µg/kg LMG

นำ signal ของชุดตัวอย่างมาสร้าง internal standard calibration curve และหาปริมาณ MG และ LMG ในตัวอย่างจากสมการของ curve

Linear equation: $y = mx + b$

ปริมาณ MG (หรือ LMG) = $-b/m$

2.2 ผลการทดลอง

2.2.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

HPLC: Agilent 1100

Column: Higgins 3 x 150 mm, 5 μm

Mobile phase: A: 0.05 M Ammonium acetate pH 4.5

B: Acetonitrile

Gradient mode:

Time (min)	A(%)	B(%)
0	95	5
6	5	95
8	5	95
9	95	5
12	95	5

Injection volume: 25 μL

Flow rate: 800 μL/min; split 275:525

Column temperature: 40°C

Mass spectrometer: API 3000

Scan type: MRM

Polarity: positive

Ion source: turbo spray

Ion pairs: MG 329.3/208.2, 329.3/313.1

LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3

CV(internal standard) 372.2/356.3

ข้อมูลจากการทดลองแสดงในภาคผนวก ก

Linearity ของ calibration curve (internal standard)

สมบัติที่แสดง linearity ของ calibration curve ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 Linearity ของ calibration curve

Standard concentration range: 0-30 μg/L

compound	mass	Linear equation	r
MG	329.3/313.2	y = 0.0643x + 0.0289	0.9994
	329.3/208.4	y = 0.0182x + 0.00738	0.9992
LMG	331.3/165.4	y = 0.0125x + -0.00654	0.9968
	331.3/239.4	y = 0.129x + -0.0586	0.9980

ข้อมูลจากการทดลองแสดงในภาคผนวก ข

2.2.2 ผลการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG ตกค้างในเนื้อปลาด้วยเทคนิค LC-MS/MS (sample extraction and clean-up)

จากการวิเคราะห์ spiked sample และหาปริมาณ MG และ LMG ด้วยวิธี external standard calibration method กับการเตรียมตัวอย่างแบบ E 1-5 และวิธี internal standard calibration method กับการเตรียมตัวอย่างแบบ E 6 ยังไม่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี โดยพิจารณาจาก %recovery ที่ต่ำ ไม่อยู่ในช่วง 40-120% ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ที่ความเข้มข้นระดับนี้

ส่วนการเตรียมตัวอย่างแบบที่ 7 นั้น ได้นำเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมด้วย โดยใช้เตาอบไมโครเวฟ และหาปริมาณด้วยวิธี internal standard calibration method ปรากฏว่าได้ผลดีกว่าวิธีอื่นๆ และใช้เวลาสั้น โดยให้ %recovery ระหว่าง 40-60% แต่ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ

ข้อมูลจากการทดลองแสดงในภาคผนวก ค

ผลการเตรียมตัวอย่างแบบที่ 8 (E8) เป็นดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ MG และ LMG ในตัวอย่างชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง: ปลาแซลมอน

compound	mass	Linear equation	r	Accuracy (%recovery)	Precision (%RSD)
MG	329.3/313.2	Y=0.02x + -0.00124	0.9991	81.8-115	12.46
	329.3/208.4	Y=0.0669x + -0.00215	0.9996	87.1-108	6.45
LMG	331.3/165.4	Y=0.00758x + 0.000421	0.9858	93.9-112	11.06
	331.3/239.4	Y=0.102x + -0.0169	0.9913	95.9-116	7.77

ตัวอย่าง: ปลาทับทิม

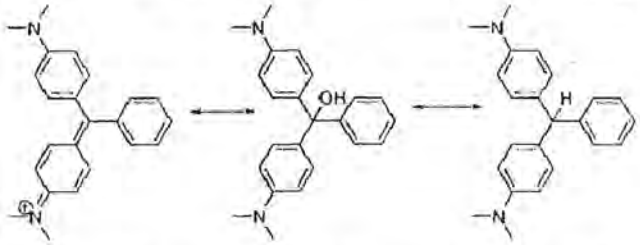
compound	mass	Linear equation	r	Accuracy (%recovery)
MG	329.3/313.2	Y=0.00966x + -0.000237	0.9579	78.6-103
	329.3/208.4	Y=0.036x + -0.00363	0.9892	68.8-106
LMG	331.3/165.4	Y=0.0207x + -0.00431	0.9917	66.8-122
	331.3/239.4	Y=0.25x + -0.0645	0.9829	83.8-110

ตัวอย่าง: กุ้ง

compound	mass	Linear equation	r	Accuracy (%recovery)
MG	329.3/313.2	Y=0.0178x + 0.00274	0.9792	83.6-107
	329.3/208.4	Y=0.0618x + 0.0169	0.9805	93.4-103
LMG	331.3/165.4	Y=0.00562x + -0.00287	0.9716	92.5-123
	331.3/239.4	Y=0.00552x + -0.00581	0.9977	93.0-120

2.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสารทั้งสี่เพิ่มเดิมพบว่า MG ซึ่งมีสีฟ้า-เขียว หรืออาจเรียก chromatic MG เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ของสัตว์น้ำ เช่น ปลา จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป carbinol MG อยู่ที่ผิวนอกของเซลล์ และถูกเปลี่ยนไปเป็น leucomalachite green (LMG) ด้วยเมตะบอลิซึมของปลา รูปต่างๆ ของ MG แสดงในรูปที่ 2-1 เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค LC-MS พบว่า carbinol MG จะมีค่า retention time เท่ากับ LMG (co-elution) นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายมาตรฐาน MG เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มี ammonium acetate จะปรากฏ carbinol form อยู่ด้วยเสมอ ปรากฏการณ์เช่นนี้มีผลให้ค่า % recovery ของ MG ต่ำเกินไปและของ LMG สูงเกินไปอยู่เสมอ



Chromatic MG มีสี | Carbinol Base ไม่มีสี | Leuco MG ไม่มีสี

รูปที่ 2-1 โครงสร้างเมตะบอไลต์ของ MG

ด้วยเหตุที่มีการรบกวนจากเมทริกซ์สูงเช่นนี้ ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่เป็นที่น่าพอใจ จึงได้ออกแบบการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 8 และวิธีวิเคราะห์หาปริมาณคือ standard addition method และ internal standard calibration curve หรืออีกนัยหนึ่งคือ การสร้าง internal standard calibration curve บนเมทริกซ์ เพื่อเป็นการกำจัดผลกระทบจากเมทริกซ์ ซึ่งทำให้ผลการวิเคราะห์ดี โดยมี % recovery อยู่ในช่วง 87-108 % (MG), 96-116 % (LMG) และ % RSD เท่ากับ 6.45 และ 7.77 ตามลำดับ สำหรับปลาแซลมอน, % recovery อยู่ในช่วง 69-106 % (MG), 84-110 % (LMG) สำหรับปลาทับทิม, % recovery อยู่ในช่วง 93-103 % (MG), 93-120 % (LMG) สำหรับกุ้ง

128102824

บทที่ 3
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

3.1 สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ MG และ LMG พร้อมกันในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ให้มีความถูกต้องแม่นยำสูง ด้วยการเตรียมตัวอย่างที่มีขั้นตอนง่ายและรวดเร็วขึ้น ใช้เตาอบไมโครเวฟในการสกัดและคลีนอัพ และวิเคราะห์ MG และ LMG ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีสารคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet, CV) เป็น internal standard ที่ ionpairs ดังนี้ : MG 329.3/208.2, 329.3/313.1, LMG 331.3/165.4, 331.3/239.3 และ CV(internal standard) 372.2/356.3

ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

ผลการวิเคราะห์ดี โดยมี % recovery อยู่ในช่วง 87-108 % (MG), 96-116 % (LMG) และ % RSD เท่ากับ 6.45 และ 7.77 ตามลำดับ สำหรับปลาแซลมอน, % recovery อยู่ในช่วง 69-106 % (MG), 84-110 % (LMG) สำหรับปลาทับทิม, % recovery อยู่ในช่วง 93-103 % (MG), 93-120 % (LMG) สำหรับกุ้ง

3.2 ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านสารตกค้างในอาหารเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตด้านความปลอดภัยในอาหารเป็นไปในแนวทางที่เรียกว่า "chasing zero" ซึ่งต้องอาศัยเครื่องมือขั้นสูง ซึ่งการพิจารณาให้ทุนวิจัยควรคำนึงถึงงบประมาณทางครุภัณฑ์ขั้นสูงเหล่านี้ด้วย จึงจะทำให้งานวิจัยเป็นงานเชิงรุกเพื่อแก้ ปัญหาในด้านการวิเคราะห์อาหารในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมอันดับหนึ่งของประเทศ ได้อย่างฉับไว

บรรณานุกรม

1. Cho, B. P., Yang, T., Blankenship, L. R., Moody, J. D., Churchwell, M., Beland, F. A. and Culp, S. J., "Synthesis and characterization of N-demethylated metabolites of malachite green and leucomalachite green" ***Chem. Res. Toxicol*** 16, (2003) : 285-294.
2. Tarbin, J. A., Barnes, K. A., Bygrave, J. and Farrington, W. H., "Screening and confirmation of triphenylmethane dyes and their leuco metabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS" ***Analyst*** 123, (1998) : 2567-2571.
3. Rushing, L. G. and Thompson Jr, H. C., "Simultaneous determination of malachite green, gential violet and their leuco metabolites in catfish or trout tissue by high-performance liquid chromatography with visible detection" ***Journal of chromatography B*** 688, (1997) : 325-330.
4. Bergwerff, A. A. and Scherpenisse, P., "Determination of residues of malachite green in aquatic animals" ***Journal of chromatography B*** 788 (2003) : 351-359.
5. Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. "Toxicological effects of malachite green" ***Aquatic Toxicology*** 66 (2004) : 319-329.
6. Scherpenisse, P. and Bergwerff, A. A., "Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry" ***Analytica Chimica Acta*** 529 (2005) : 173-177.
7. Valle, L., Diaz, C., Zanocco, A. L. and Richter, P., "Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry" ***Journal of Chromatography A*** 1067 (2005) : 101-105
8. http://www.fisheries.go.th /quality/knowledge/malachite.htm
9. รัตนา ลิมปสถิรกิจ "การใช้เทคนิคไมโครเวฟไดเจสชันในการเตรียมตัวอย่างประเภทอาหารเพื่อการวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ตกค้าง" โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2544)

11. Mitrowska, K., Posyniak, A., Zmudzki, J., "Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescene detection" ***Journal of Chromatography A*** 1089 (2005) : 187-192
12. Cai, Z., Lee, K. C., Wu, J. L., Cai, Z., "Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry" ***Journal of Chromatography B*** 843 (2005) : 247-251
13. http://en.wikipedia.org/wiki/Malachite_green
14. AOAC manual for Peer Verifield Methods program, Arlington, VA, Nov 1993

ภาคผนวก ก

Thursday, April 29, 2004, 10:37

Infusion Quantitative Optimization

MG

MS/MS Analysis, positive

Precursor ion: Base Peak Ion, Search Range: 320.000 to 340.000 (amu)
Product ion: Auto Select, Criteria:
From the most intensive: 6 peaks. Mass loss from precursor ion > 10.000(amu)
Min. mass for product ion: 100.000(amu). Threshold for product ion > 0.0(cps)

Quad 1 Resolution: Unit resolution, Quad 3 Resolution: Unit resolution

Malachite Green
Find base peak ion - Start Mass: 320.000 Stop Mass: 340.000
base peak ion mass: 329.277
Initial Q1 Scan

Target Compound	Mass(amu)	Intensity(cps) (5 MCA Average)
Malachite Green	329.261	434020

Parameter: DP Start: 1.0 Stop: 101.0 Step: 5.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.261	30.0	66.0	415806

Parameter: FP Start: 50.0 Stop: 375.0 Step: 10.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.261	200.0	340.0	456606

Parameter: DP Start: 1.0 Stop: 101.0 Step: 5.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.261	66.0	51.0	476633

Parameter: FP Start: 50.0 Stop: 375.0 Step: 10.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.261	340.0	340.0	498639

Final Q1 Scan

Target Compound	Mass(amu)	Intensity(cps) (5 MCA Average)
Malachite Green	329.265 (M^+)	518580

Final Q1MI Method: Malachite Green_QOpt_FinalQ1MI_Pos.dam

Target Compound: Malachite Green

Initial Product Mass	Initial Product Ion Intensity(cps) (26 MCA Sum)
313.144	143000
165.304	67000
208.188	51000
239.307	42000
241.379	34000
284.418	28000

Parameter: CE Start: 5.0 Stop: 130.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/165.304	30.0	81.0	6265
329.265/208.188	30.0	49.0	8448 ✓
329.265/239.307	30.0	107.0	5417
329.265/241.379	30.0	75.0	4678
329.265/284.418	30.0	63.0	2983
329.265/313.144	30.0	49.0	29567 ✓

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/165.304	15.0	8.0	7020

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/208.188	15.0	12.0	10513

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/239.307	15.0	14.0	5060

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/241.379	15.0	12.0	4298

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/284.418	15.0	16.0	2793

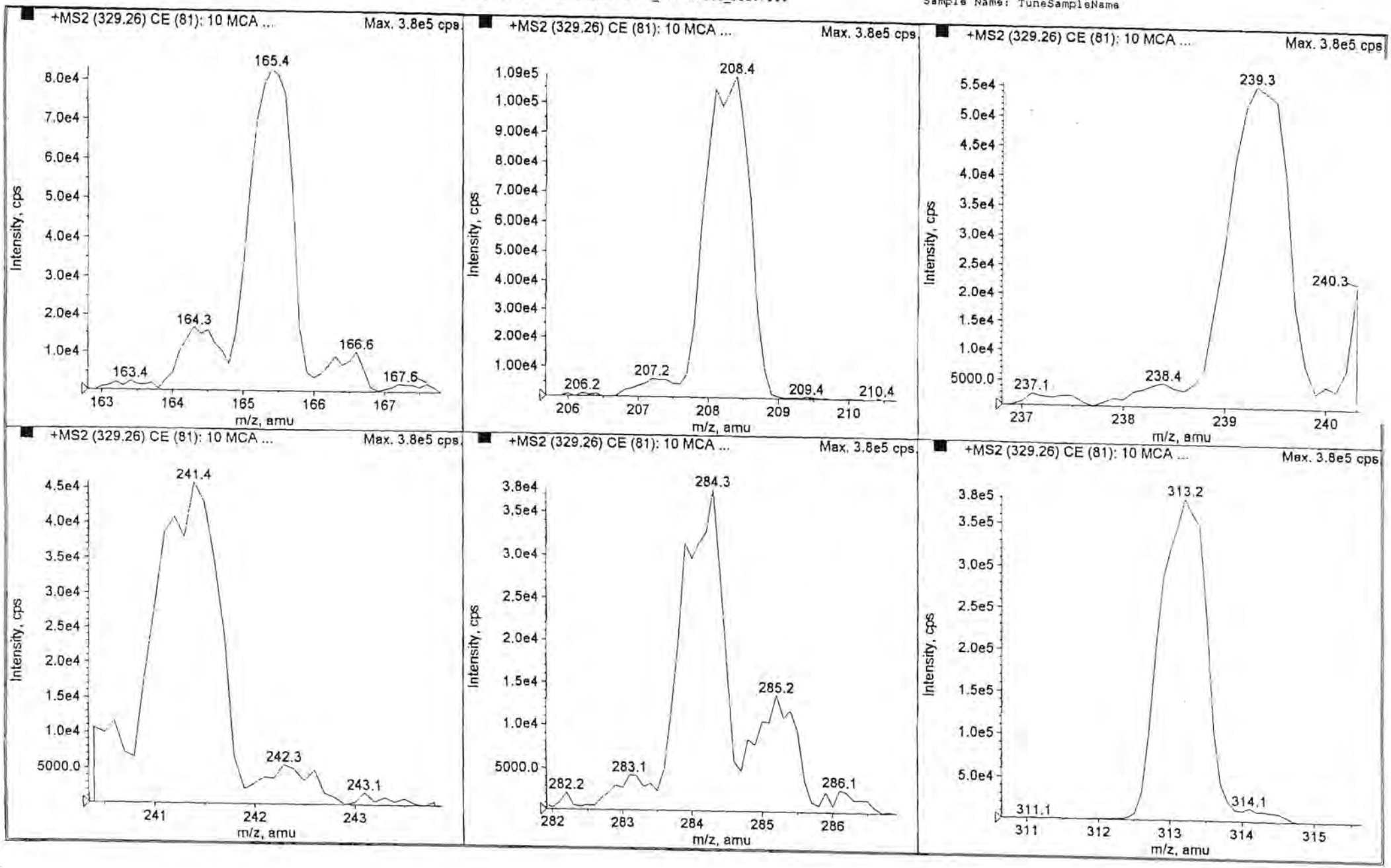
Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

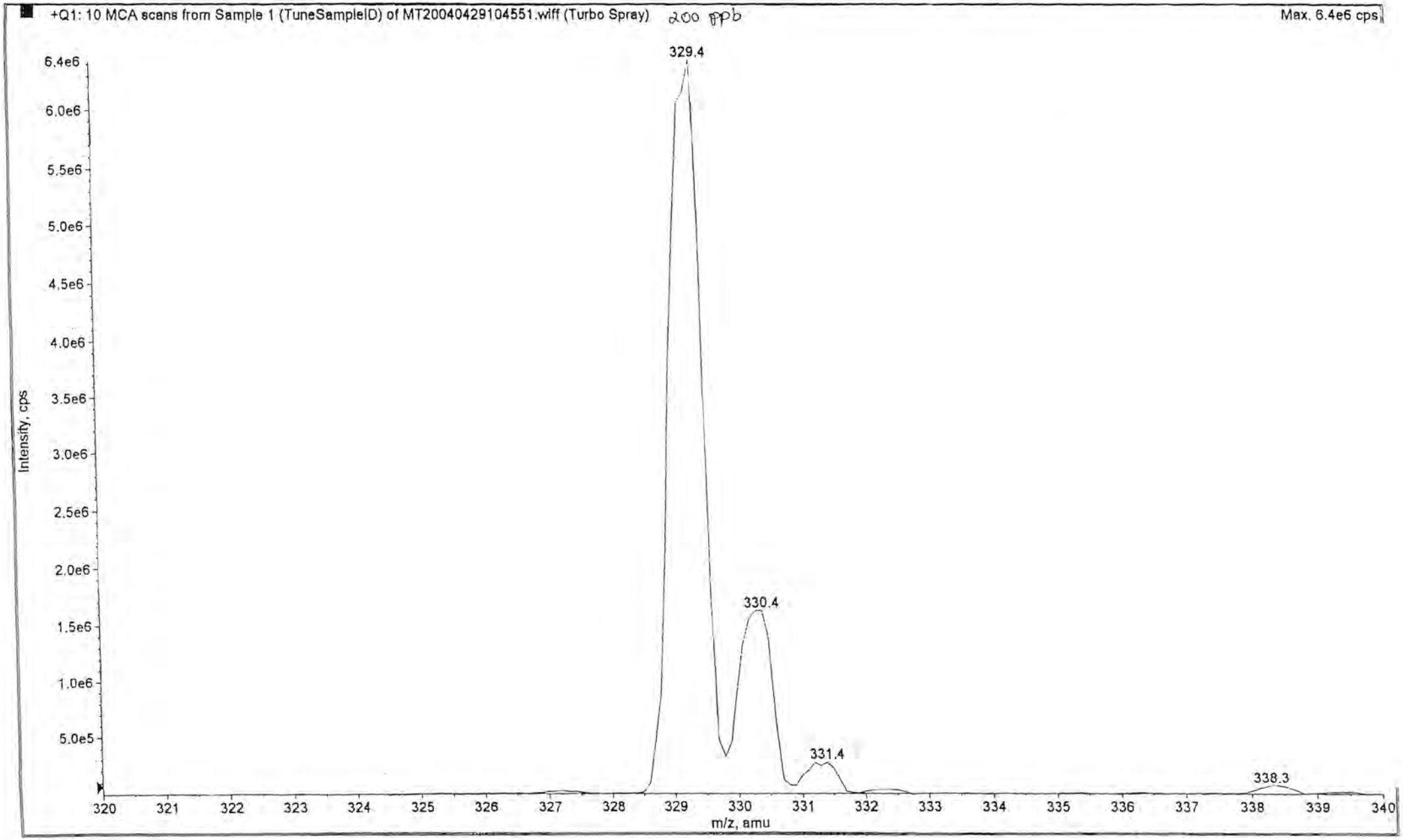
Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
329.265/313.144	15.0	18.0	30482

Final Product Ion Mass(amu)	Final Product Ion Intensity(cps) (10 MCA Average)
165.400	8310
208.400	10940
239.300	5550
241.400	4580
284.300	3780
313.200	38190

Optimal Product Ion Mass: 313.200 Optimal Product Ion Intensity: 38190

Final MRM Method: Malachite Green_QOpt_FinalMRM_Pos.dam
Quantitative optimization completed successfully.


+MS2 (329.26) CE (81): 10 MCA ...
Max. 3.8e5 cps.
Intensity, cps
m/z, amu
165.4
164.3
163.4
166.6
167.6
208.4
206.2
207.2
209.4
210.4
239.3
240.3
237.1
238.4
241.4
242.3
243.1
284.3
282.2
283.1
285.2
286.1
313.2
311.1
314.1


+Q1: 10 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20040429104551.wiff (Turbo Spray)
200 ppb
Max. 6.4e6 cps
329.4
330.4
331.4
338.3
Intensity, cps
6.4e6
6.0e6
5.5e6
5.0e6
4.5e6
4.0e6
3.5e6
3.0e6
2.5e6
2.0e6
1.5e6
1.0e6
5.0e5
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
m/z, amu

5 5

Thursday, April 29, 2004, 09:59

Infusion Quantitative Optimization LMG.

MS/MS Analysis, positive

Precursor ion: Base Peak Ion, Search Range: 330.000 to 334.000 (amu)
Product ion: Auto Select, Criteria:
From the most intensive: 6 peaks. Mass loss from precursor ion > 10.000(amu)
Min. mass for product ion: 100.000(amu). Threshold for product ion > 0.0(cps)

Quad 1 Resolution: Unit resolution, Quad 3 Resolution: Unit resolution

Leucomalachite Green
Find base peak ion - Start Mass: 330.000 Stop Mass: 334.000
base peak ion mass: 331.298
Initial Q1 Scan

Target Compound	Mass(amu)	Intensity(cps) (5 MCA Average)
Leucomalachite Green	331.292	1068260

Parameter: DP Start: 1.0 Stop: 101.0 Step: 5.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292	30.0	66.0	1102914

Parameter: FP Start: 50.0 Stop: 375.0 Step: 10.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292	200.0	370.0	1233240

Parameter: DP Start: 1.0 Stop: 101.0 Step: 5.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292	66.0	61.0	1239686

Parameter: FP Start: 50.0 Stop: 375.0 Step: 10.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292	370.0	370.0	1266790

Final Q1 Scan

Target Compound	Mass(amu)	Intensity(cps) (5 MCA Average)
Leucomalachite Green	331.292 (MH^+)	1245360

Final Q1MI Method: Leucomalachite Green_QOpt_FinalQ1MI_Pos.dam

Target Compound: Leucomalachite Green

Initial Product Mass	Initial Product Ion Intensity(cps) (26 MCA Sum)
239.294	747000
223.592	201000
315.792	174000
165.404	135000
194.769	119000
152.711	95000

Parameter: CE Start: 5.0 Stop: 130.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/152.711	30.0	125.0	1107
331.292/165.404	30.0	89.0	10633 ✓
331.292/194.769	30.0	57.0	2072
331.292/223.592	30.0	75.0	23945
331.292/239.294	30.0	43.0	160650 ✓
331.292/315.792	30.0	31.0	29815

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/152.711	15.0	8.0	1253

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/165.404	15.0	8.0	13193

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/194.769	15.0	10.0	2622

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/223.592	15.0	12.0	31933

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/239.294	15.0	14.0	144915

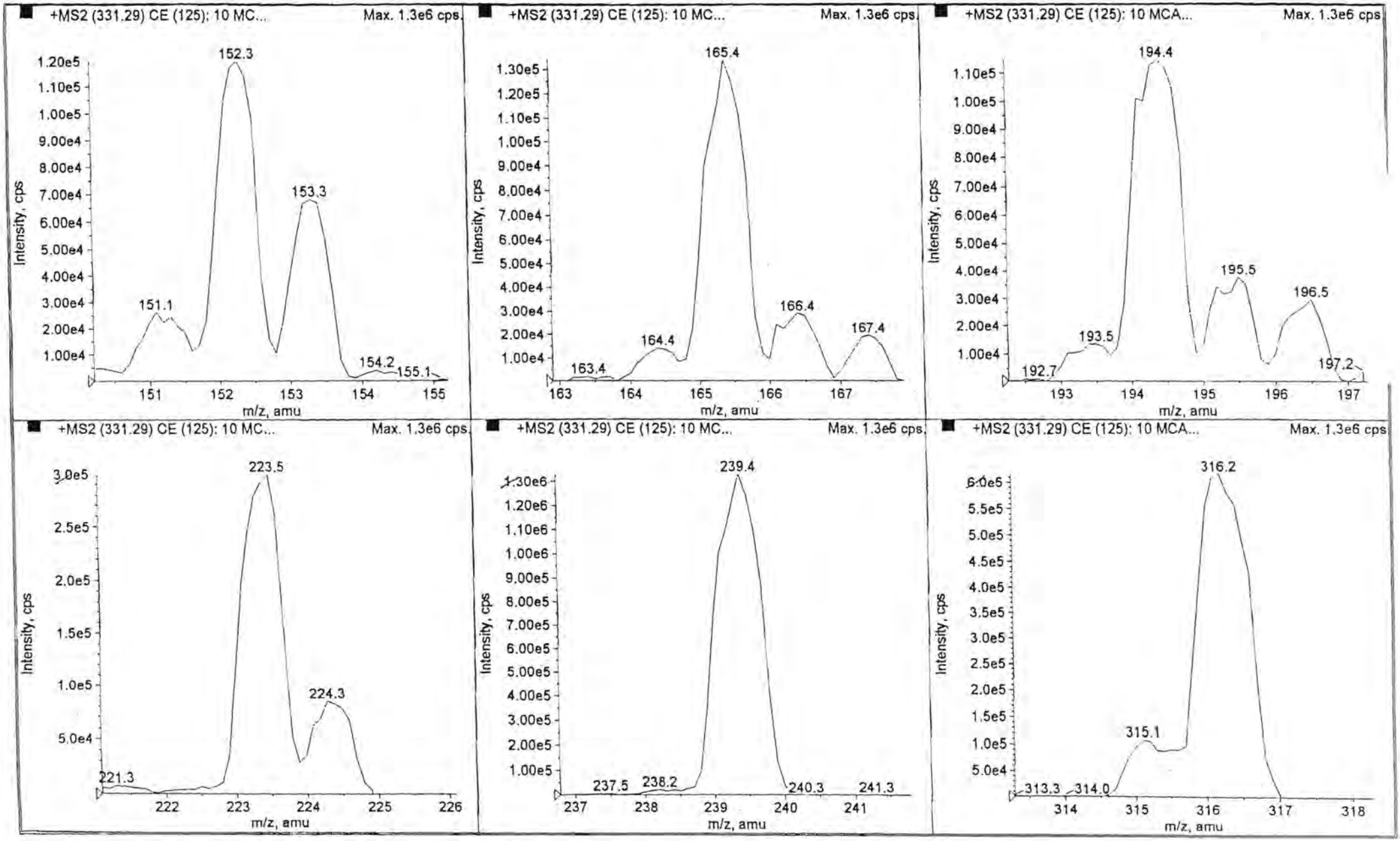
Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

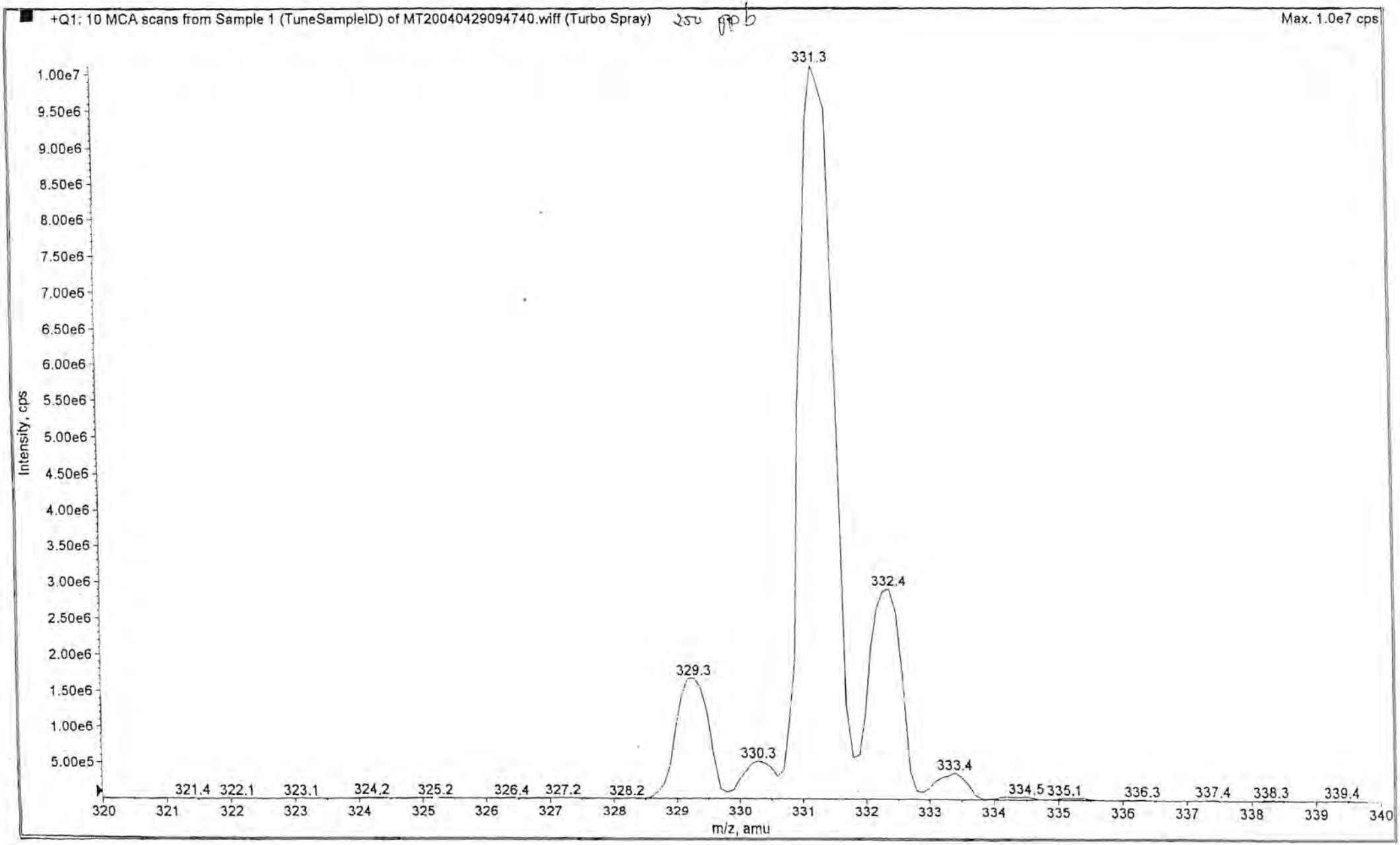
Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
331.292/315.792	15.0	20.0	38352

Final Product Ion Mass(amu)	Final Product Ion Intensity(cps) (10 MCA Average)
152.300	11950
165.400	13370
194.400	11470
223.500	29930
239.400	133150
316.200	61660

Optimal Product Ion Mass: 239.400 Optimal Product Ion Intensity: 133150

Final MRM Method: Leucomalachite Green_QOpt_FinalMRM_Pos.dam
Quantitative optimization completed successfully.


+MS2 (331.29) CE (125): 10 MC...
Max. 1.3e6 cps.
Intensity, cps
m/z, amu
152.3
153.3
151.1
154.2
155.1
+MS2 (331.29) CE (125): 10 MC...
Max. 1.3e6 cps.
165.4
166.4
167.4
164.4
163.4
+MS2 (331.29) CE (125): 10 MCA...
Max. 1.3e6 cps.
194.4
195.5
196.5
193.5
192.7
197.2
+MS2 (331.29) CE (125): 10 MC...
Max. 1.3e6 cps.
223.5
224.3
221.3
+MS2 (331.29) CE (125): 10 MC...
Max. 1.3e6 cps.
239.4
237.5
238.2
240.3
241.3
+MS2 (331.29) CE (125): 10 MCA...
Max. 1.3e6 cps.
316.2
315.1
313.3
314.0


+Q1: 10 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20040429094740.wiff (Turbo Spray)
250 ppb
Max. 1.0e7 cps
Intensity, cps
1.00e7
9.50e6
9.00e6
8.50e6
8.00e6
7.50e6
7.00e6
6.50e6
6.00e6
5.50e6
5.00e6
4.50e6
4.00e6
3.50e6
3.00e6
2.50e6
2.00e6
1.50e6
1.00e6
5.00e5
331.3
332.4
329.3
330.3
333.4
321.4
322.1
323.1
324.2
325.2
326.4
327.2
328.2
334.5
335.1
336.3
337.4
338.3
339.4
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
m/z, amu

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
372.236/235.329	15.0	12.0	13757

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
372.236/239.641	15.0	12.0	10817

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
372.236/268.320	15.0	14.0	10323

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
372.236/311.420	15.0	18.0	6828

Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
372.236/340.178	15.0	18.0	60453

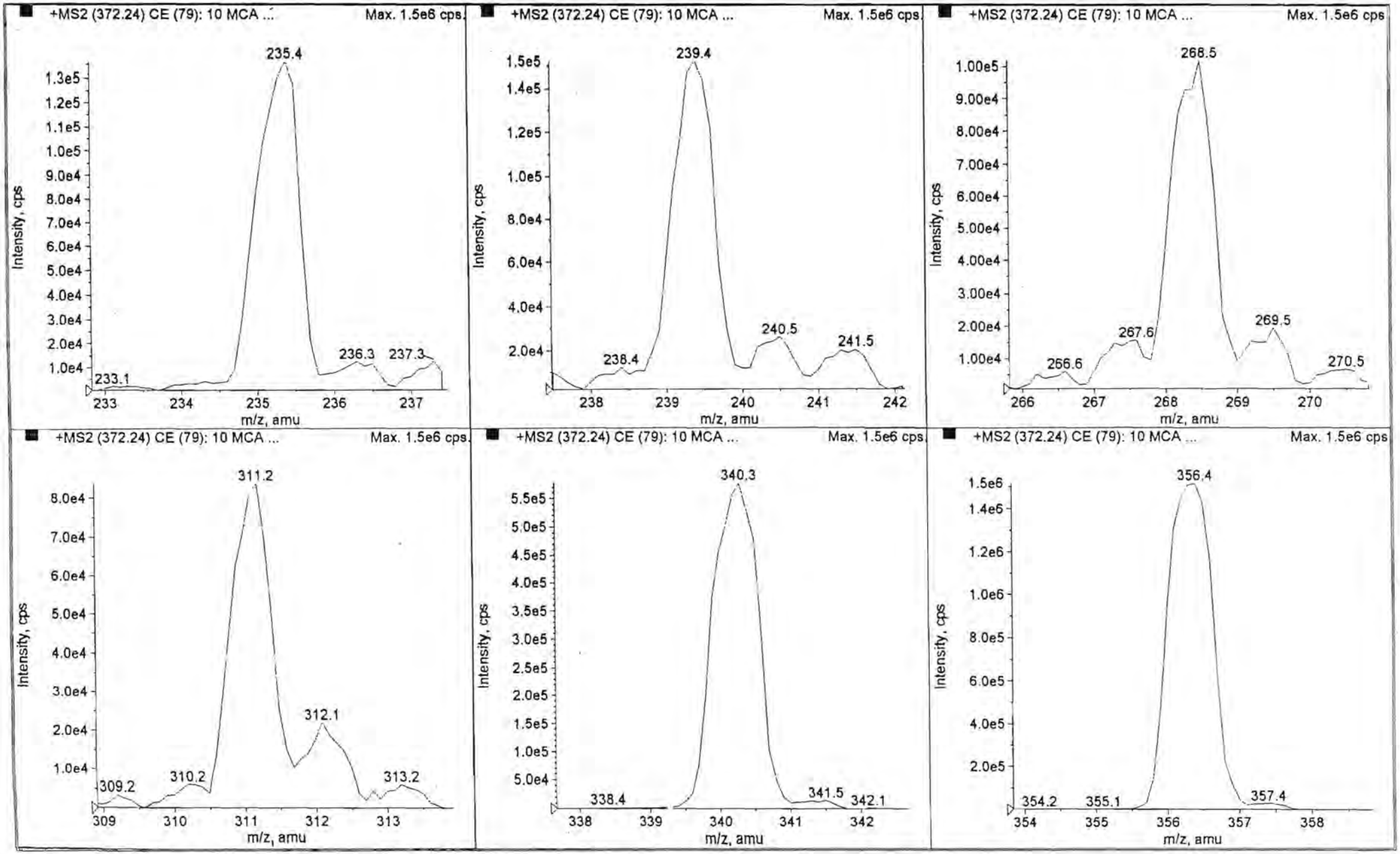
Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

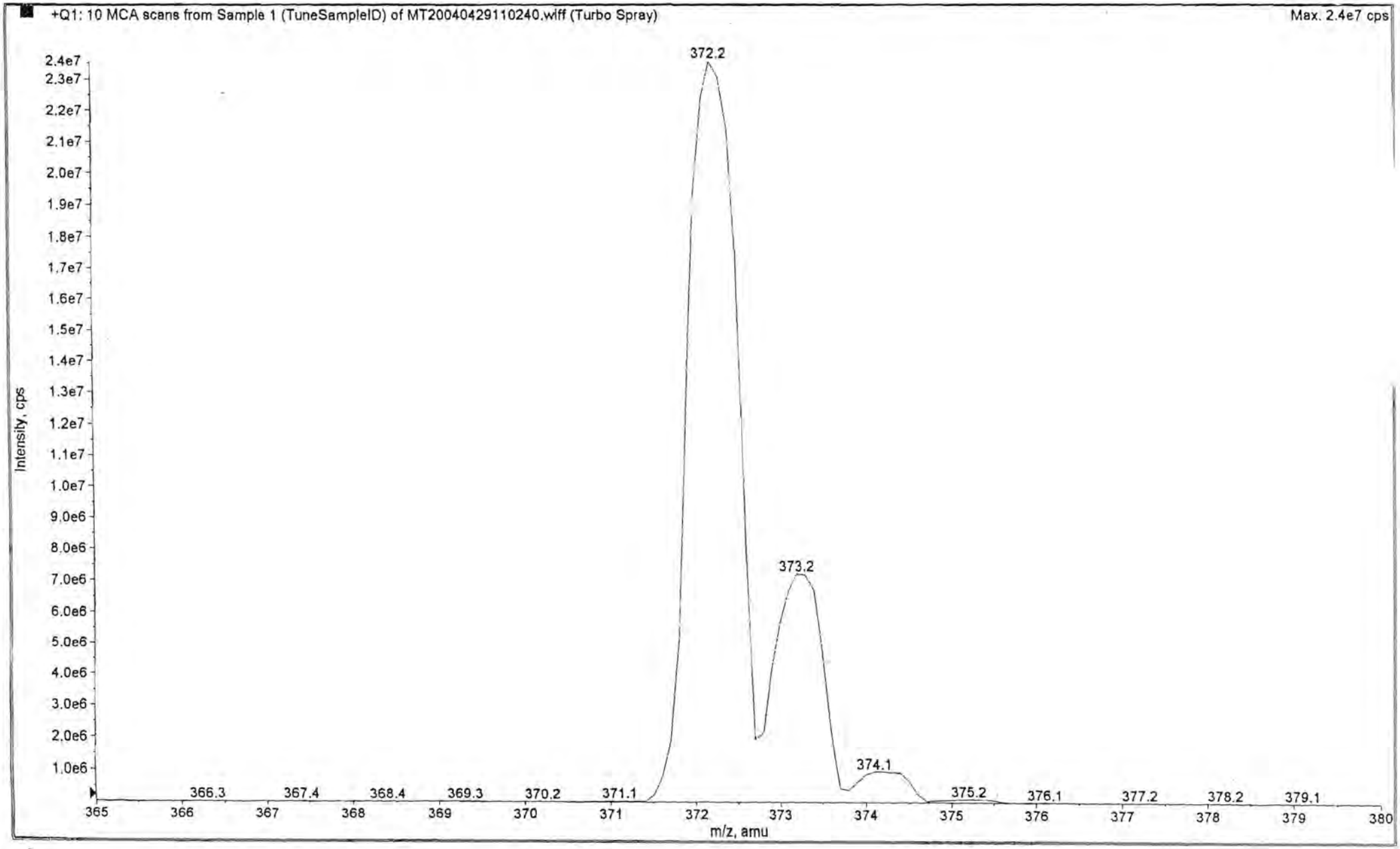
Masses(amu)	Current Value	New Value	Intensity(cps)
372.236/356.336	15.0	22.0	167337

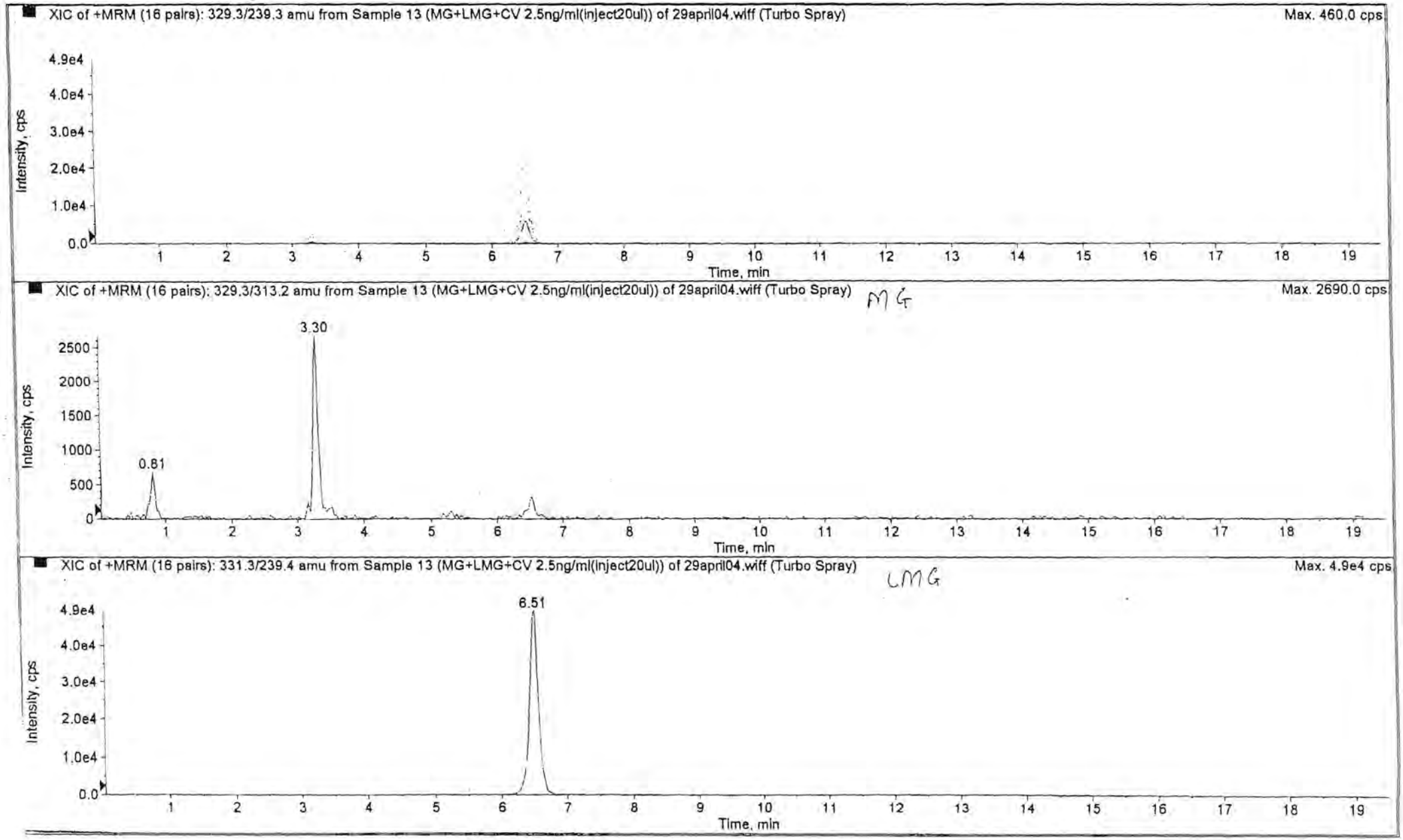
Final Product Ion Mass(amu)	Final Product Ion Intensity(cps) (10 MCA Average)
235.400	13610
239.400	15210
268.500	10160
311.200	8380
340.300	57720
356.400	151680

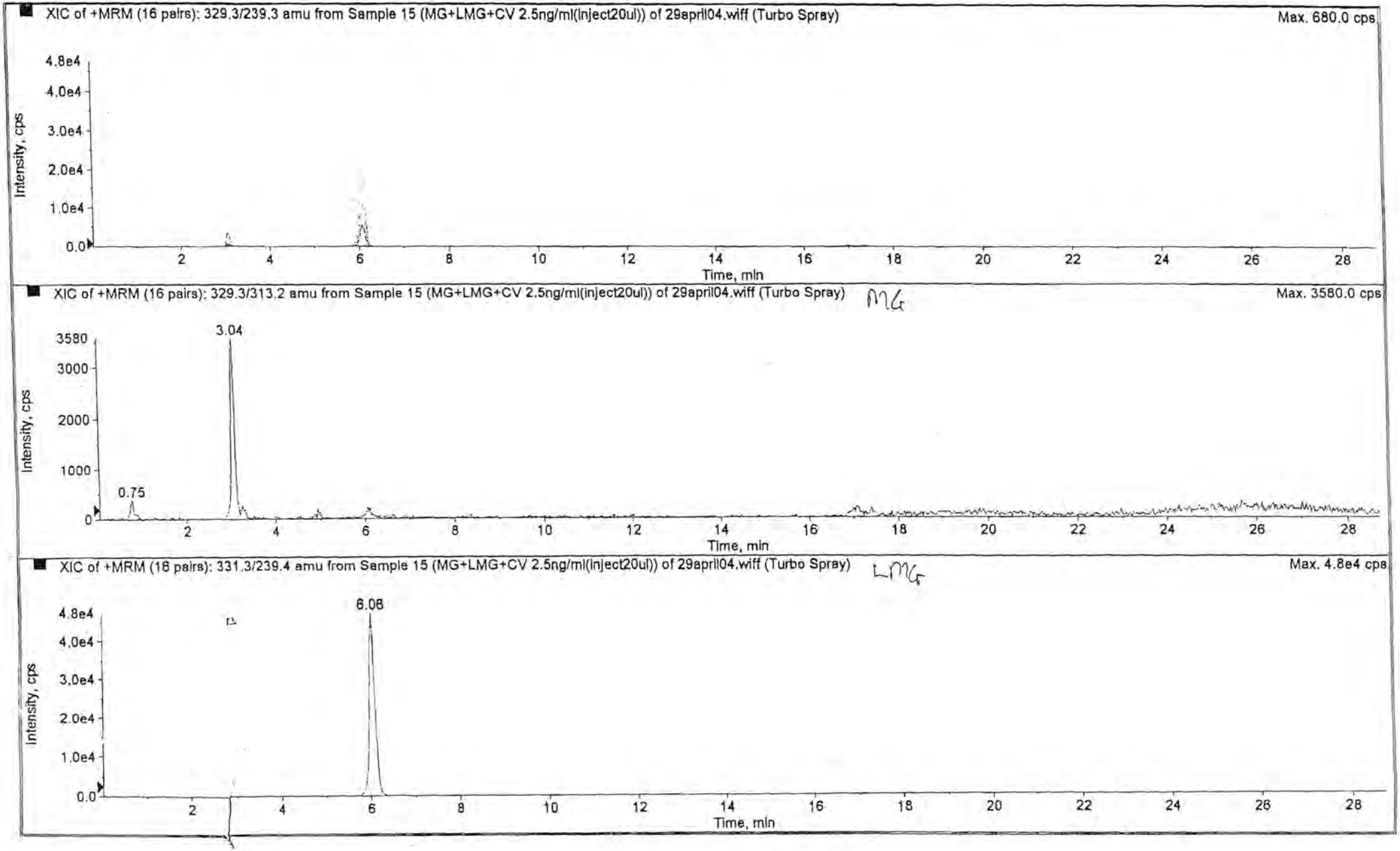
Optimal Product Ion Mass: 356.400 Optimal Product Ion Intensity: 151680

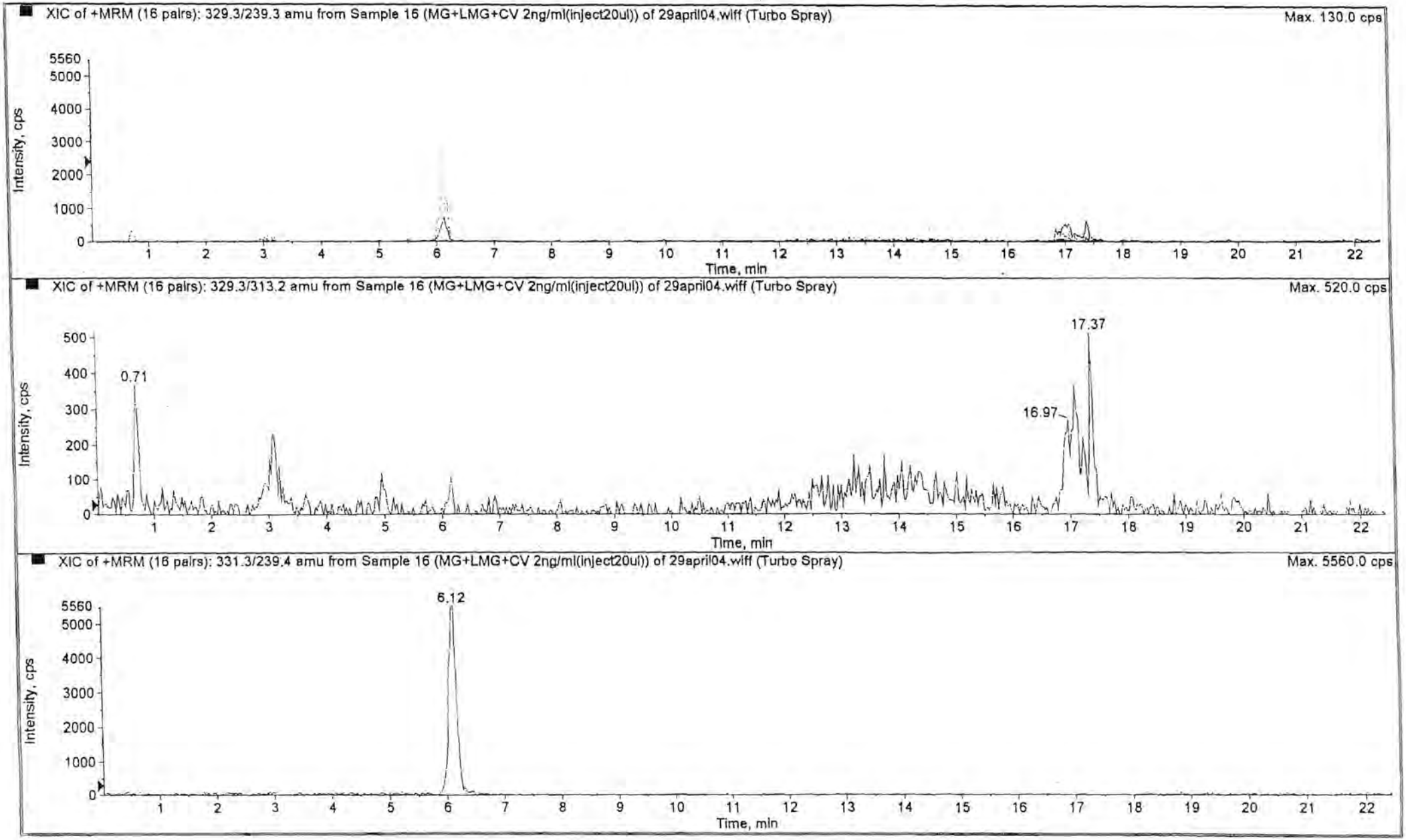
Final MRM Method: Crystal Violet_QOpt_FinalMRM_Pos.dam
Quantitative optimization completed successfully.

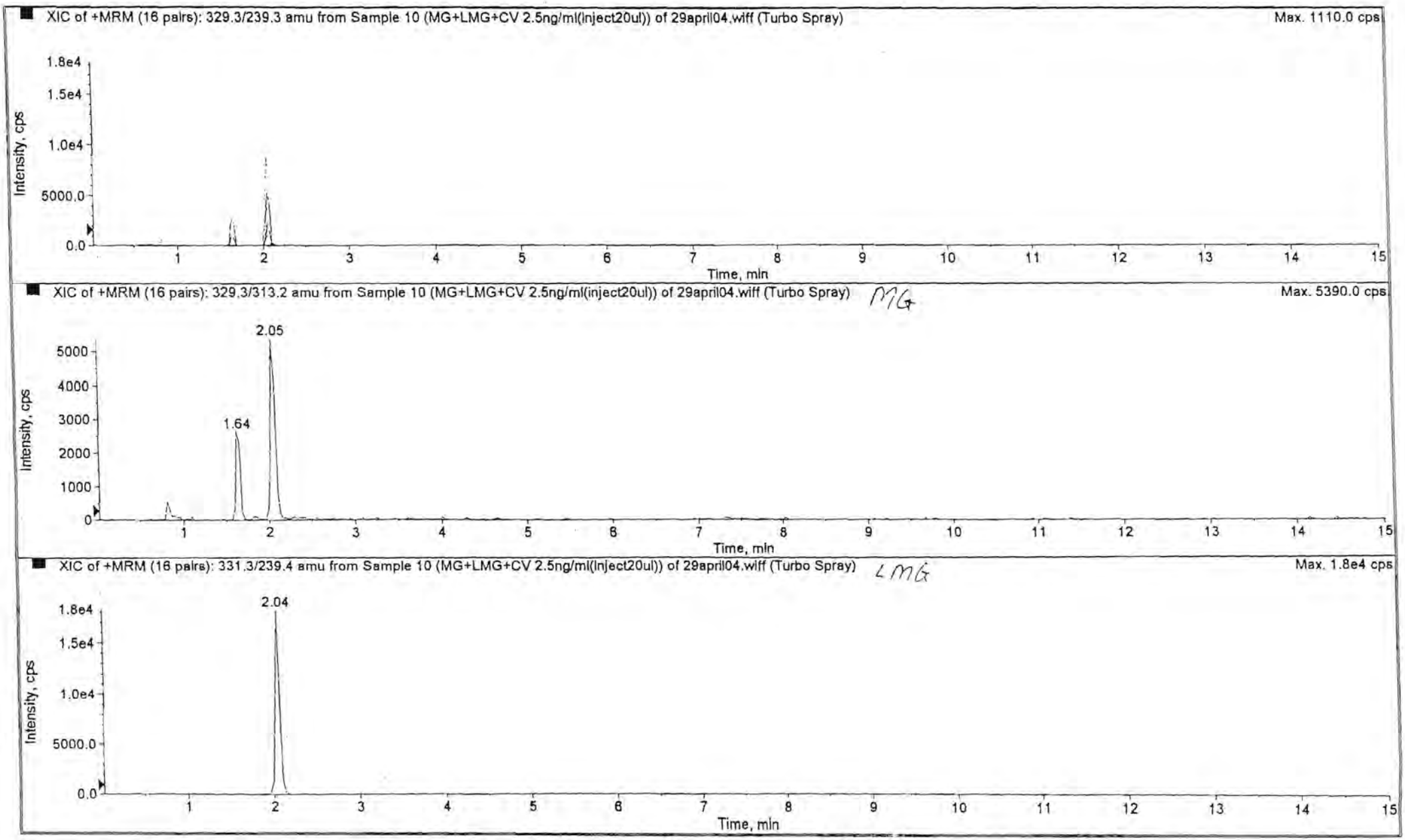

+MS2 (372.24) CE (79): 10 MCA ...
Max. 1.5e6 cps.
Intensity, cps
m/z, amu
235.4
233.1
236.3
237.3
239.4
238.4
240.5
241.5
268.5
266.6
267.6
269.5
270.5
311.2
309.2
310.2
312.1
313.2
340.3
338.4
341.5
342.1
356.4
354.2
355.1
357.4

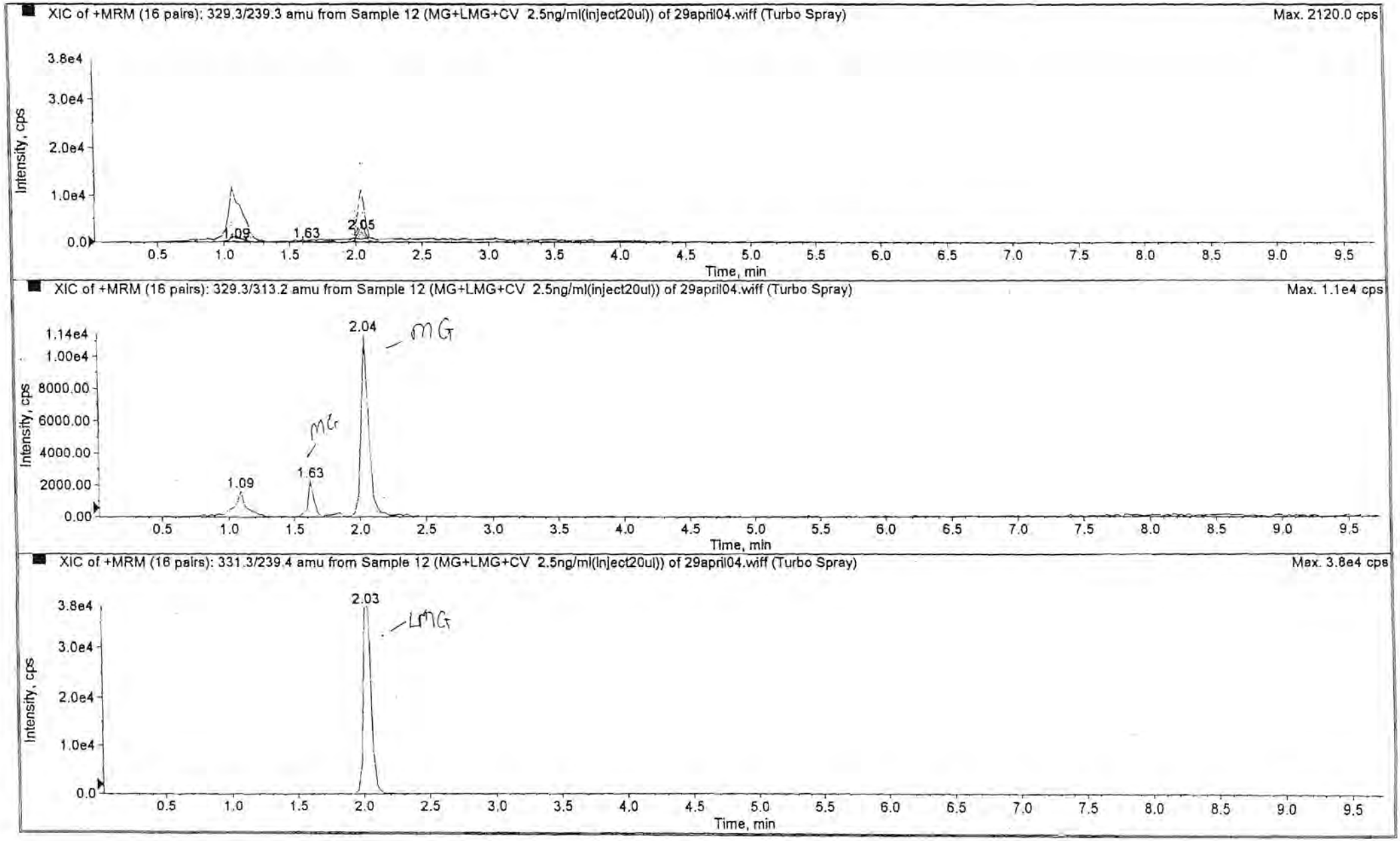

+Q1: 10 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20040429110240.wiff (Turbo Spray)
Max. 2.4e7 cps
Intensity, cps
2.4e7
2.3e7
2.2e7
2.1e7
2.0e7
1.9e7
1.8e7
1.7e7
1.6e7
1.5e7
1.4e7
1.3e7
1.2e7
1.1e7
1.0e7
9.0e6
8.0e6
7.0e6
6.0e6
5.0e6
4.0e6
3.0e6
2.0e6
1.0e6
372.2
373.2
374.1
366.3
367.4
368.4
369.3
370.2
371.1
375.2
376.1
377.2
378.2
379.1
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
m/z, amu


XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/239.3 amu from Sample 13 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 460.0 cps
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample 13 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
MG
Max. 2690.0 cps
3.30
0.81
XIC of +MRM (16 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample 13 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
LMG
Max. 4.9e4 cps
6.51

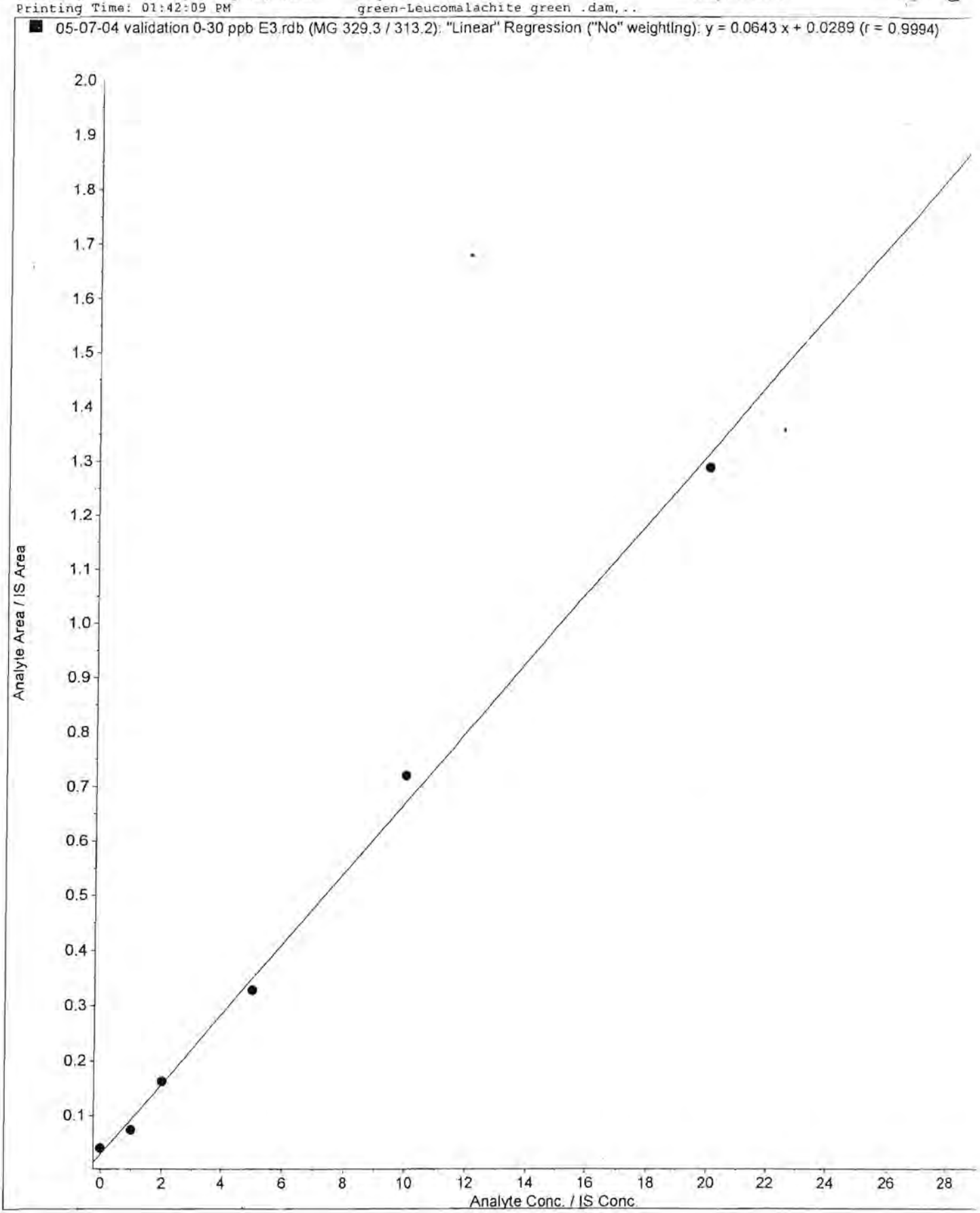

XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/239.3 amu from Sample 15 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 680.0 cps
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample 15 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
MG
Max. 3580.0 cps
3.04
0.75
XIC of +MRM (16 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample 15 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
LMG
Max. 4.8e4 cps
6.08

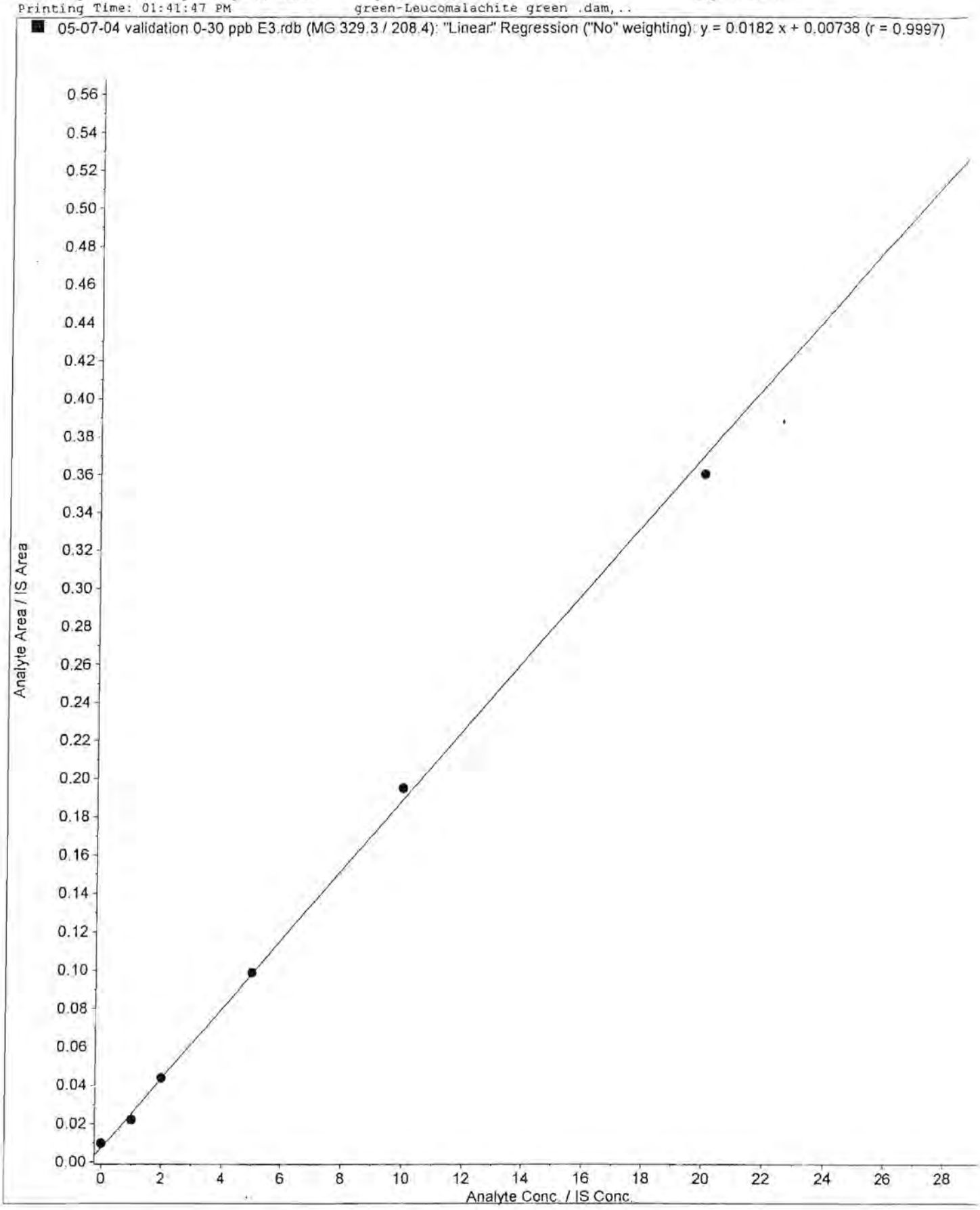

XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/239.3 amu from Sample 16 (MG+LMG+CV 2ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 130.0 cps
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample 16 (MG+LMG+CV 2ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 520.0 cps
0.71
16.97
17.37
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample 16 (MG+LMG+CV 2ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 5560.0 cps
6.12
Intensity, cps
Time, min

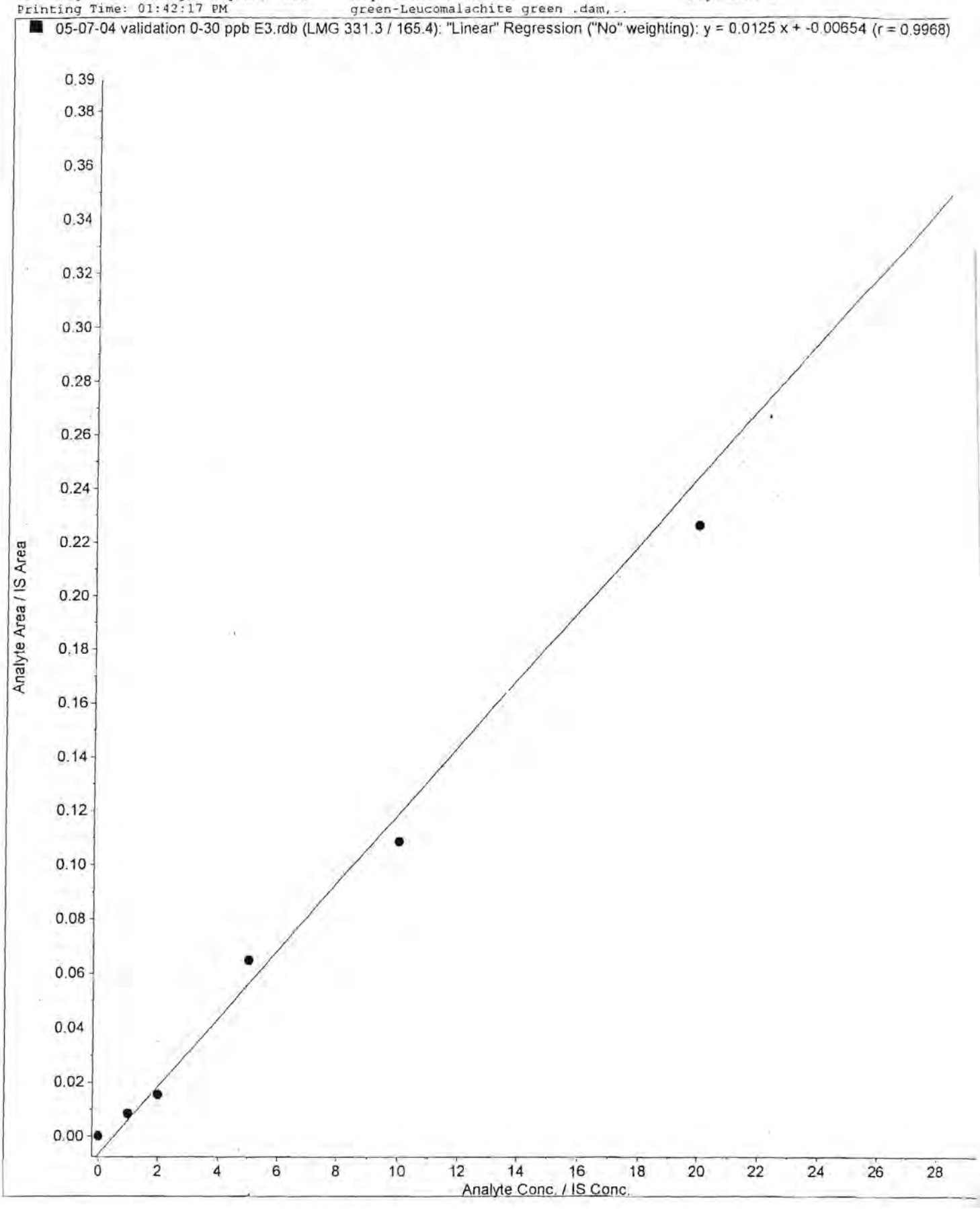

XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/239.3 amu from Sample 10 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 1110.0 cps
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample 10 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
MG
Max. 5390.0 cps
2.05
1.64
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample 10 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
LMG
Max. 1.8e4 cps
2.04
Intensity, cps
Time, min

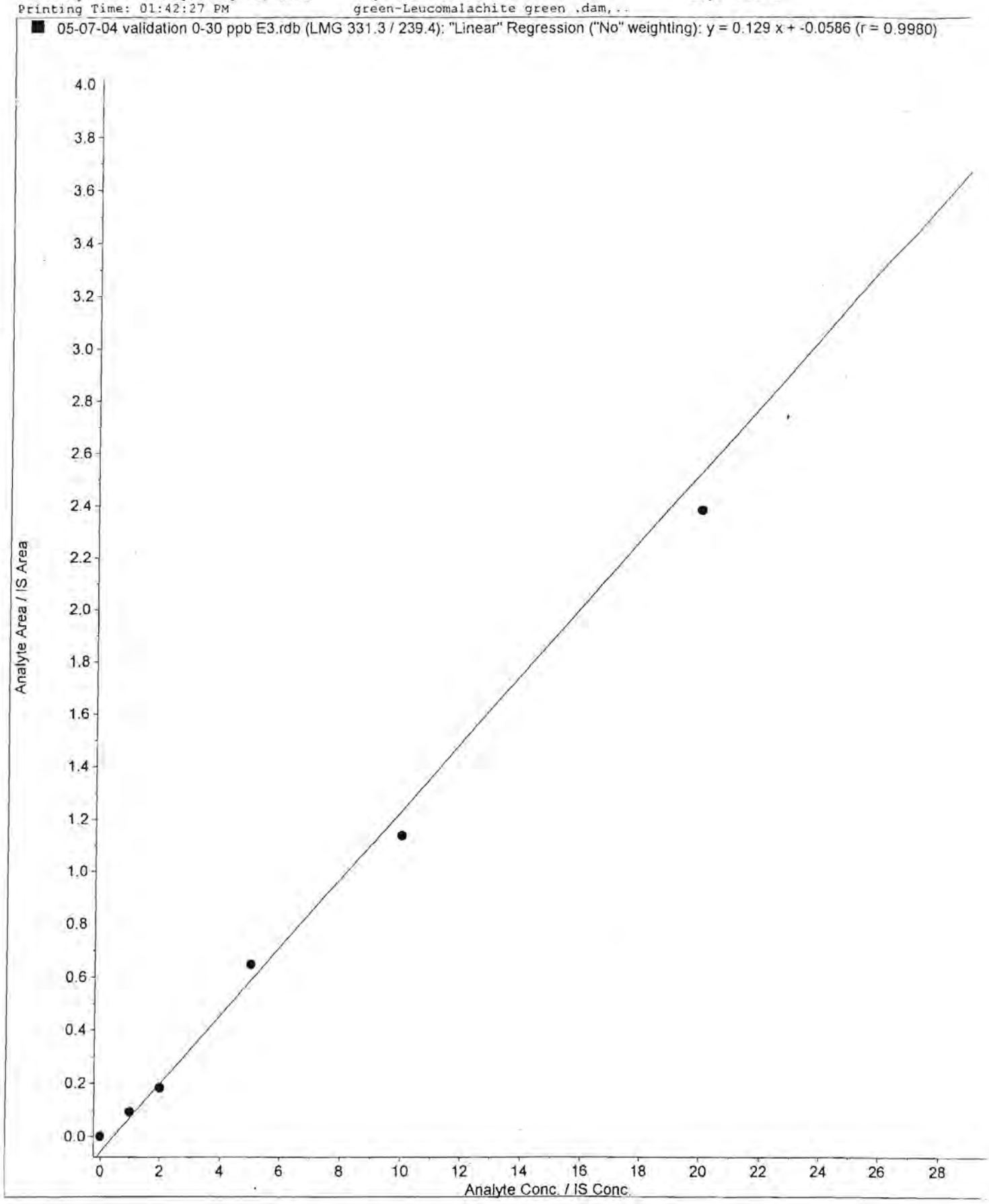

XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/239.3 amu from Sample 12 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 2120.0 cps
Intensity, cps
3.8e4
3.0e4
2.0e4
1.0e4
0.0
1.09
1.63
2.05
0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample 12 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 1.1e4 cps
Intensity, cps
1.14e4
1.00e4
8000.00
6000.00
4000.00
2000.00
0.00
1.09
1.63
2.04
MG
0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5
Time, min
XIC of +MRM (16 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample 12 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml(inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)
Max. 3.8e4 cps
Intensity, cps
3.8e4
3.0e4
2.0e4
1.0e4
0.0
2.03
LMG
0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5
Time, min

ภาคผนวก ข


05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0643 x + 0.0289 (r = 0.9994)
Analyte Area / IS Area
Analyte Conc. / IS Conc.
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28


05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (MG 329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0182 x + 0.00738 (r = 0.9997)
Analyte Area / IS Area
0.56
0.54
0.52
0.50
0.48
0.46
0.44
0.42
0.40
0.38
0.36
0.34
0.32
0.30
0.28
0.26
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
Analyte Conc. / IS Conc.


05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0125 x + -0.00654 (r = 0.9968)
Analyte Area / IS Area
0.39
0.38
0.36
0.34
0.32
0.30
0.28
0.26
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
Analyte Conc. / IS Conc.


05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.129 x + -0.0586 (r = 0.9980)
Analyte Area / IS Area
Analyte Conc. / IS Conc.
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28

Printing Time: 05:57:23 PM
Printing Date: Tuesday, July 20, 2004
Sample Name: S Snapper+5 ppb E5M

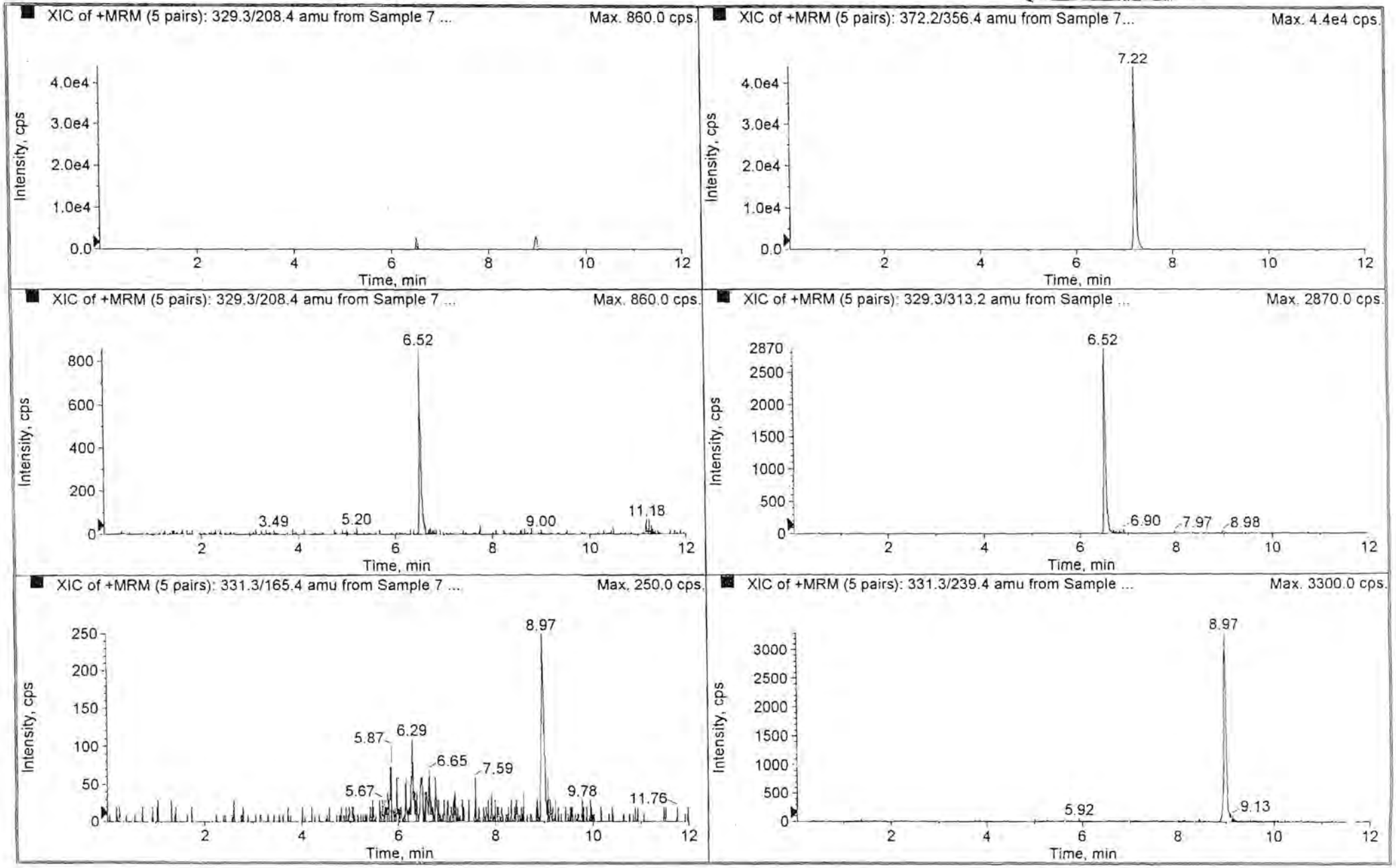
API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.

Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: S Snapper+5 ppb E5M

E5D

LMG E5 + E5T

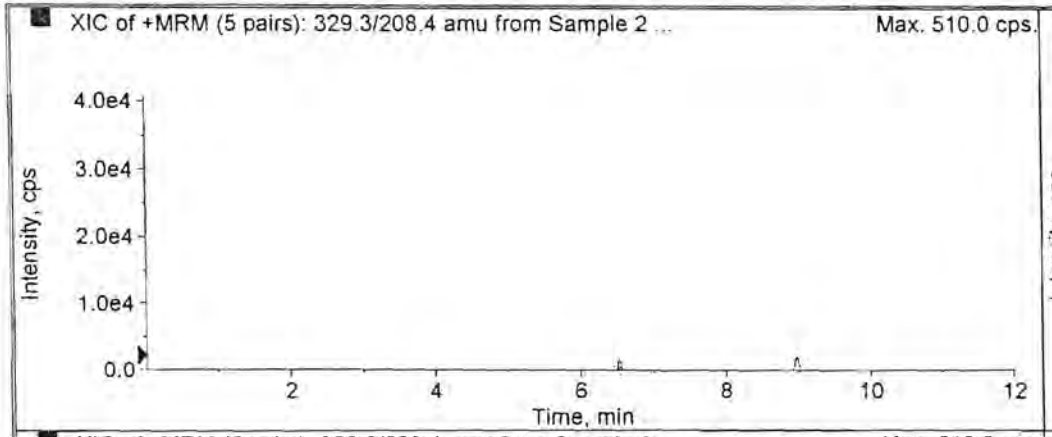
	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	MG-LMG 0 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	2.31e+005	No Peak	N/A
2	MG-LMG 0 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	2.31e+005	No Peak	N/A
3	MG-LMG 1 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	3.51e+003	1.00	2,43e+005	1.26	126.
4	MG-LMG 1 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	3.42e+004	1.00	2.43e+005	1.32	132.
5	MG-LMG 2 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	5.33e+003	2.00	2.23e+005	1.91	95.4
6	MG-LMG 2 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	5.06e+004	2.00	2.23e+005	1.83	91.5
7	MG-LMG 5 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.40e+004	5.00	2.37e+005	4.29	85.8
8	MG-LMG 5 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.69e+005	5.00	2.37e+005	4.71	94.2
9	MG-LMG 10 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	3.47e+004	10.0	2.35e+005	10.3	103.
10	MG-LMG 10 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	3.66e+005	10.0	2.35e+005	9.74	97.4
11	MG-LMG 20 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	6.88e+004	20.0	2.41e+005	19.7	98.7
12	MG-LMG 20 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	7.67e+005	20.0	2.41e+005	19.3	96.7
13	MG-LMG 30 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.05e+005	30.0	2.39e+005	30.2	101.
14	MG-LMG 30 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.21e+006	30.0	2.39e+005	30.6	102.
15	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
16	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
17	S Snapper+1 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	6.74e+002	1.00	1.29e+005	0.635	63.5
18	S Snapper+1 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	7.02e+003	1.00	1.29e+005	0.810	81.0
19	S Snapper+2 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.37e+003	2.00	1.42e+005	0.934	46.7
20	S Snapper+2 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.67e+004	2.00	1.42e+005	1.18	59.1
21	S Snapper+3 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	5.90e+003	3.00	1.89e+005	2.41	80.3
22	S Snapper+3 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	6.57e+004	3.00	1.89e+005	2.55	84.9
23	S Snapper+5 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	4.81e+003	5.00	1.47e+005	2.52	50.4
24	S Snapper+5 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	5.35e+004	5.00	1.47e+005	2.65	53.0
25	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
26	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
27	S Snapper +1 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	8.44e+002	1.00	1.47e+005	0.670	67.0
28	S Snapper +1 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.09e+004	1.00	1.47e+005	0.928	92.8
29	S Snapper+2 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.90e+003	2.00	1.35e+005	1.24	62.1
30	S Snapper+2 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	2.24e+004	2.00	1.35e+005	1.47	73.7
31	S Snapper+3 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.31e+003	3.00	8.58e+004	1.32	44.1
32	S Snapper+3 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.34e+004	3.00	8.58e+004	1.42	47.2
33	S Snapper+5 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	3.63e+003	5.00	1.35e+005	2.12	42.3
34	S Snapper+5 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	4.12e+004	5.00	1.35e+005	2.30	46.0

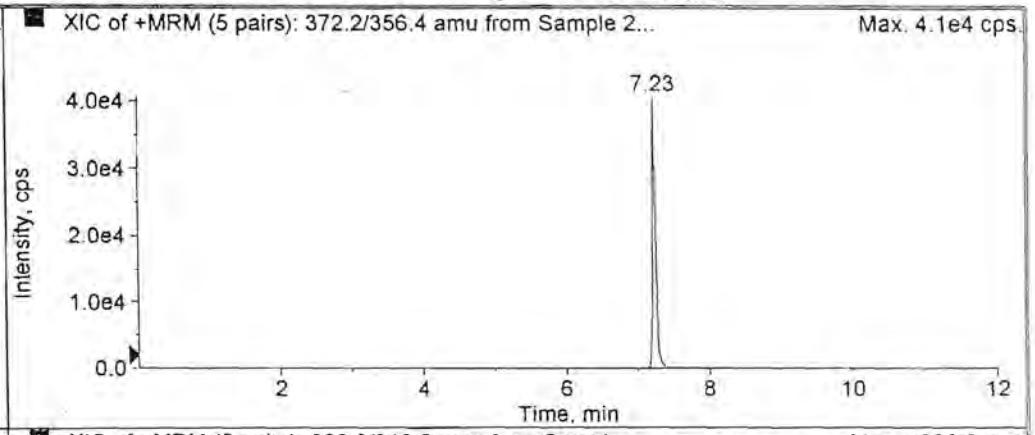

XIC of +MRM (5 pairs): 329.3/208.4 amu from Sample 7 ...
Max. 860.0 cps.
Intensity, cps
Time, min
XIC of +MRM (5 pairs): 372.2/356.4 amu from Sample 7...
Max. 4.4e4 cps.
7.22
XIC of +MRM (5 pairs): 329.3/208.4 amu from Sample 7 ...
Max. 860.0 cps.
6.52
3.49
5.20
9.00
11.18
XIC of +MRM (5 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample ...
Max. 2870.0 cps.
6.52
6.90
7.97
8.98
XIC of +MRM (5 pairs): 331.3/165.4 amu from Sample 7 ...
Max. 250.0 cps.
8.97
6.29
5.87
6.65
7.59
5.67
9.78
11.76
XIC of +MRM (5 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample ...
Max. 3300.0 cps.
8.97
5.92
9.13

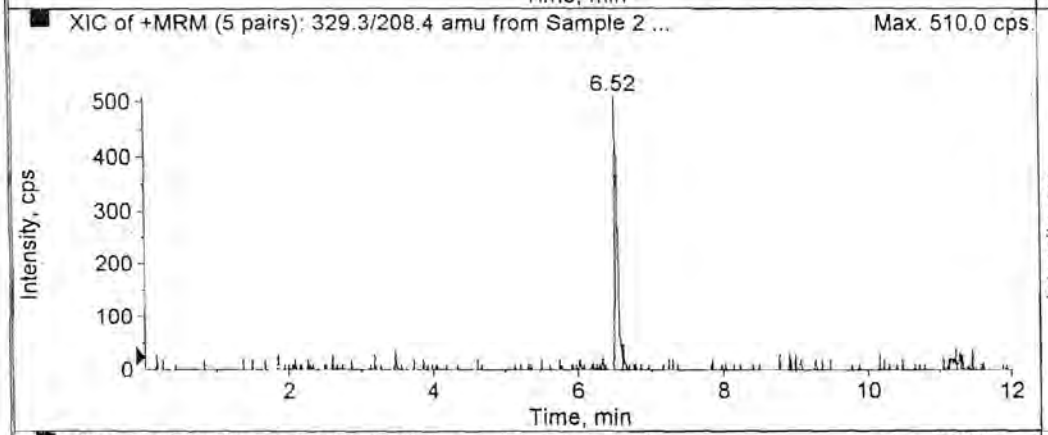
Printing Time: 06:03:38 PM
Printing Date: Tuesday, July 20, 2004
Sample Name: S Snapper+1 ppb E5

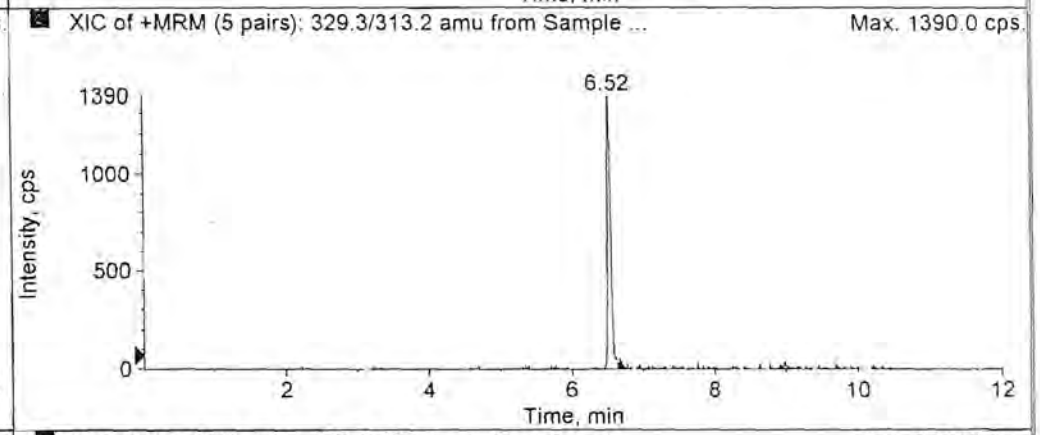
API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.
Acq. File: 20-07-04.wiff

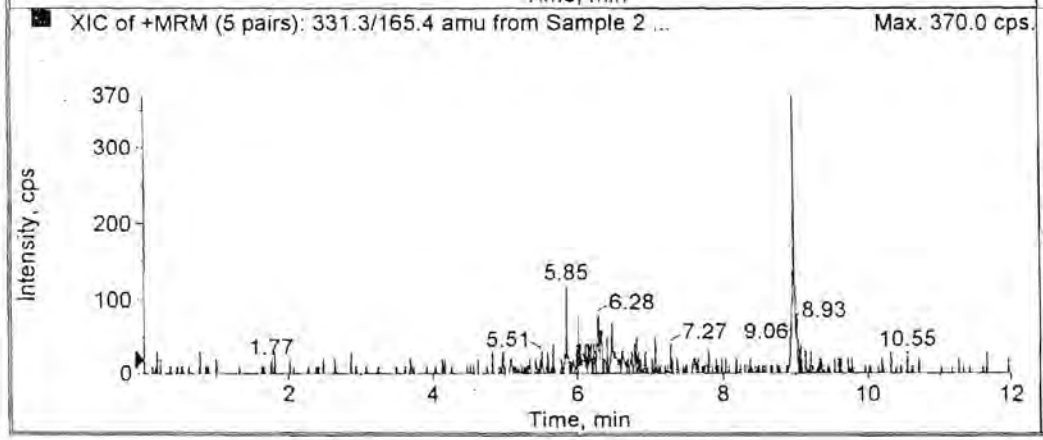
Sample Name: S Snapper+1 ppb E5

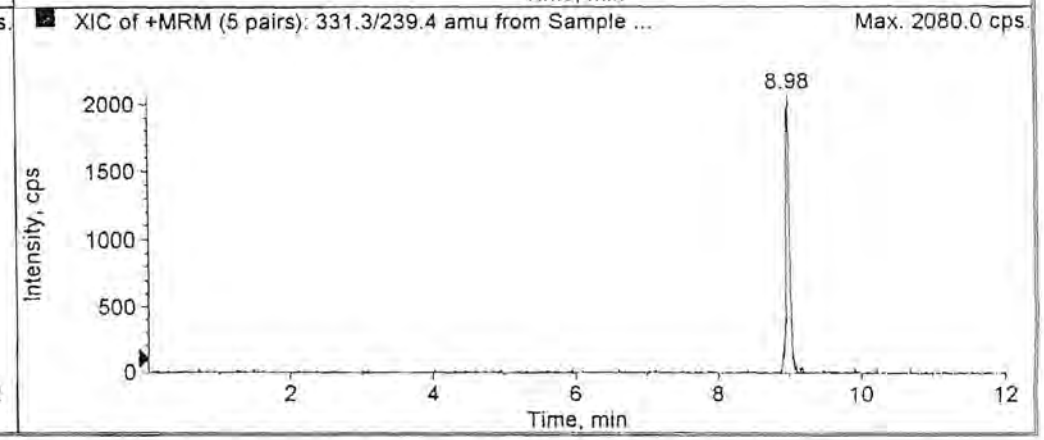


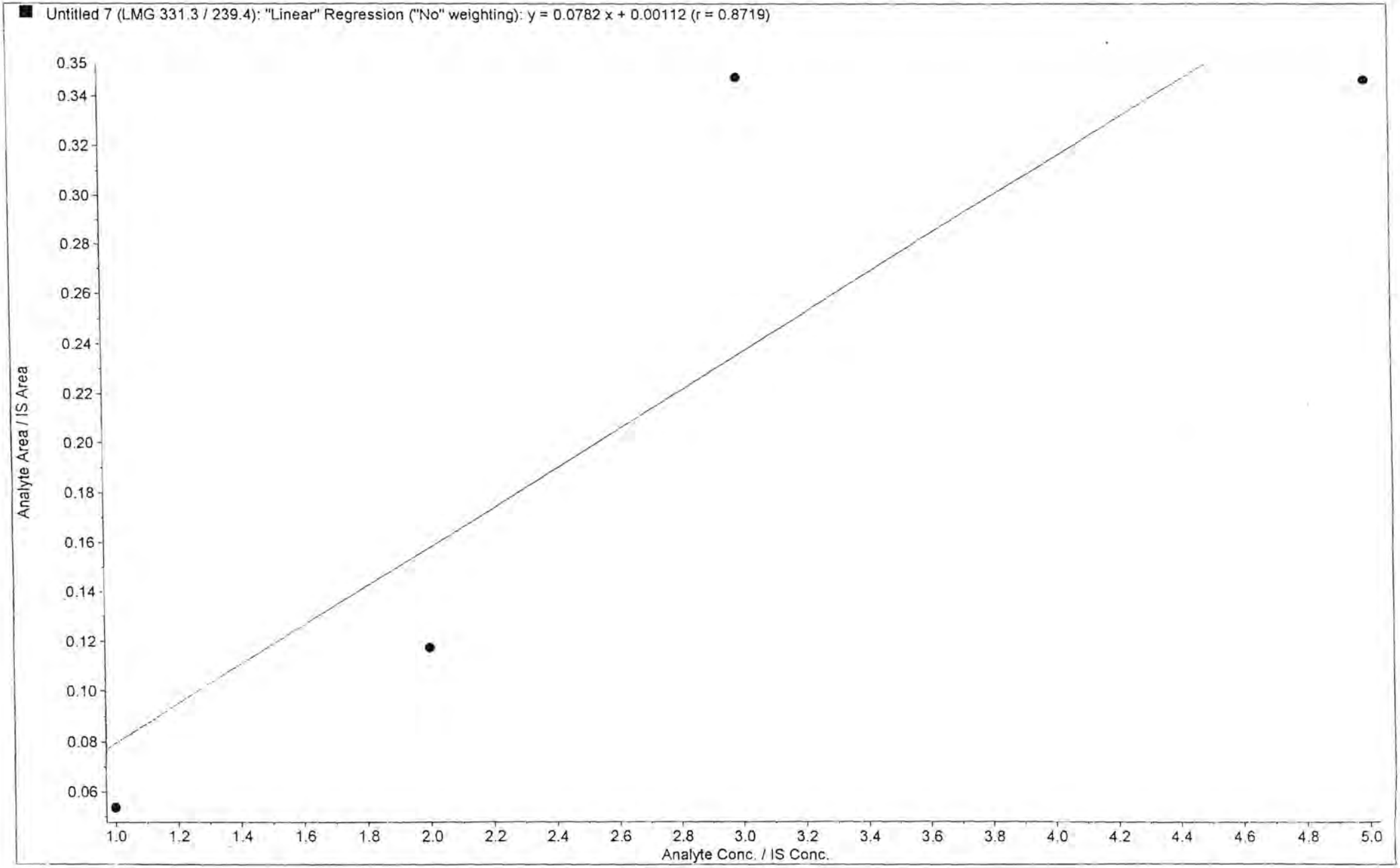




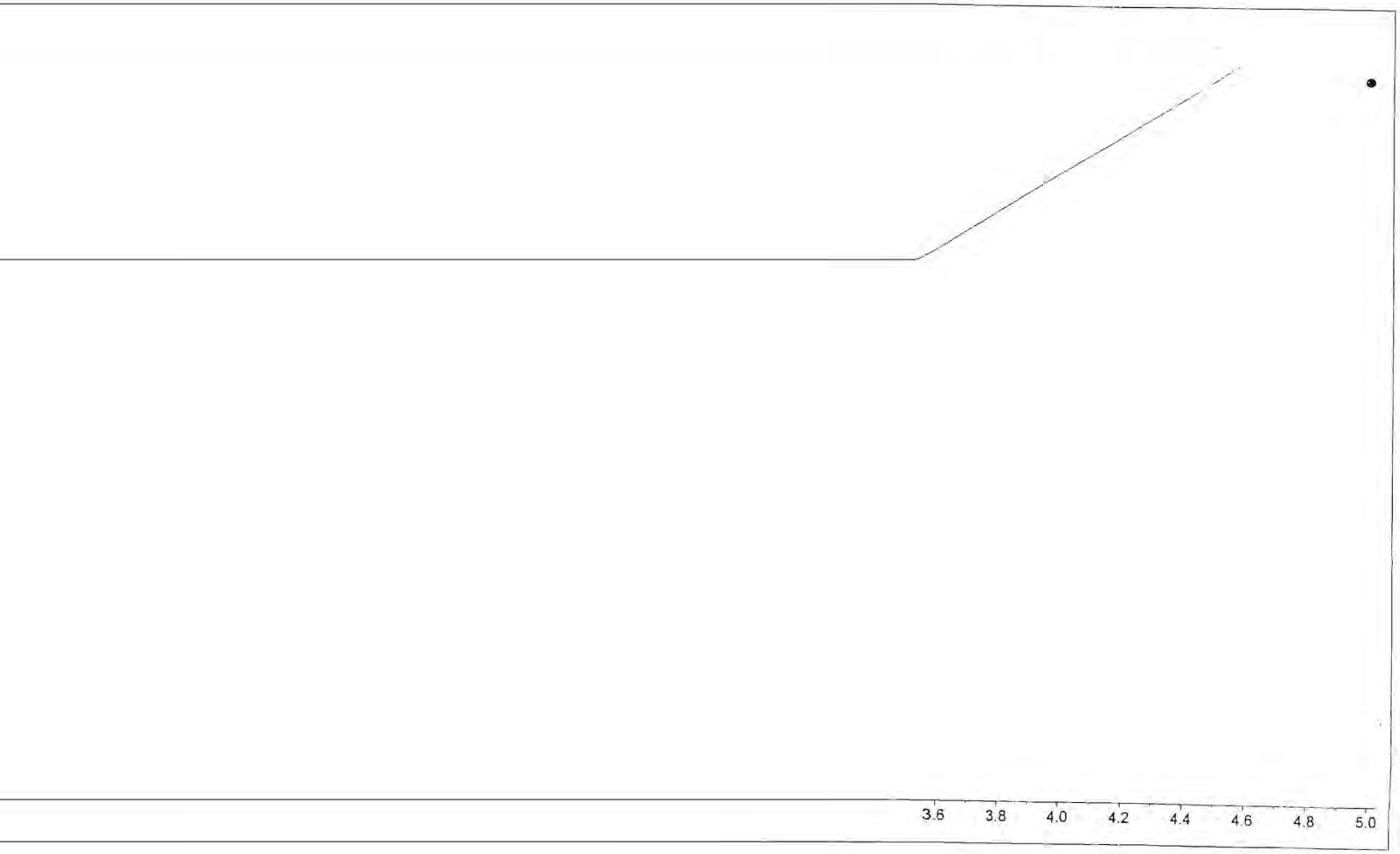


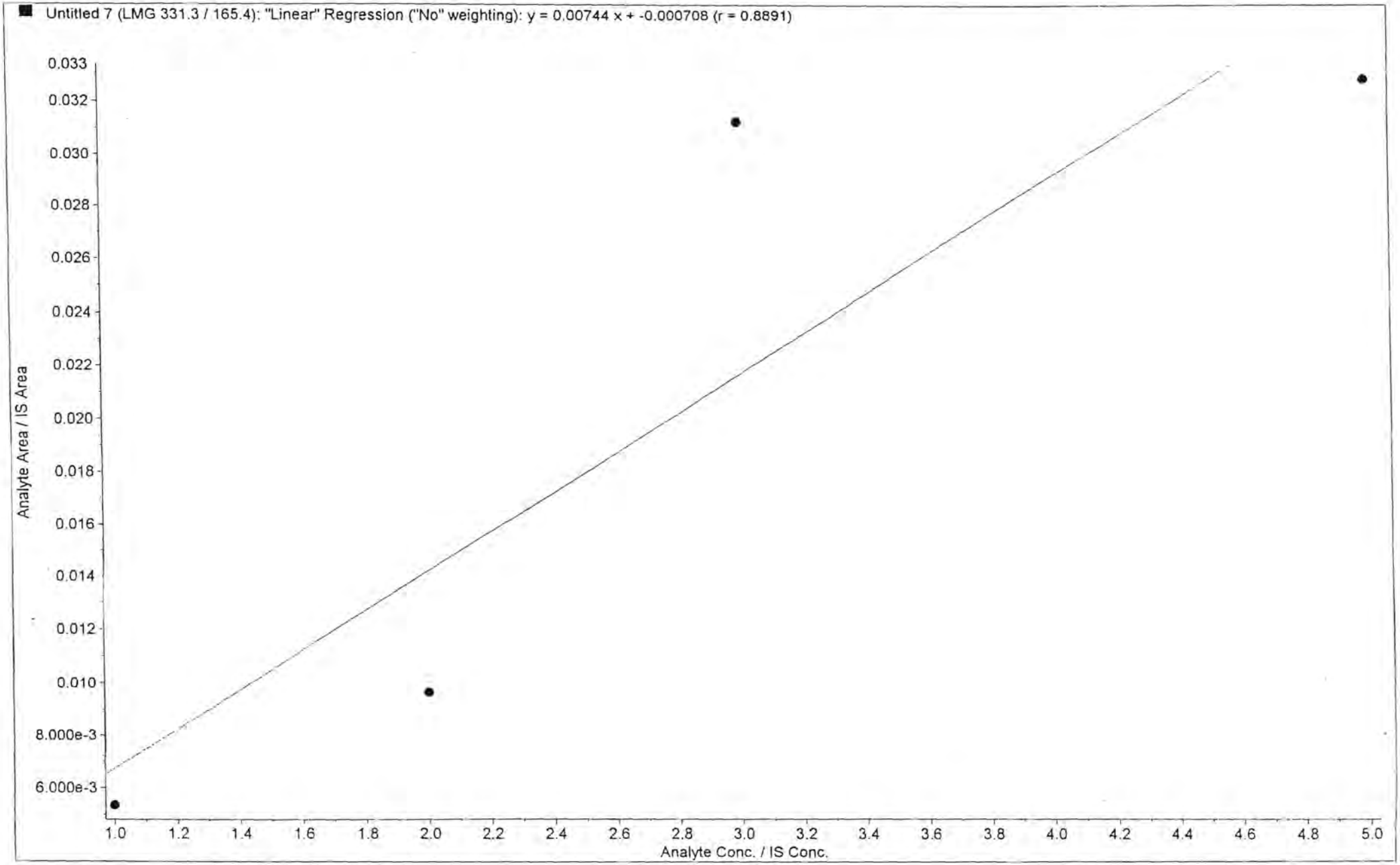


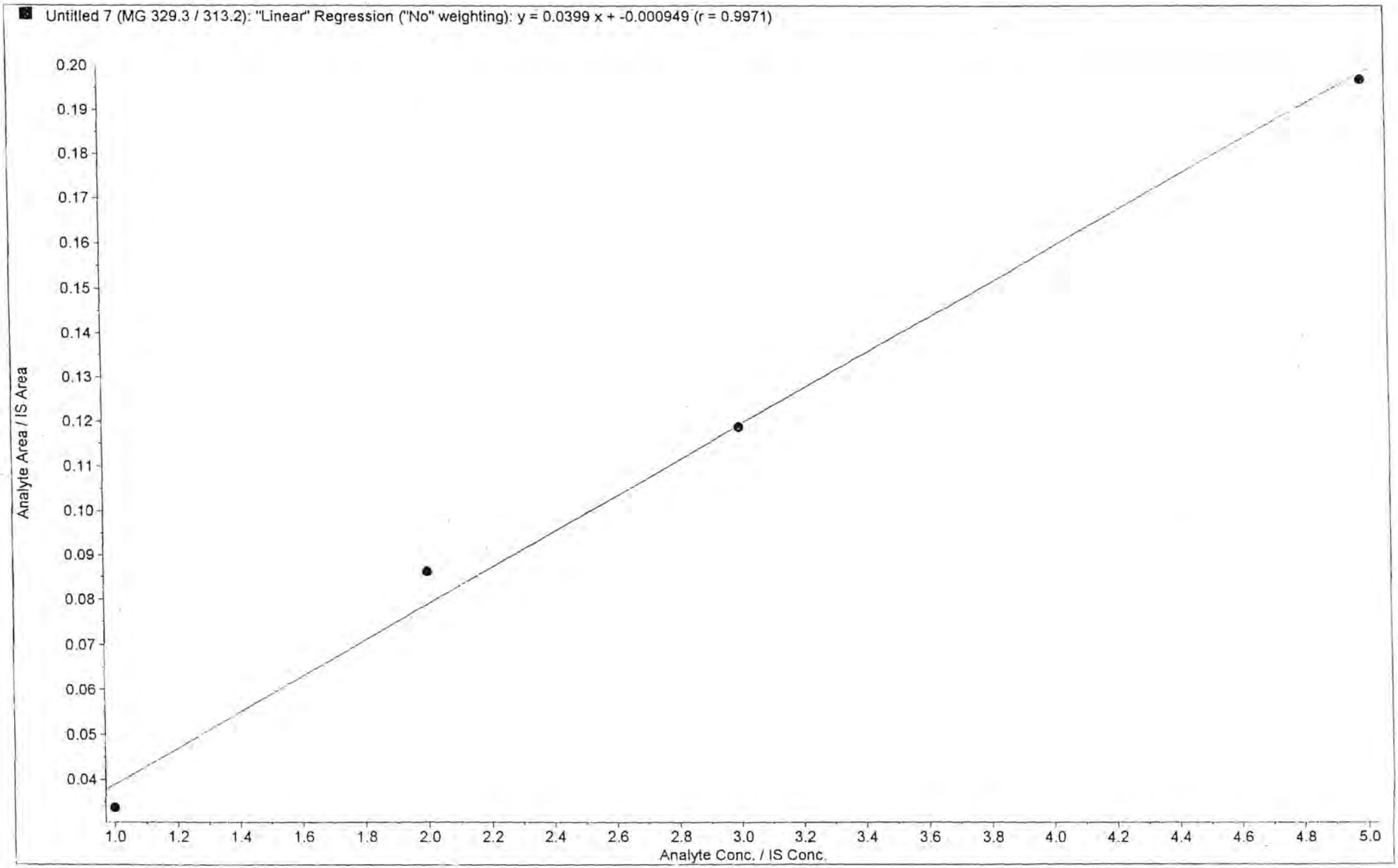


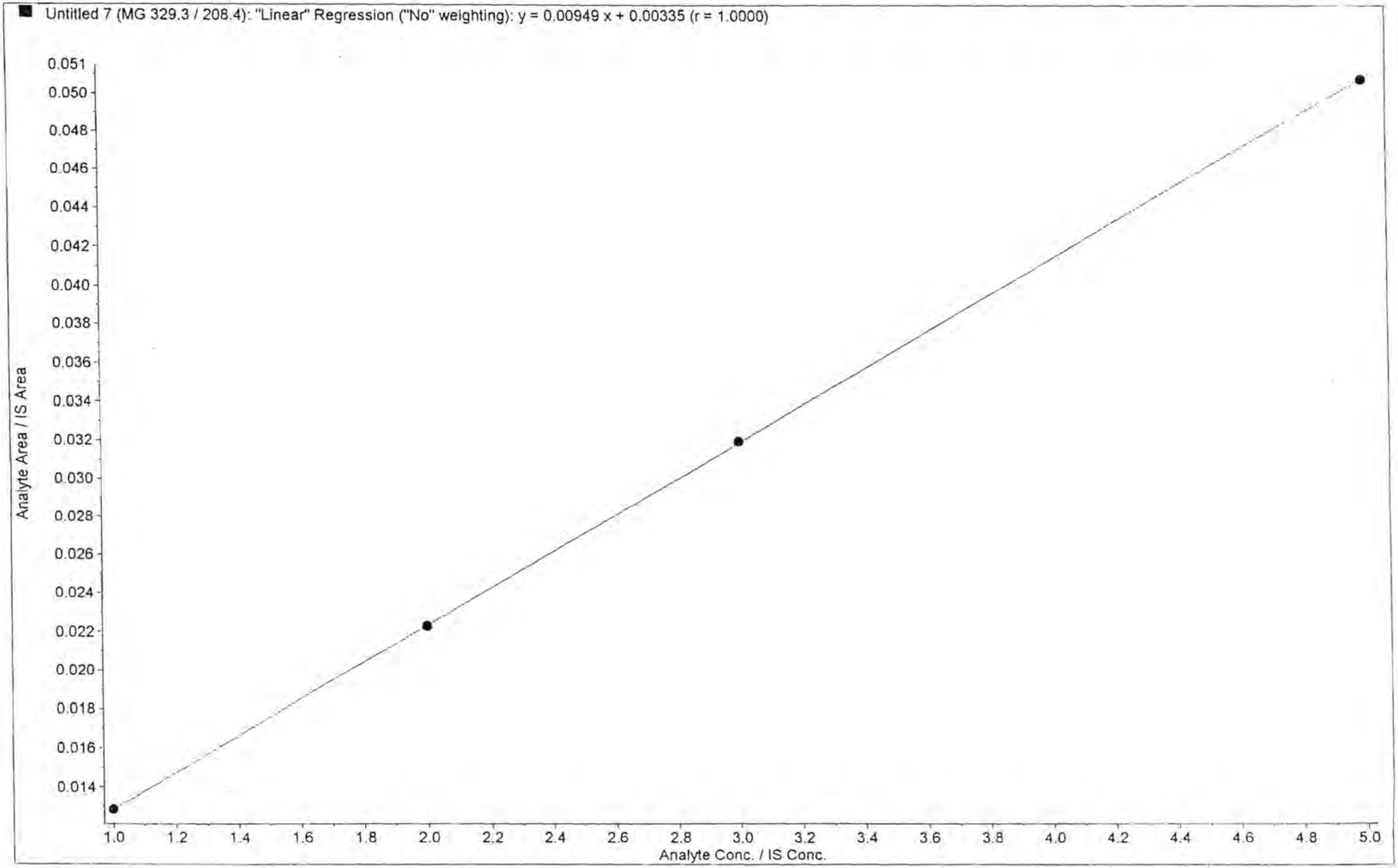

Untitled 7 (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0782 x + 0.00112 (r = 0.8719)
Analyte Area / IS Area
0.35
0.34
0.32
0.30
0.28
0.26
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

Sample Name: S Snapper control E5




Untitled 7 (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.00744 x + -0.000708 (r = 0.8891)
Analyte Area / IS Area
0.033
0.032
0.030
0.028
0.026
0.024
0.022
0.020
0.018
0.016
0.014
0.012
0.010
8.000e-3
6.000e-3
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


Untitled 7 (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0399 x + -0.000949 (r = 0.9971)
Analyte Area / IS Area
0.20
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


Untitled 7 (MG 329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.00949 x + 0.00335 (r = 1.0000)
Analyte Area / IS Area
0.051
0.050
0.048
0.046
0.044
0.042
0.040
0.038
0.036
0.034
0.032
0.030
0.028
0.026
0.024
0.022
0.020
0.018
0.016
0.014
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

Printing Time: 05:31:02 PM
Printing Date: Tuesday, July 20, 2004
Sample Name: S Snapper control E5

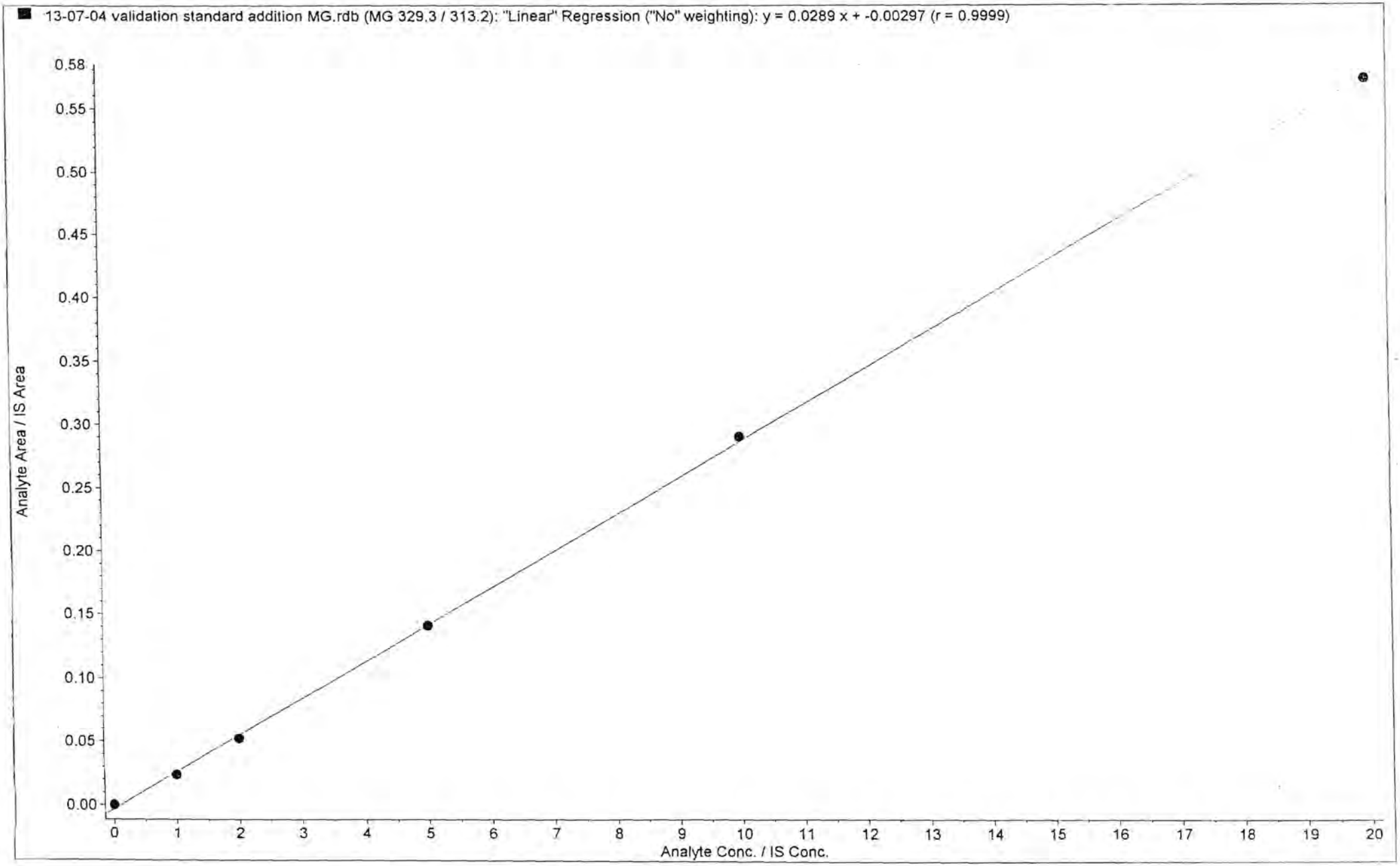
API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.

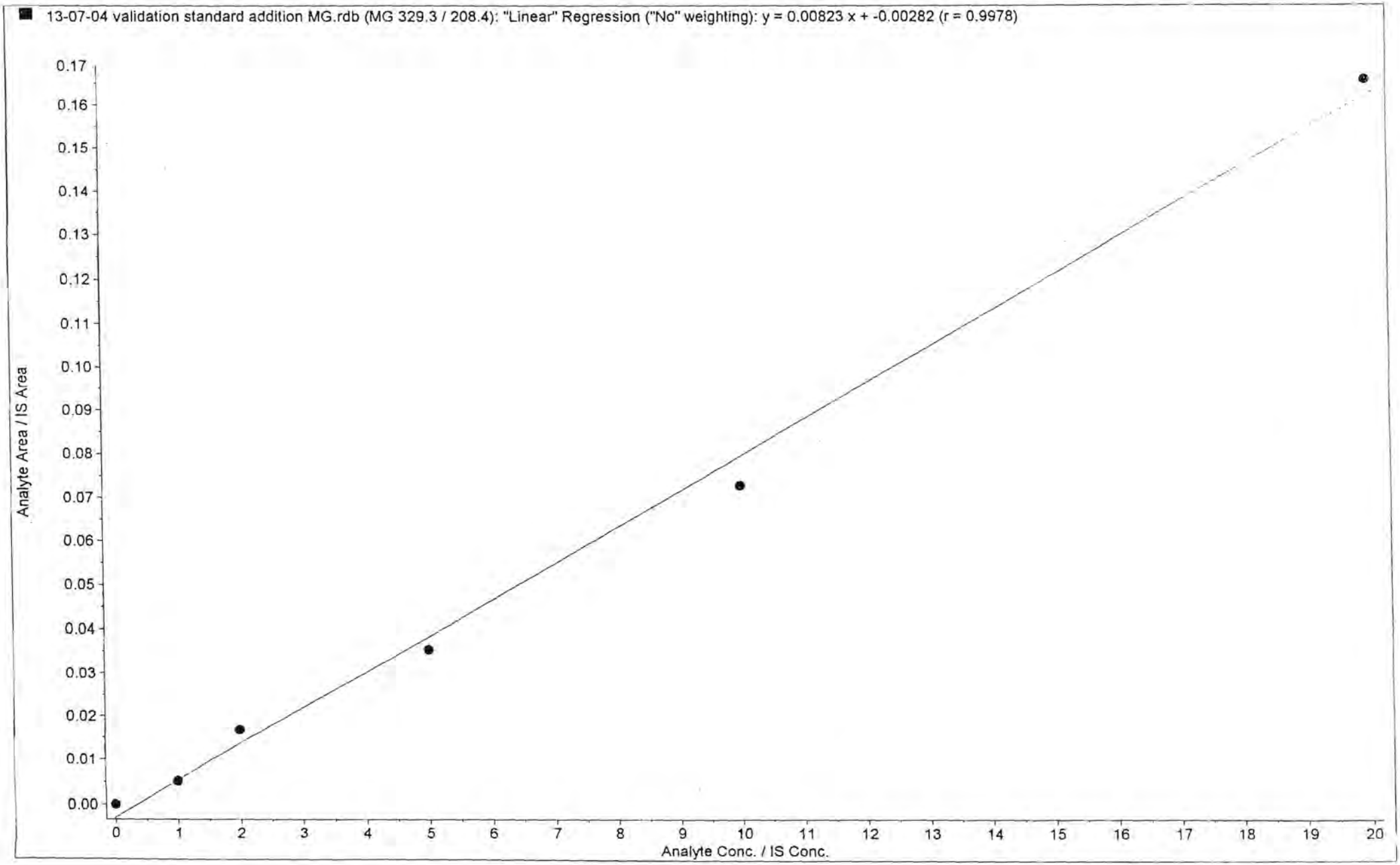
Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: S Snapper control E5

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
2	S Snapper+1 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	6.87e+002	1.00	1.29e+005	0.813	81.3
3	S Snapper+2 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	1.37e+003	2.00	1.42e+005	1.39	69.4
4	S Snapper+3 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	5.90e+003	3.00	1.89e+005	4.29	143.
5	S Snapper+5 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	4.81e+003	5.00	1.47e+005	4.51	90.1
6	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
7	S Snapper+1 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	6.90e+003	1.00	1.29e+005	0.671	67.1
8	S Snapper+2 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	1.67e+004	2.00	1.42e+005	1.49	74.3
9	S Snapper+3 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	6.57e+004	3.00	1.89e+005	4.43	148.
10	S Snapper+5 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	5.07e+004	5.00	1.47e+005	4.41	88.3
11	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
12	S Snapper+1 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	1.65e+003	1.00	1.29e+005	0.999	99.9
13	S Snapper+2 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	3.17e+003	2.00	1.42e+005	2.00	99.8
14	S Snapper+3 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	6.03e+003	3.00	1.89e+005	3.01	100.
15	S Snapper+5 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	7.44e+003	5.00	1.47e+005	5.00	99.9
16	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
17	S Snapper+1 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	4.34e+003	1.00	1.29e+005	0.870	87.0
18	S Snapper+2 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	1.22e+004	2.00	1.42e+005	2.18	109.
19	S Snapper+3 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	2.23e+004	3.00	1.89e+005	2.99	99.6
20	S Snapper+5 ppb E5	Standard	July\20-07-04.wiff	2.88e+004	5.00	1.47e+005	4.96	99.2

2nd - cold ?
MG

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	S14 Control E4	Standard	July\13-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	1.75e+005	No Peak	N/A
2	S14 Control E4	Standard	July\13-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	1.75e+005	No Peak	N/A
3	S14 Spiked MG 1 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	8.65e+002	1.00	1.67e+005	0.971	97.1
4	S14 Spiked MG 1 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	3.95e+003	1.00	1.67e+005	0.919	91.9
5	S14 Spiked MG 2 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	1.59e+003	2.00	9.46e+004	2.39	119.
6	S14 Spiked MG 2 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	4.93e+003	2.00	9.46e+004	1.91	95.4
7	S14 Spiked MG 5 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	5.80e+003	5.00	1.63e+005	4.66	93.1
8	S14 Spiked MG 5 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	2.30e+004	5.00	1.63e+005	4.98	99.6
9	S14 Spiked MG 10 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	7.68e+003	10.0	1.06e+005	9.19	91.9
10	S14 Spiked MG 10 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	3.06e+004	10.0	1.06e+005	10.1	101.
11	S14 Spiked MG 20 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	2.71e+004	20.0	1.64e+005	20.5	102.
12	S14 Spiked MG 20 ppb E4	Standard	July\13-07-04.wiff	9.37e+004	20.0	1.64e+005	19.9	99.7
13	S14 Spiked 5 ppb MixE4	Quality Contro	July\13-07-04.wiff	4.92e+003	5.00	1.23e+005	5.22	104.
14	S14 Spiked 5 ppb MixE4	Quality Contro	July\13-07-04.wiff	1.60e+004	5.00	1.23e+005	4.61	92.2


13-07-04 validation standard addition MG.rdb (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0289 x + -0.00297 (r = 0.9999)
Analyte Area / IS Area
0.58
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Analyte Conc. / IS Conc.


13-07-04 validation standard addition MG.rdb (MG 329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.00823 x + -0.00282 (r = 0.9978)
Analyte Area / IS Area
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Analyte Conc. / IS Conc.

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	Salmon Control E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	7.61e+004	No Peak	N/A
2	Salmon + 1 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	6.57e+002	1.00	7.18e+004	1.15	115.
3	1 Salmon + 2 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	1.20e+003	2.00	6.83e+004	2.26	113.
4	Salmon + 3 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	1.03e+003	3.00	5.44e+004	2.45	81.8
5	Salmon + 5 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	2.80e+003	5.00	7.03e+004	5.20	104.
6	2 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	3.16e+003	2.00	1.20e+005	3.42	171.
7	3 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	9.53e+002	2.00	6.86e+004	1.78	88.9
8	4 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	7.55e+002	2.00	4.96e+004	1.95	97.5
9	5 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	1.07e+003	2.00	6.91e+004	1.99	99.6
10	Salmon Control E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	7.61e+004	No Peak	N/A
11	Salmon + 1 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	5.06e+003	1.00	7.18e+004	0.860	86.0
12	1 Salmon + 2 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	1.39e+004	2.00	6.83e+004	2.17	108.
13	Salmon + 3 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	1.35e+004	3.00	5.44e+004	2.61	87.1
14	Salmon + 5 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	3.59e+004	5.00	7.03e+004	5.19	104.
15	2 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	3.57e+004	2.00	1.20e+005	3.10	155.
16	3 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	1.25e+004	2.00	6.86e+004	1.96	98.1
17	4 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	8.99e+003	2.00	4.96e+004	1.95	97.4
18	5 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	1.19e+004	2.00	6.91e+004	1.87	93.3
19	Salmon Control E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	7.61e+004	No Peak	N/A
20	Salmon + 1 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	1.31e+003	1.00	7.18e+004	0.972	97.2
21	1 Salmon + 2 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	2.48e+003	2.00	6.83e+004	1.88	93.9
22	Salmon + 3 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	3.29e+003	3.00	5.44e+004	3.09	103.
23	Salmon + 5 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	6.96e+003	5.00	7.03e+004	5.00	100.
24	2 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	5.24e+003	2.00	1.20e+005	2.25	112.
25	3 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	2.84e+003	2.00	6.86e+004	2.13	107.
26	4 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	2.40e+003	2.00	4.96e+004	2.47	124.
27	5 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	3.02e+003	2.00	6.91e+004	2.25	112.
28	Salmon Control E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	7.61e+004	No Peak	N/A
29	Salmon + 1 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	4.59e+003	1.00	7.18e+004	0.987	98.7
30	1 Salmon + 2 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	8.62e+003	2.00	6.83e+004	1.92	95.9
31	Salmon + 3 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	1.11e+004	3.00	5.44e+004	3.07	102.
32	Salmon + 5 ppb E5M	Standard	July\22-07-04.wiff	2.34e+004	5.00	7.03e+004	4.99	99.9
33	2 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	1.82e+004	2.00	1.20e+005	2.31	115.
34	3 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	9.90e+003	2.00	6.86e+004	2.19	109.
35	4 Salmon + 2 ppb E5M	Quality Contro	July\22-07-04.wiff	7.61e+003	2.00	4.96e+004	2.32	116.

Printing Time: 04:09:08 PM
Printing Date: Thursday, July 22, 2004
Sample Name: F4 control E5M

API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.

Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: F4 control E5M

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	F4 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	2.11e+005	No Peak	N/A
2	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	3.88e+003	1.00	2.31e+005	1.02	102.
3	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.09e+003	2.00	1.80e+005	1.57	78.6
4	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.50e+004	3.00	2.52e+005	3.09	103.
5	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.25e+004	5.00	2.22e+005	5.12	102.
6	F4 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.11e+003	0.00	2.11e+005	0.279	N/A
7	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.46e+004	1.00	2.31e+005	1.03	103.
8	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.04e+004	2.00	1.80e+005	1.38	68.8
9	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.84e+005	3.00	2.52e+005	3.18	106.
10	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.70e+005	5.00	2.22e+005	5.13	103.
11	F4 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	2.11e+005	No Peak	N/A
12	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.68e+003	1.00	2.31e+005	1.22	122.
13	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.00e+003	2.00	1.80e+005	2.32	116.
14	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.81e+003	3.00	2.52e+005	2.00	66.8
15	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.16e+004	5.00	2.22e+005	5.42	108.
16	F4 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	2.11e+005	No Peak	N/A
17	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	8.35e+003	1.00	2.31e+005	1.10	110.
18	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.25e+004	2.00	1.80e+005	2.02	101.
19	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.19e+004	3.00	2.52e+005	2.51	83.8
20	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.12e+004	5.00	2.22e+005	5.26	105.

Printing Time: 04:00:43 PM
Printing Date: Thursday, July 22, 2004
Sample Name: S14 control E5M

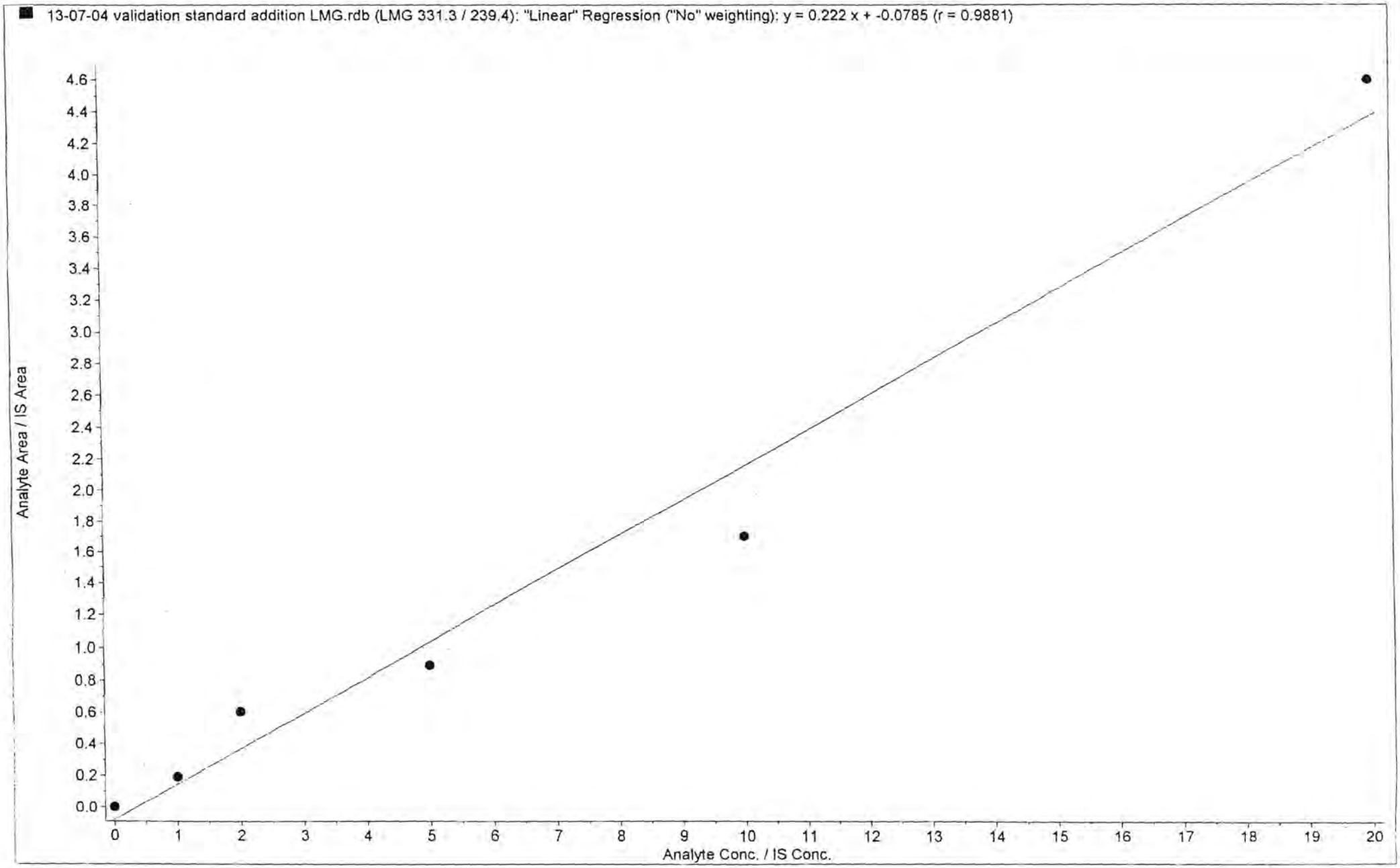
API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.

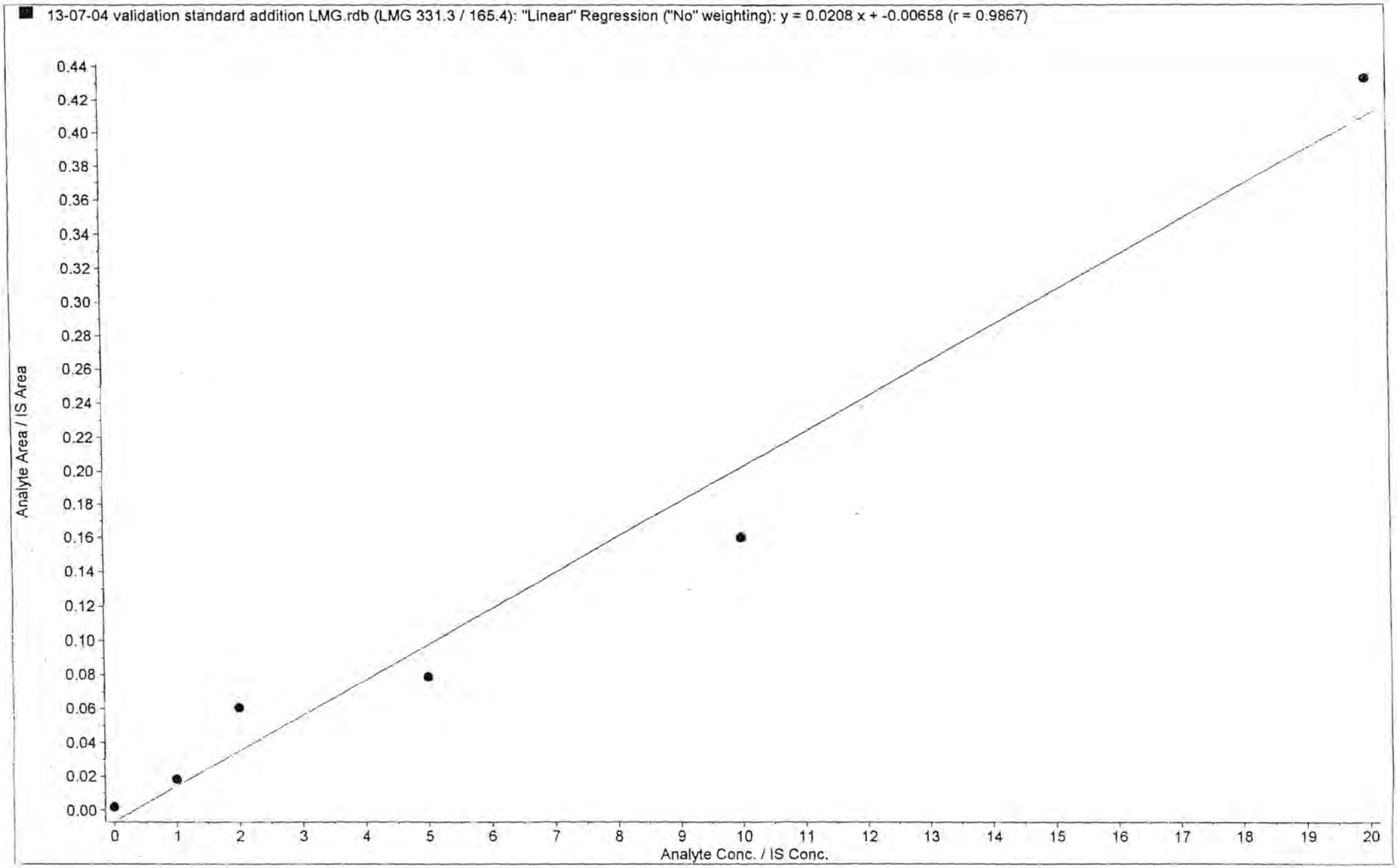
Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: S14 control E5M

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	S14 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	5.01e+004	No Peak	N/A
2	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	1.00	2.24e+004	No Peak	N/A
3	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.31e+002	2.00	4.72e+004	2.13	107.
4	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.27e+002	3.00	3.80e+004	2.51	83.6
5	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.54e+003	5.00	5.67e+004	5.34	107.
6	S14 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	5.01e+004	No Peak	N/A
7	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.07e+003	1.00	2.24e+004	0.975	97.5
8	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.91e+003	2.00	4.72e+004	1.99	99.5
9	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.66e+003	3.00	3.80e+004	2.80	93.4
10	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.57e+004	5.00	5.67e+004	5.13	103.
11	S14 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	5.01e+004	No Peak	N/A
12	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.29e+002	1.00	2.24e+004	0.925	92.5
13	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.72e+003	2.00	4.72e+004	1.90	95.0
14	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.59e+003	3.00	3.80e+004	3.69	123.
15	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.83e+003	5.00	5.67e+004	4.64	92.9
16	S14 control E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	5.01e+004	No Peak	N/A
17	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.90e+003	1.00	2.24e+004	1.10	110.
18	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	6.36e+003	2.00	4.72e+004	1.91	95.4
19	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	9.13e+003	3.00	3.80e+004	3.61	120.
20	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.72e+004	5.00	5.67e+004	4.65	93.0

Std. add'n LMG

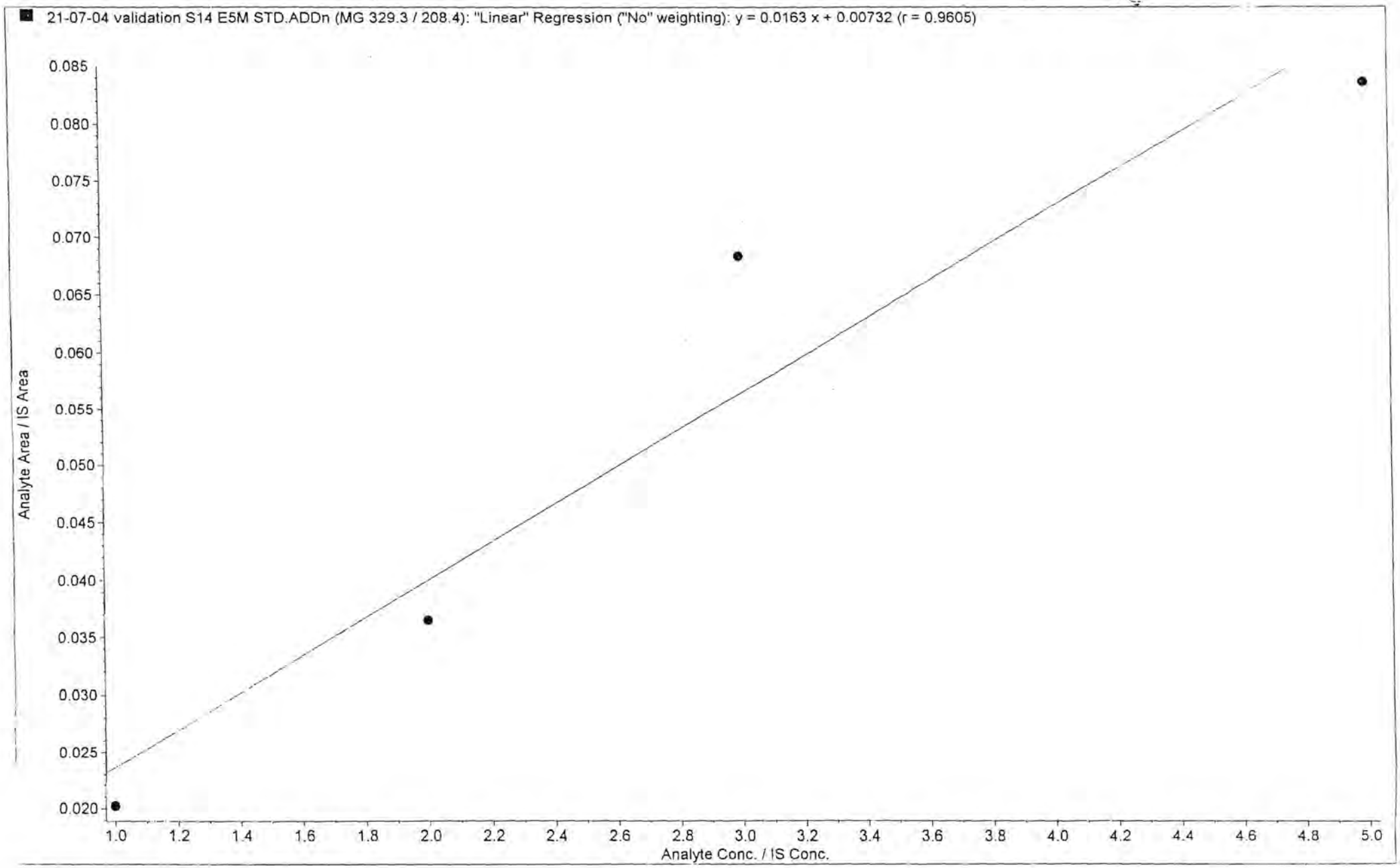
	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	S14 Control E4	Standard	July\13-07-04.wiff	3.26e+002	0.00	1.75e+005	0.406	N/A
2	S14 Control E4	Standard	July\13-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	1.75e+005	No Peak	N/A
3	S14 Spiked LMG 1	Standard	July\13-07-04.wiff	2.04e+003	1.00	1.12e+005	1.19	119.
4	S14 Spiked LMG 1	Standard	July\13-07-04.wiff	2.12e+004	1.00	1.12e+005	1.21	121.
5	S14 Spiked LMG 2	Standard	July\13-07-04.wiff	1.01e+004	2.00	1.67e+005	3.23	161.
6	S14 Spiked LMG 2	Standard	July\13-07-04.wiff	1.00e+005	2.00	1.67e+005	3.06	153.
7	S14 Spiked LMG 5	Standard	July\13-07-04.wiff	8.00e+003	5.00	1.02e+005	4.09	81.9
8	S14 Spiked LMG 5	Standard	July\13-07-04.wiff	9.06e+004	5.00	1.02e+005	4.36	87.2
9	S14 Spiked LMG 1	Standard	July\13-07-04.wiff	1.67e+004	10.0	1.05e+005	7.98	79.8
10	S14 Spiked LMG 1	Standard	July\13-07-04.wiff	1.77e+005	10.0	1.05e+005	7.96	79.6
11	S14 Spiked LMG 2	Standard	July\13-07-04.wiff	6.80e+004	20.0	1.57e+005	21.1	106.
12	S14 Spiked LMG 2	Standard	July\13-07-04.wiff	7.24e+005	20.0	1.57e+005	21.1	105.
13	S14 Spiked 5 ppb	Quality Contro	July\13-07-04.wiff	1.27e+004	5.00	1.23e+005	5.28	106.
14	S14 Spiked 5 ppb	Quality Contro	July\13-07-04.wiff	1.24e+005	5.00	1.23e+005	4.90	98.0

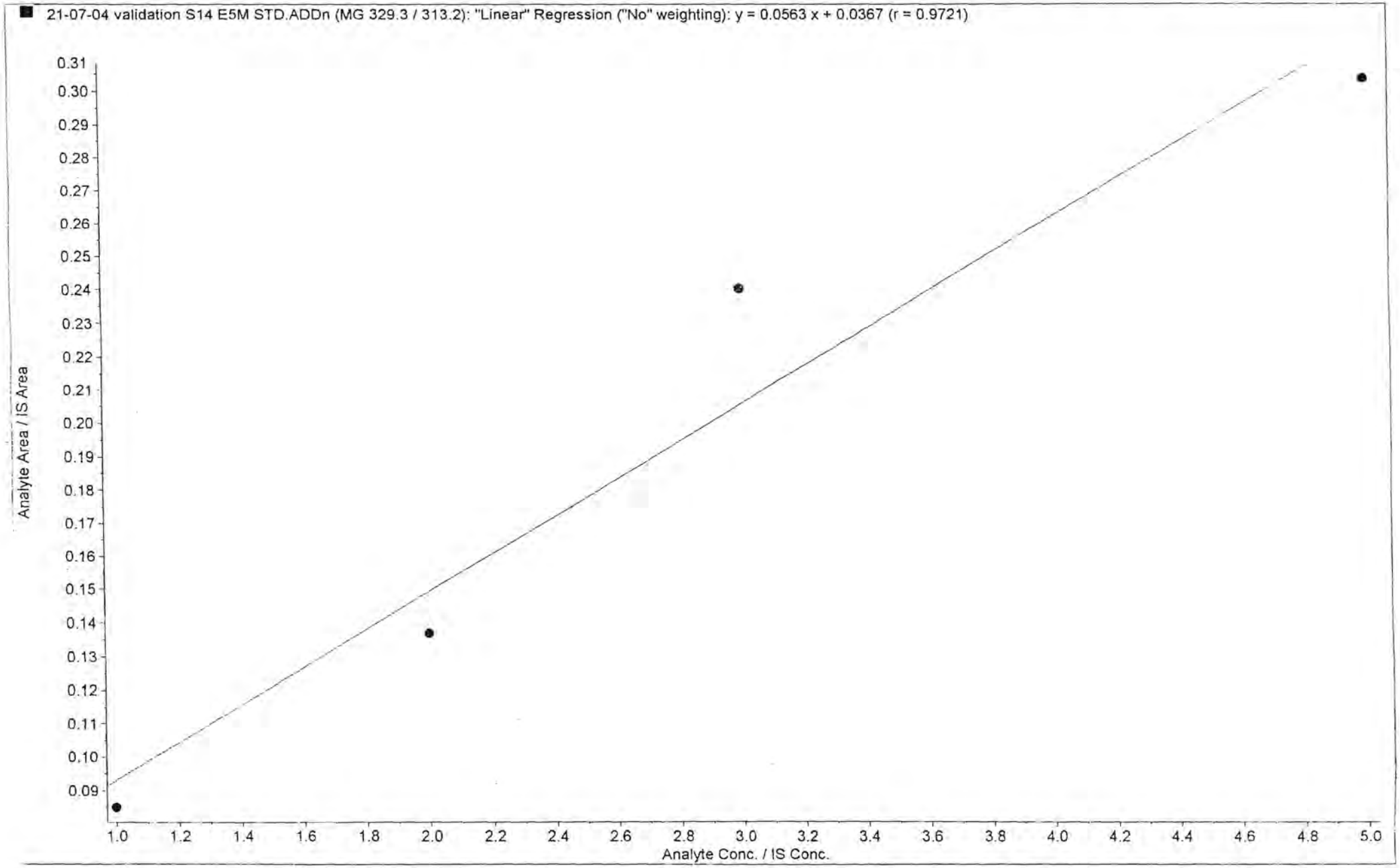

13-07-04 validation standard addition LMG.rdb (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.222 x + -0.0785 (r = 0.9881)
Analyte Area / IS Area
Analyte Conc. / IS Conc.
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

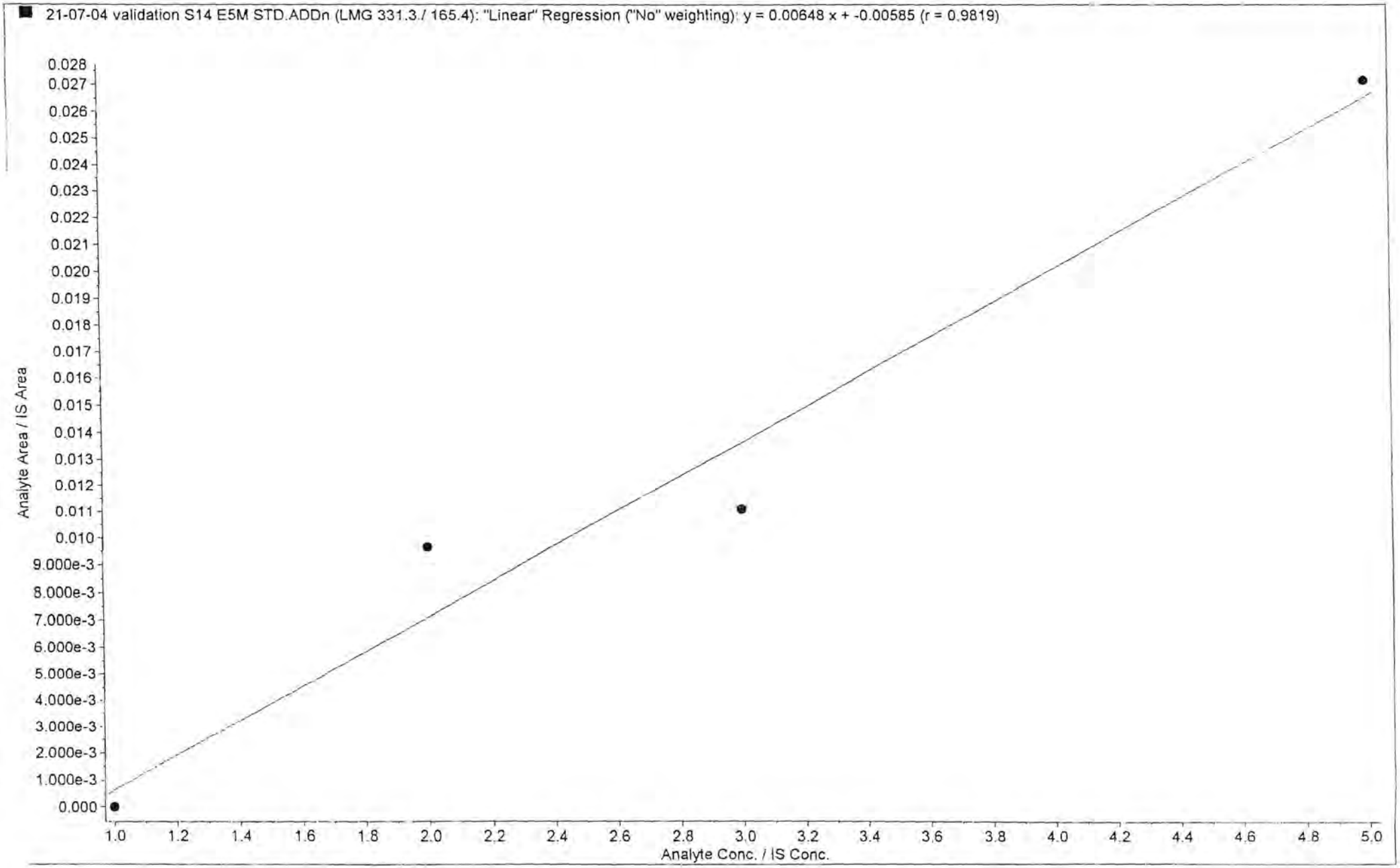

13-07-04 validation standard addition LMG.rdb (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0208 x + -0.00658 (r = 0.9867)
Analyte Area / IS Area
0.44
0.42
0.40
0.38
0.36
0.34
0.32
0.30
0.28
0.26
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
Analyte Conc. / IS Conc.

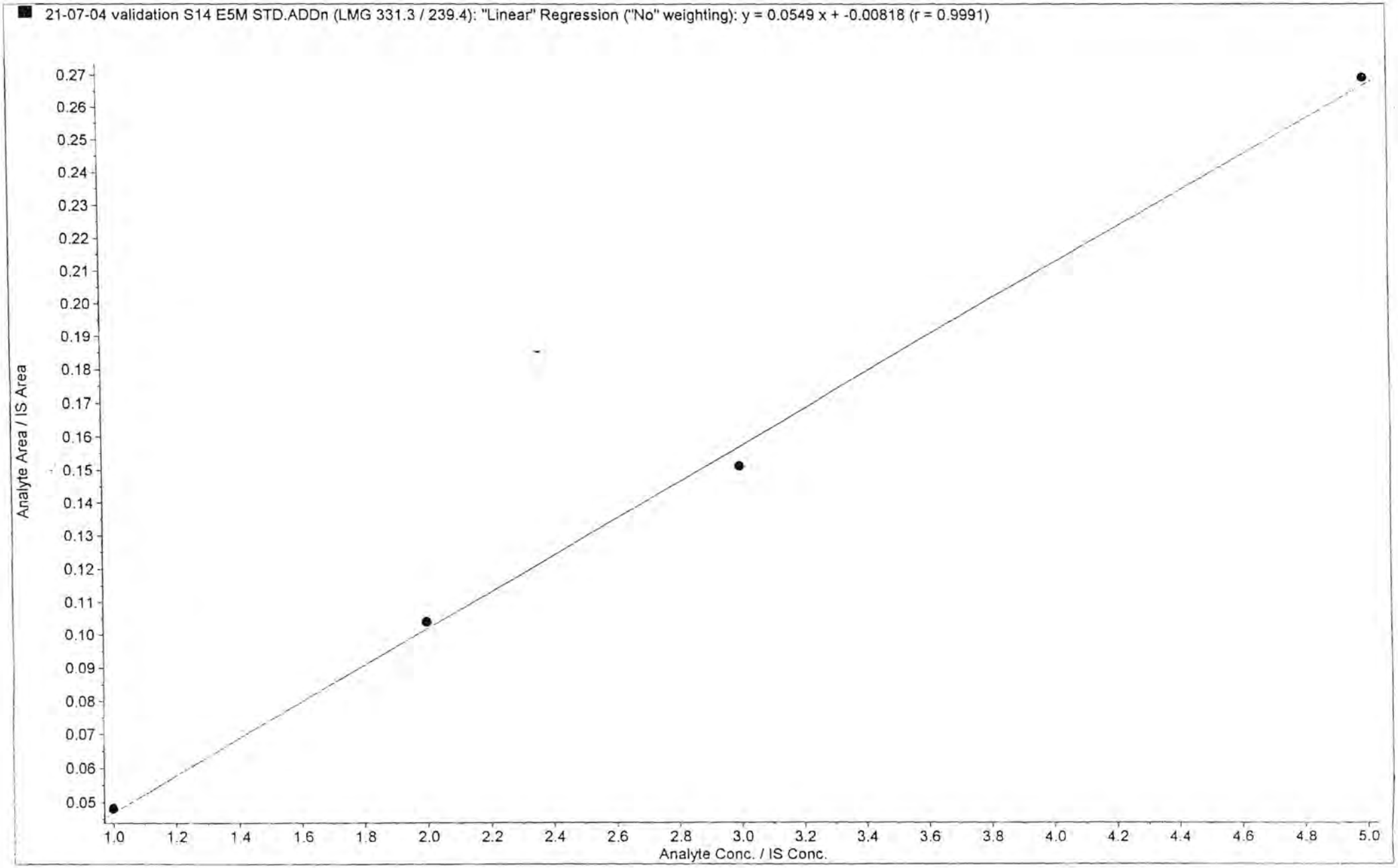
	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	MG-LMG 0 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	0.00e+000	0.00	2.31e+005	No Peak	N/A
2	MG-LMG 0 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.29e+003	0.00	2.31e+005	< 0	N/A
3	MG-LMG 1 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	6.55e+003	1.00	2.43e+005	1.06	106.
4	MG-LMG 1 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	2.20e+004	1.00	2.43e+005	0.943	94.3
5	MG-LMG 2 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.08e+004	2.00	2.23e+005	2.03	102.
6	MG-LMG 2 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	3.97e+004	2.00	2.23e+005	2.08	104.
7	MG-LMG 5 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	2.77e+004	5.00	2.37e+005	5.15	103.
8	MG-LMG 5 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	9.97e+004	5.00	2.37e+005	5.23	105.
9	MG-LMG 10 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	5.50e+004	10.0	2.35e+005	10.5	105.
10	MG-LMG 10 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.89e+005	10.0	2.35e+005	10.2	102.
11	MG-LMG 20 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.01e+005	20.0	2.41e+005	18.9	94.3
12	MG-LMG 20 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	3.64e+005	20.0	2.41e+005	19.4	96.9
13	MG-LMG 30 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	1.61e+005	30.0	2.39e+005	30.6	102.
14	MG-LMG 30 ppb	Standard	July\13-07-04.wiff	5.62e+005	30.0	2.39e+005	30.3	101.
15	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
16	S Snapper control E5	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	7.96e+004	No Peak	N/A
17	S Snapper+1 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.65e+003	1.00	1.29e+005	0.410	41.0
18	S Snapper+1 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	4.34e+003	1.00	1.29e+005	0.206	20.6
19	S Snapper+2 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	3.17e+003	2.00	1.42e+005	0.842	42.1
20	S Snapper+2 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.22e+004	2.00	1.42e+005	0.885	44.3
21	S Snapper+3 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	6.03e+003	3.00	1.89e+005	1.28	42.7
22	S Snapper+3 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	2.23e+004	3.00	1.89e+005	1.30	43.5
23	S Snapper+5 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	7.44e+003	5.00	1.47e+005	2.14	42.8
24	S Snapper+5 ppb E5	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	2.88e+004	5.00	1.47e+005	2.33	46.5
25	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
26	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
27	S Snapper +1 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.88e+003	1.00	1.47e+005	0.411	41.1
28	S Snapper +1 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	7.72e+003	1.00	1.47e+005	0.452	45.2
29	S Snapper+2 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	3.74e+003	2.00	1.35e+005	1.09	54.7
30	S Snapper+2 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.43e+004	2.00	1.35e+005	1.15	57.5
31	S Snapper+3 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	4.48e+003	3.00	8.58e+004	2.21	73.6
32	S Snapper+3 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	1.68e+004	3.00	8.58e+004	2.31	76.9
33	S Snapper+5 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	9.63e+003	5.00	1.35e+005	3.09	61.7
34	S Snapper+5 ppb E5M	Quality Contro	July\20-07-04.wiff	3.16e+004	5.00	1.35e+005	2.81	56.2

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	S14 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	5.01e+004	No Peak	N/A
2	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	1.00	2.24e+004	No Peak	N/A
3	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.55e+002	2.00	4.72e+004	2.39	120.
4	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.20e+002	3.00	3.80e+004	2.61	86.9
5	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.54e+003	5.00	5.67e+004	5.10	102.
6	S14 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	5.01e+004	No Peak	N/A
7	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.08e+003	1.00	2.24e+004	1.02	102.
8	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.90e+003	2.00	4.72e+004	2.04	102.
9	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.73e+003	3.00	3.80e+004	2.89	96.5
10	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.52e+004	5.00	5.67e+004	5.04	101.
11	S14 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	5.01e+004	No Peak	N/A
12	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.52e+002	1.00	2.24e+004	0.790	79.0
13	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.72e+003	2.00	4.72e+004	1.79	89.4
14	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.60e+003	3.00	3.80e+004	3.74	125.
15	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.74e+003	5.00	5.67e+004	4.68	93.7
16	S14 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	5.01e+004	No Peak	N/A
17	S14+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.90e+003	1.00	2.24e+004	0.859	85.9
18	S14+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	6.46e+003	2.00	4.72e+004	1.78	89.0
19	S14+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	9.13e+003	3.00	3.80e+004	3.61	120.
20	S14+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.72e+004	5.00	5.67e+004	4.75	95.0


21-07-04 validation S14 E5M STD.ADDn (MG 329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0163 x + 0.00732 (r = 0.9605)
Analyte Area / IS Area
0.085
0.080
0.075
0.070
0.065
0.060
0.055
0.050
0.045
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


21-07-04 validation S14 E5M STD.ADDn (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0563 x + 0.0367 (r = 0.9721)
Analyte Area / IS Area
0.31
0.30
0.29
0.28
0.27
0.26
0.25
0.24
0.23
0.22
0.21
0.20
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


21-07-04 validation S14 E5M STD.ADDn (LMG 331.3./ 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.00648 x + -0.00585 (r = 0.9819)
Analyte Area / IS Area
0.028
0.027
0.026
0.025
0.024
0.023
0.022
0.021
0.020
0.019
0.018
0.017
0.016
0.015
0.014
0.013
0.012
0.011
0.010
9.000e-3
8.000e-3
7.000e-3
6.000e-3
5.000e-3
4.000e-3
3.000e-3
2.000e-3
1.000e-3
0.000
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

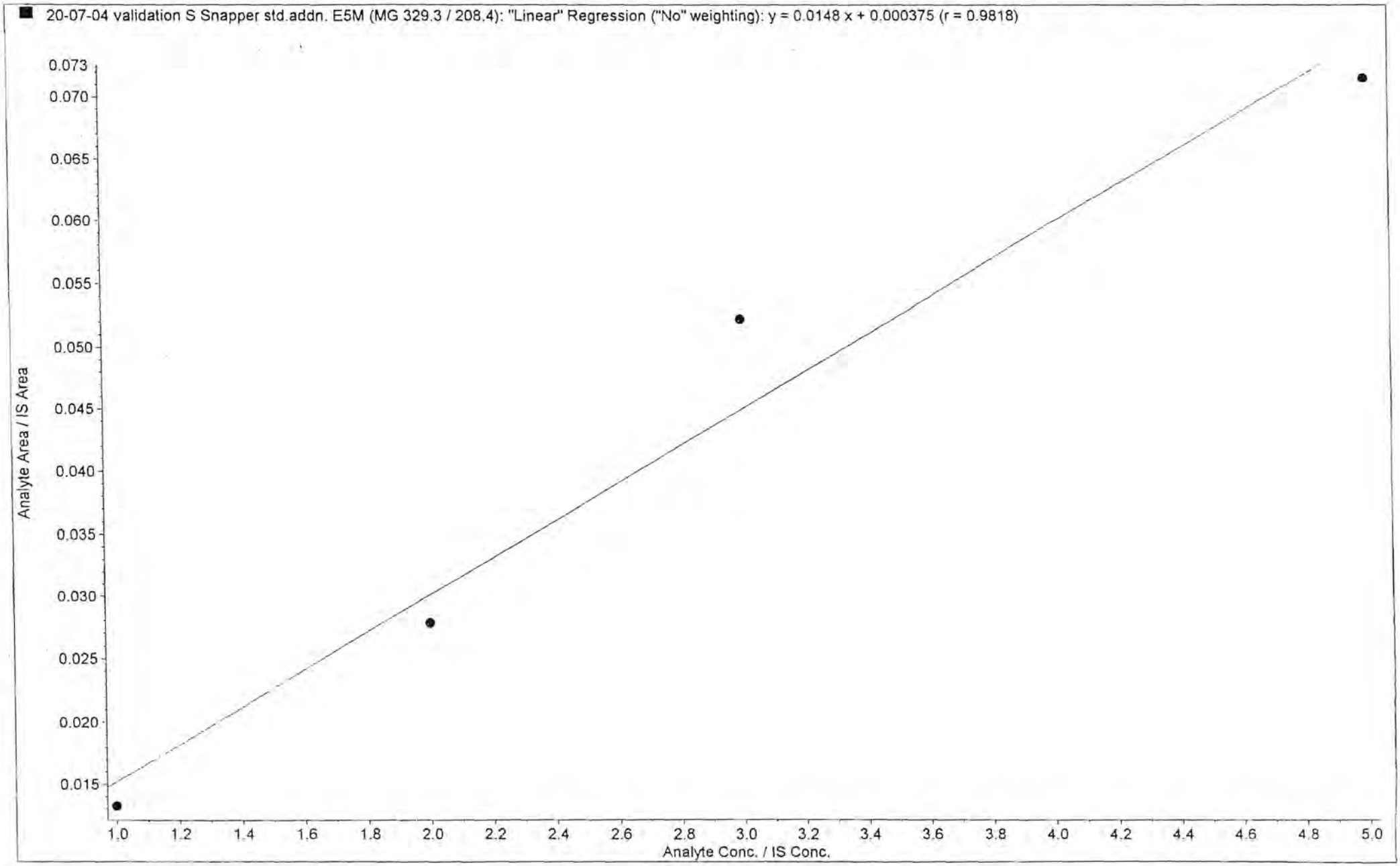

21-07-04 validation S14 E5M STD.ADDn (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0549 x + -0.00818 (r = 0.9991)
Analyte Area / IS Area
0.27
0.26
0.25
0.24
0.23
0.22
0.21
0.20
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

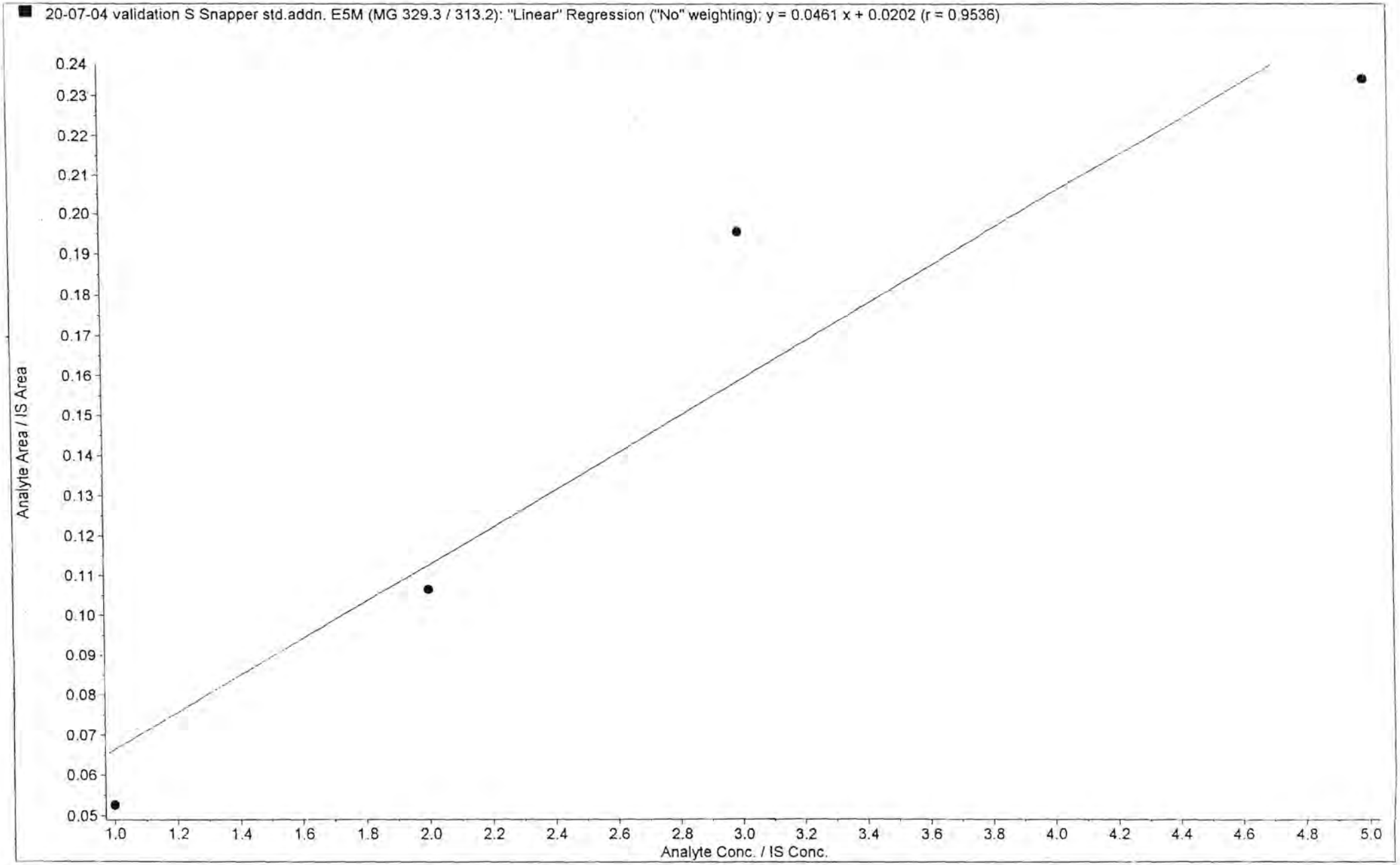
Printing Time: 05:43:21 PM
Printing Date: Tuesday, July 20, 2004
Sample Name: S Snapper control E5M

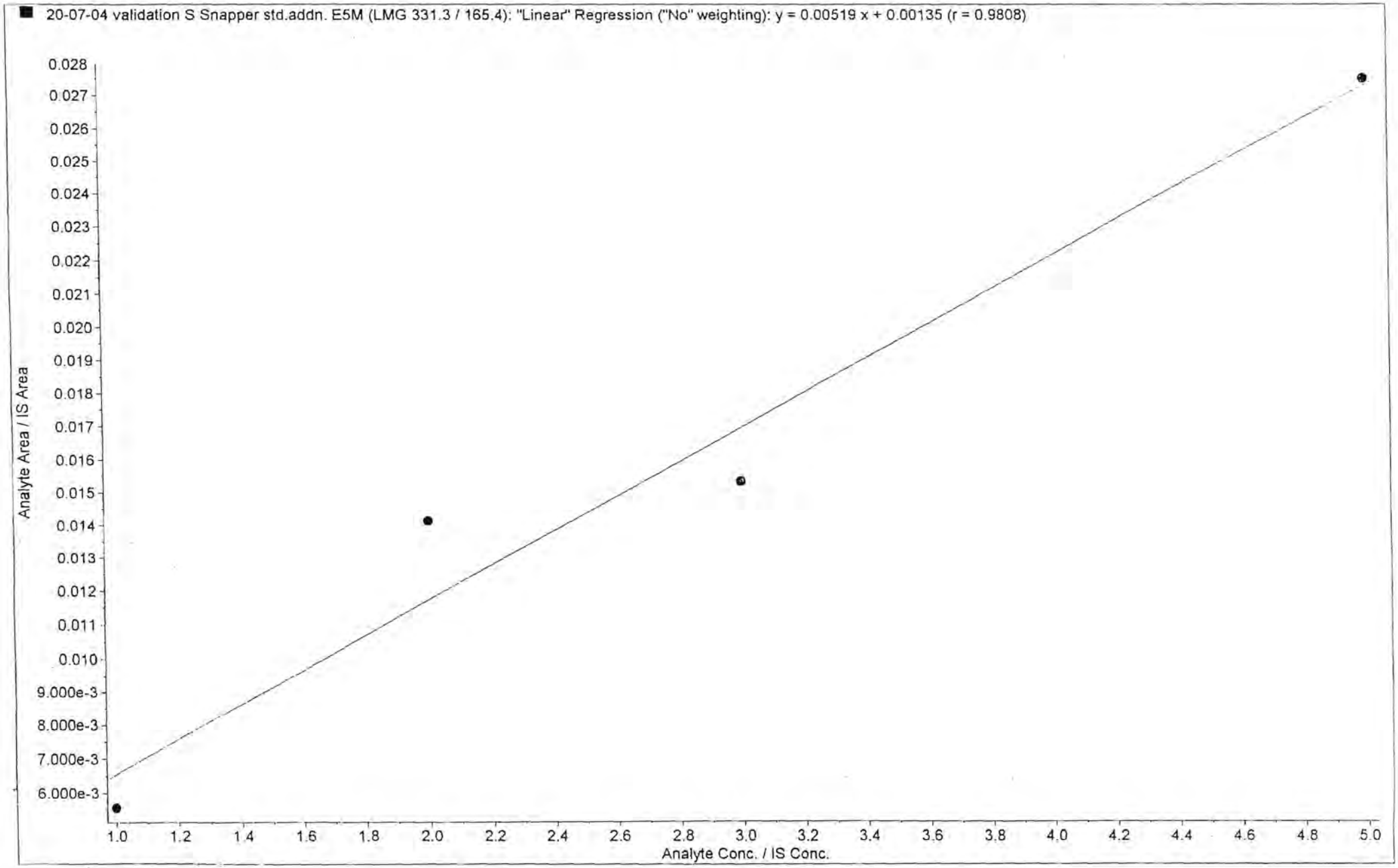
API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.

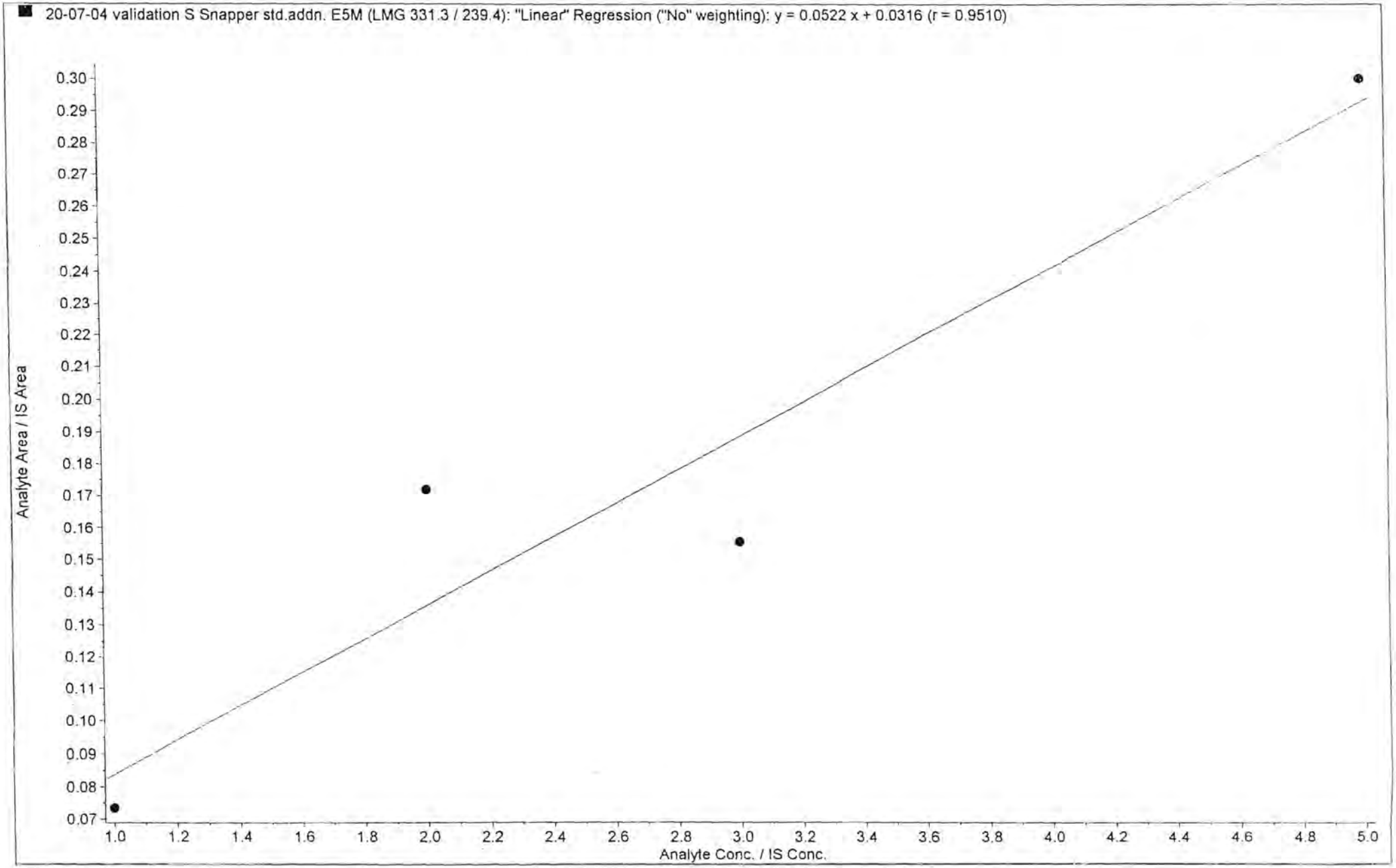
Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: S Snapper control E5M

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
2	S Snapper +1 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	8.15e+002	1.00	1.47e+005	0.810	81.0
3	S Snapper+2 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.90e+003	2.00	1.35e+005	2.46	123.
4	S Snapper+3 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.31e+003	3.00	8.58e+004	2.69	89.7
5	S Snapper+5 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	3.71e+003	5.00	1.35e+005	5.04	101.
6	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
7	S Snapper +1 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.08e+004	1.00	1.47e+005	0.801	80.1
8	S Snapper+2 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	2.31e+004	2.00	1.35e+005	2.68	134.
9	S Snapper+3 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.33e+004	3.00	8.58e+004	2.37	79.0
10	S Snapper+5 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	4.04e+004	5.00	1.35e+005	5.14	103.
11	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
12	S Snapper +1 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.94e+003	1.00	1.47e+005	0.867	86.7
13	S Snapper+2 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	3.74e+003	2.00	1.35e+005	1.85	92.4
14	S Snapper+3 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	4.48e+003	3.00	8.58e+004	3.49	116.
15	S Snapper+5 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	9.63e+003	5.00	1.35e+005	4.79	95.8
16	S Snapper control E5M	Unknown	July\20-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	1.22e+005	No Peak	N/A
17	S Snapper +1 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	7.72e+003	1.00	1.47e+005	0.703	70.3
18	S Snapper+2 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.43e+004	2.00	1.35e+005	1.87	93.3
19	S Snapper+3 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	1.68e+004	3.00	8.58e+004	3.80	127.
20	S Snapper+5 ppb E5M	Standard	July\20-07-04.wiff	3.16e+004	5.00	1.35e+005	4.64	92.7

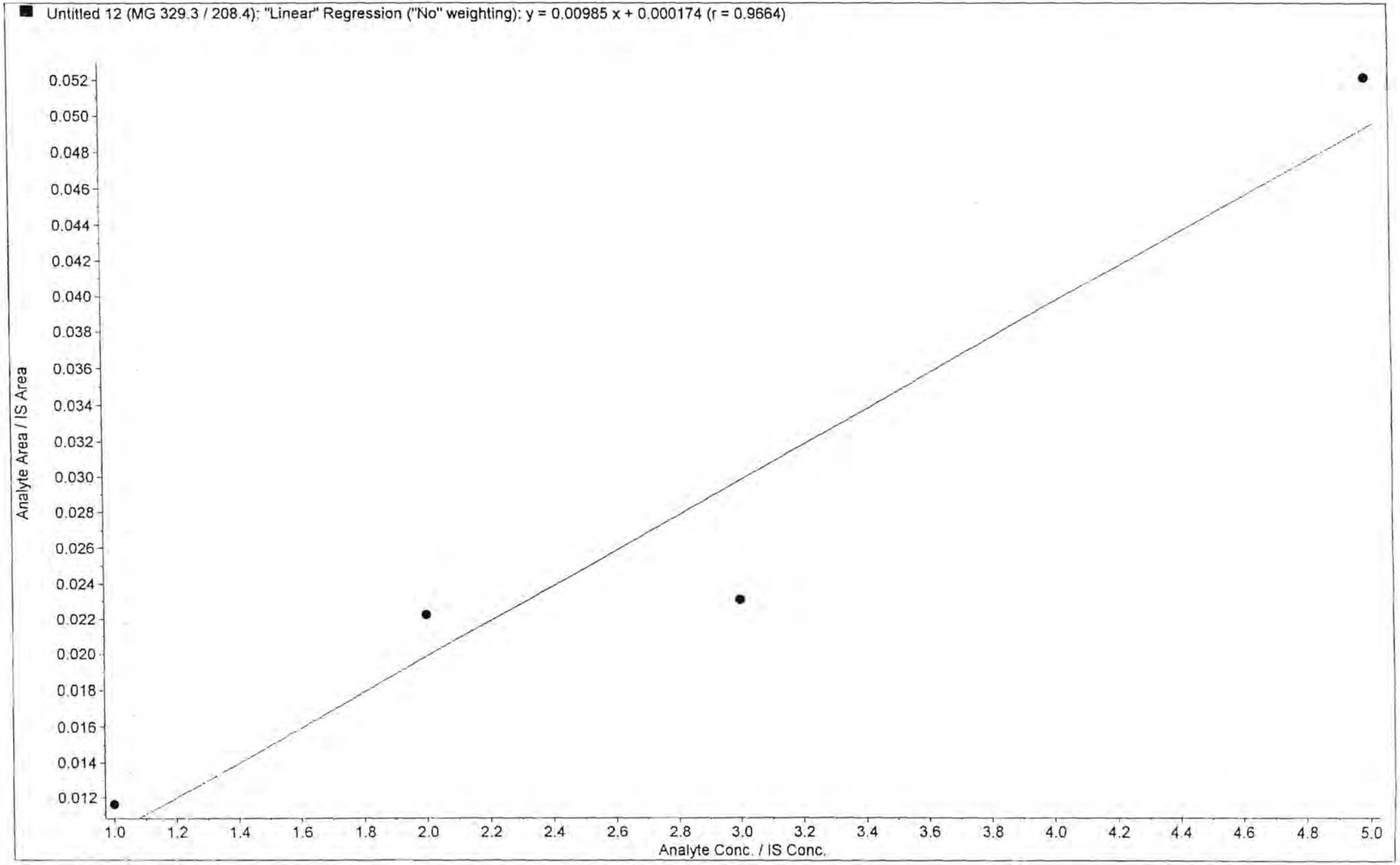

20-07-04 validation S Snapper std.addn. E5M (MG 329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0148 x + 0.000375 (r = 0.9818)
Analyte Area / IS Area
0.073
0.070
0.065
0.060
0.055
0.050
0.045
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

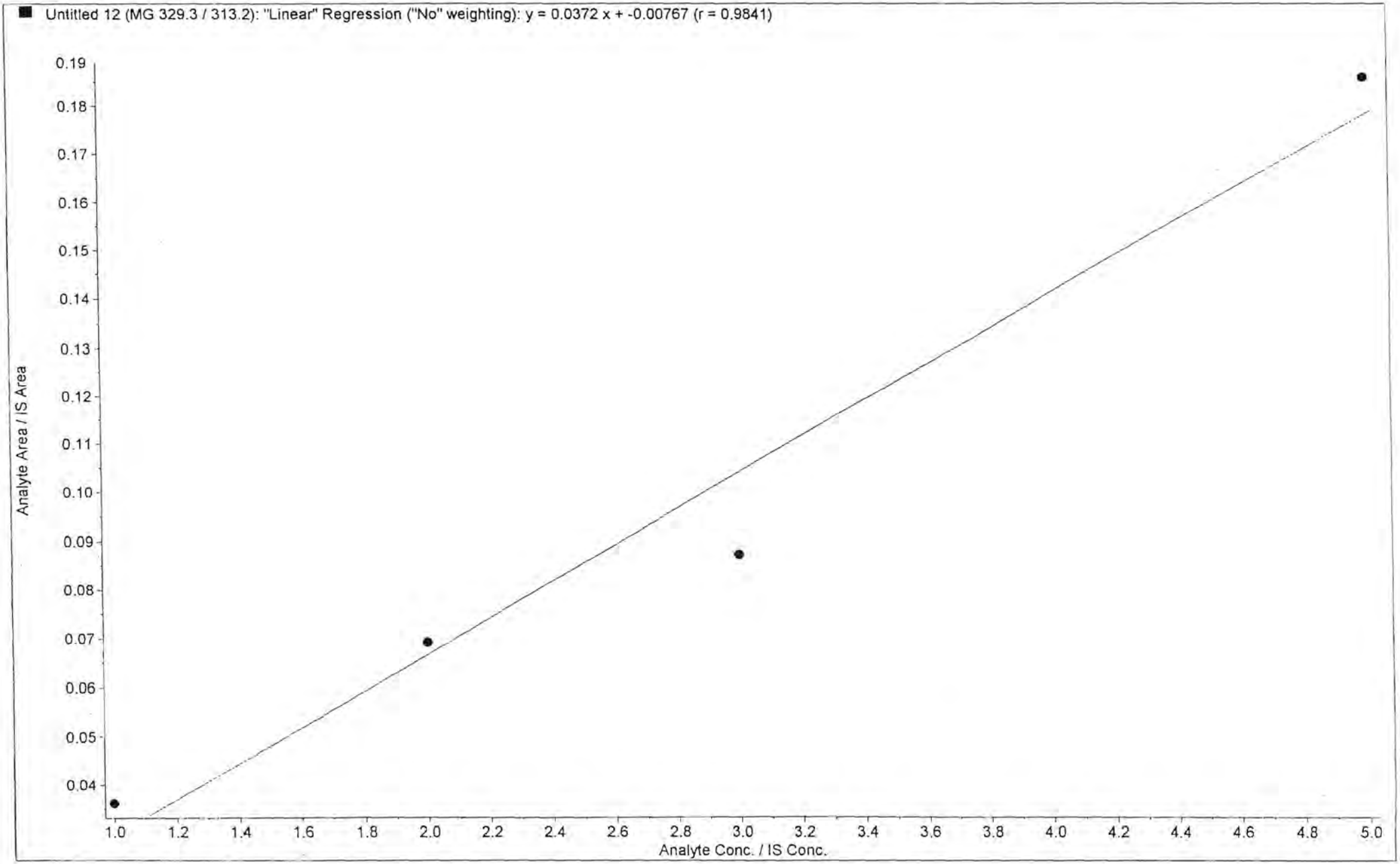

20-07-04 validation S Snapper std.addn. E5M (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0461 x + 0.0202 (r = 0.9536)
Analyte Area / IS Area
0.24
0.23
0.22
0.21
0.20
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

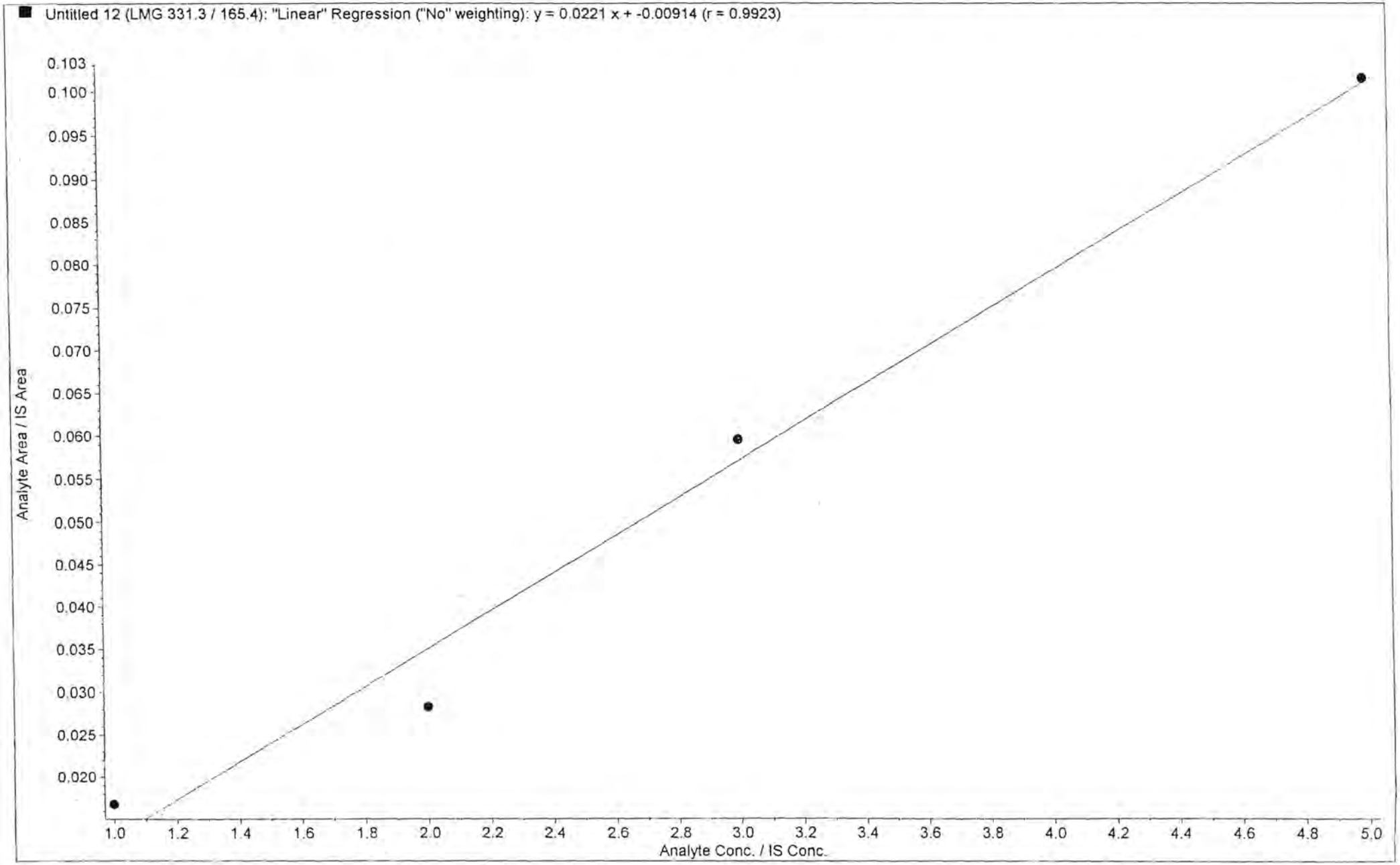

20-07-04 validation S Snapper std.addn. E5M (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.00519 x + 0.00135 (r = 0.9808)
Analyte Area / IS Area
0.028
0.027
0.026
0.025
0.024
0.023
0.022
0.021
0.020
0.019
0.018
0.017
0.016
0.015
0.014
0.013
0.012
0.011
0.010
9.000e-3
8.000e-3
7.000e-3
6.000e-3
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

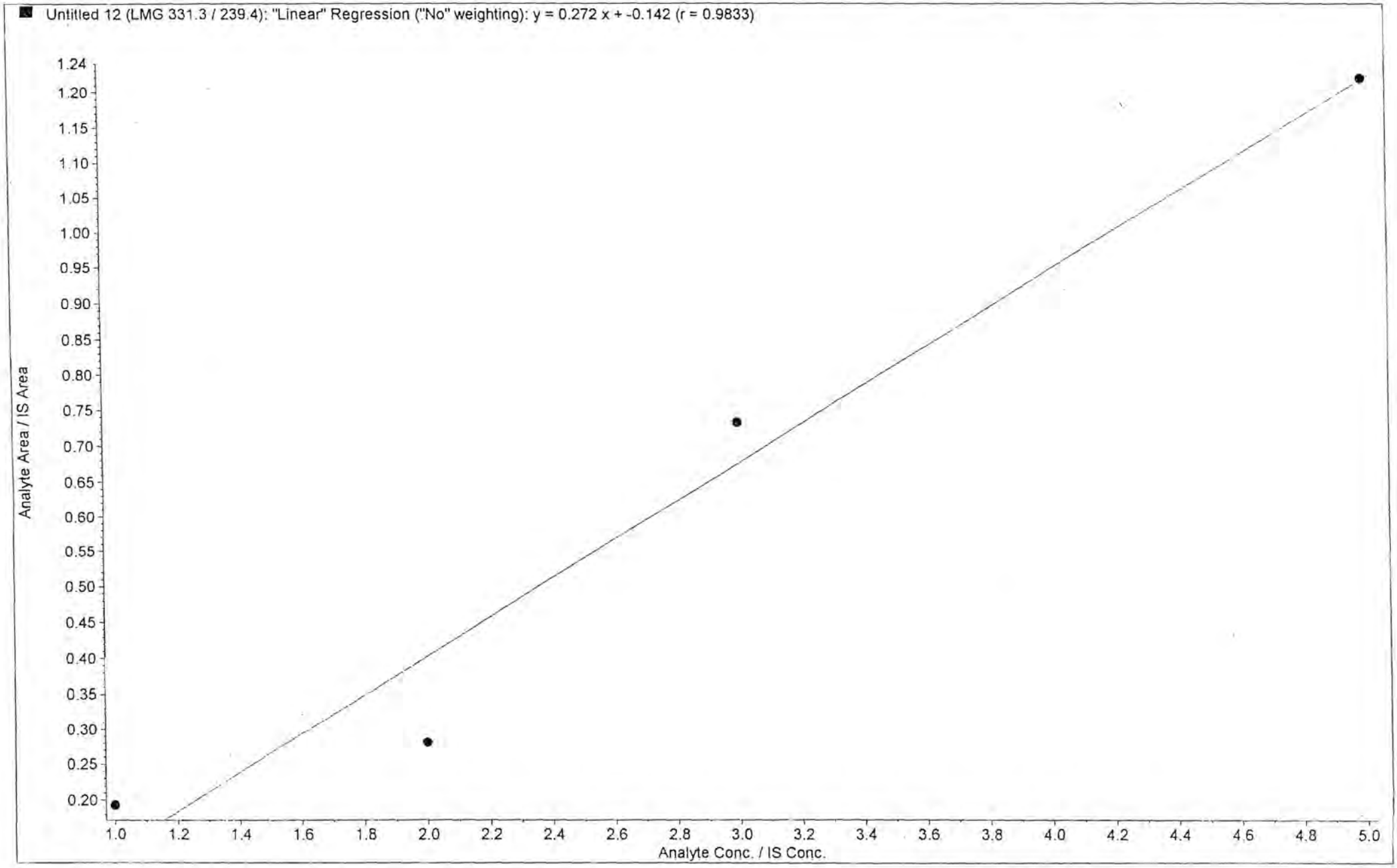

20-07-04 validation S Snapper std.addn. E5M (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0522 x + 0.0316 (r = 0.9510)
Analyte Area / IS Area
0.30
0.29
0.28
0.27
0.26
0.25
0.24
0.23
0.22
0.21
0.20
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

	Sample Name	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Concentration (ng/mL)	IS Peak Area (counts)	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	F4 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	2.11e+005	No Peak	N/A
2	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	3.88e+003	1.00	2.31e+005	1.17	117.
3	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.09e+003	2.00	1.80e+005	1.69	84.7
4	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.50e+004	3.00	2.52e+005	3.11	104.
5	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.25e+004	5.00	2.22e+005	5.02	100.
6	F4 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	1.12e+003	N/A	2.11e+005	0.542	N/A
7	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.46e+004	1.00	2.31e+005	1.23	123.
8	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.04e+004	2.00	1.80e+005	1.55	77.6
9	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.84e+005	3.00	2.52e+005	3.21	107.
10	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.70e+005	5.00	2.22e+005	5.01	100.
11	F4 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	2.11e+005	No Peak	N/A
12	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.68e+003	1.00	2.31e+005	1.16	116.
13	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.00e+003	2.00	1.80e+005	2.24	112.
14	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	5.80e+003	3.00	2.52e+005	2.32	77.4
15	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.16e+004	5.00	2.22e+005	5.28	106.
16	F4 control E5M	Unknown	July\21-07-04.wiff	0.00e+000	N/A	2.11e+005	No Peak	N/A
17	F4+1 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	8.35e+003	1.00	2.31e+005	1.18	118.
18	F4+2 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	1.25e+004	2.00	1.80e+005	2.07	103.
19	F4+3 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	2.19e+004	3.00	2.52e+005	2.55	84.9
20	F4+5 ppb E5M	Standard	July\21-07-04.wiff	4.12e+004	5.00	2.22e+005	5.21	104.


Untitled 12 (MG 329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.00985 x + 0.000174 (r = 0.9664)
Analyte Area / IS Area
0.052
0.050
0.048
0.046
0.044
0.042
0.040
0.038
0.036
0.034
0.032
0.030
0.028
0.026
0.024
0.022
0.020
0.018
0.016
0.014
0.012
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


Untitled 12 (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0372 x + -0.00767 (r = 0.9841)
Analyte Area / IS Area
0.19
0.18
0.17
0.16
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


Untitled 12 (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.0221 x + -0.00914 (r = 0.9923)
Analyte Area / IS Area
0.103
0.100
0.095
0.090
0.085
0.080
0.075
0.070
0.065
0.060
0.055
0.050
0.045
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.


Untitled 12 (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): y = 0.272 x + -0.142 (r = 0.9833)
Analyte Area / IS Area
1.24
1.20
1.15
1.10
1.05
1.00
0.95
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
3.6
3.8
4.0
4.2
4.4
4.6
4.8
5.0
Analyte Conc. / IS Conc.

	Sample Name	MG 329.3 / 208.4	MG 329.3 / 313.2	LMG 331.3 / 165.4	LMG 331.3 / 239.4	Ratio MG	Ratio LMG
1	MG-LMG 0 ppb	0.00e+000	1.29e+003	0.00e+000	0.00e+000	0.00	#DIV/0!
2	MG-LMG 1 ppb	6.55e+003	2.20e+004	3.51e+003	3.42e+004	0.298	0.103
3	MG-LMG 2 ppb	1.08e+004	3.97e+004	5.33e+003	5.06e+004	0.272	0.105
4	MG-LMG 5 ppb	2.77e+004	9.97e+004	1.40e+004	1.69e+005	0.278	0.0825
5	MG-LMG 10 ppb	5.50e+004	1.89e+005	3.47e+004	3.66e+005	0.291	0.0946
6	MG-LMG 20 ppb	1.01e+005	3.64e+005	6.88e+004	7.67e+005	0.277	0.0897
7	MG-LMG 30 ppb	1.61e+005	5.62e+005	1.05e+005	1.21e+006	0.287	0.0863
8	S14 Spiked 5 ppb	4.92e+003	1.60e+004	1.27e+004	1.24e+005	0.308	0.102
9	S14 Control E4	0.00e+000	0.00e+000	3.26e+002	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
10	F4+1ppb	0.00e+000	0.00e+000	1.02e+003	9.95e+003	#DIV/0!	0.102
11	F4+2 ppb	1.97e+003	6.62e+003	4.00e+003	4.04e+004	0.297	0.0989
12	F4+3 ppb	2.69e+003	9.11e+003	6.45e+003	7.48e+004	0.296	0.0863
13	F4+5 ppb	5.92e+003	2.06e+004	9.64e+003	1.26e+005	0.287	0.0766
14	F4.1	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
15	F4.2	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
16	F4.3	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
17	F4.4	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
18	F4.5	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
19	F4.6	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
20	F4.7	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
21	F4.8	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
22	F4.9	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
23	F4.10	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
24	S Snapper+1 ppb	8.53e+002	3.19e+003	2.41e+003	2.45e+004	0.267	0.0985
25	S Snapper+2 ppb	1.93e+003	7.69e+003	4.47e+003	5.08e+004	0.251	0.0879
26	S Snapper+3 ppb	2.96e+003	1.19e+004	6.32e+003	7.94e+004	0.248	0.0795
27	S Snapper+5 ppb	5.72e+003	2.15e+004	1.03e+004	1.24e+005	0.266	0.0830
28	S Snapper	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
29	L Snapper+1 ppb	2.33e+003	7.89e+003	2.39e+003	2.37e+004	0.296	0.101
30	L Snapper+2 ppb	2.22e+003	8.04e+003	3.05e+003	3.96e+004	0.277	0.0768
31	L Snapper+3 ppb	1.93e+003	7.31e+003	7.80e+003	8.39e+004	0.264	0.0930
32	L Snapper+5 ppb	1.06e+004	3.84e+004	1.16e+004	1.27e+005	0.275	0.0912
33	L Snapper	2.12e+003	7.74e+003	0.00e+000	0.00e+000	0.274	#DIV/0!
34	Fish ball+1 ppb	9.56e+002	3.27e+003	1.70e+003	1.78e+004	0.292	0.0953
35	Fish ball+2 ppb	3.87e+002	1.28e+003	4.09e+003	5.11e+004	0.301	0.0801

	Sample Name	MG 329.3 / 208.4	MG 329.3 / 313.2	LMG 331.3 / 165.4	LMG 331.3 / 239.4	Ratio MG	Ratio LMG
36	Fish ball+3 ppb	7.20e+002	0.00e+000	6.42e+003	7.47e+004	#DIV/0!	0.0860
37	Fish ball+5 ppb	4.64e+003	1.68e+004	7.55e+003	8.01e+004	0.277	0.0942
38	Fish ball	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!
39	Salmon+1 ppb	1.92e+002	4.95e+002	2.14e+003	1.82e+004	0.388	0.117
40	Salmon+2 ppb	7.33e+002	3.37e+003	4.06e+003	3.99e+004	0.217	0.102
41	Salmon+3 ppb	2.40e+003	9.17e+003	4.63e+003	5.32e+004	0.262	0.0870
42	Salmon+5 ppb	1.93e+003	7.36e+003	9.35e+003	9.88e+004	0.263	0.0946
43	Salmon	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	0.00e+000	#DIV/0!	#DIV/0!

รายงานการวิจัยเรื่อง

การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเลต และเมตะบอไลต์ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

(Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites residue in aquacultures using HPLC-UV-VISIBLE)

โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหาร
สู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่
(Innovation for the improvement of food safety and food quality for new world economy)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จูอนุวัฒนกุล

ภาควิชาเคมี และห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยในแผนงานวิจัย นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550 – 2551

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ มาลาไคต์กรีน (MG) คริสตัลไวโอเลต (CV) ลิวโคมาลาไคต์กรีน (LMG) และลิวโคคริสตัลไวโอเลต (LCV) ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงพร้อมกัน โดยการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของ ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) กับ acetonitrile และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดและคลีนอัพ แล้ววิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ด้วยเทคนิค reversed phase HPLC-UV-VISIBLE การแยกด้วยโครมาโทกราฟีทำโดยใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax stable bond C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm พร้อมด้วย guard column ชนิดเดียวกัน ใช้ ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile เป็นเฟสเคลื่อนที่โดยทำ gradient elution ตรวจวัดสารทั้งสี่ชนิดพร้อมกันด้วยเครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ (DAD) ที่หลายความยาวคลื่นคือ 618, 585 และ 265 nm การวิเคราะห์ปริมาณอาศัยกราฟมาตรฐานของ total MG (ปริมาณ MG + LMG) และ total CV (ปริมาณ CV + LCV) วิธีนี้ให้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.6 μg/kg – 6 μg/kg ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.5053 μg/kg สำหรับ total MG และ 0.4087 μg/kg สำหรับ total CV ขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 1.684 μg/kg สำหรับ total MG และ 1.362 μg/kg สำหรับ total CV สามารถวิเคราะห์ปริมาณ total MG และ total CV ที่เติมลงในเนื้อปลาหรือเนื้อกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 0.002 mg/kg โดยมีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเฉลี่ย 55.95 – 75.92 % สำหรับ total MG และ 68.01 – 104.47 % สำหรับ total CV และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 4.36 – 9.60 % สำหรับ total MG และ 1.26 – 6.44 % สำหรับ total CV วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเลต และเมตะบอไลต์ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

ABSTRACT

In this study, a method for the simultaneous determination of malachite green (MG), crystal violet (CV), leucomalachite green (LMG) and leucocrystal violet (LCV) in aquacultures has been developed. Sample was extracted with the mixture of ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) and acetonitrile (ACN) using microwave assisted extraction and clean-up, and finally MG, CV, LMG and LCV were analyzed by reversed phase HPLC-UV-VISIBLE. Chromatographic separation was achieved by using Zorbax stable bond C18 column, 150 x 4.6 mm, 5 μm with guard column, ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) and acetonitrile as mobile phase with gradient elution, and multi-wavelength detection with diode array detector at 618, 585 and 265 nm. The external calibration curve of the total MG (the amount of MG + LMG) and the total CV (the amount of CV + LCV) were used for the quantitation method. The linear working concentration range was 0.6 μg/kg – 6 μg/kg. The limit of detection (LOD) for total MG and total CV were 0.5053 μg/kg and 0.4087 μg/kg, respectively. The limit of quantitation (LOQ) for total MG and total CV were 1.684 μg/kg and 1.362 μg/kg μg/kg, respectively. Average recoveries of total MG and total CV from spiked sample of fish and shrimp muscle at 0.002 mg/kg level were 55.95 – 75.92 % and 68.01 – 104.47 %, respectively with relative standard deviation of 4.36 – 9.60 % for total MG and 1.26 – 6.44 % for total CV. The proposed method was applied for the determination of MG, CV, and their metabolites in aquacultures with satisfactory results.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อภาษาไทย		ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		iii
สารบัญเรื่อง		iv
สารบัญตาราง		vi
สารบัญภาพ		vii
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	1.1 มูลเหตุจูงใจและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 สมมติฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2	**การทดลอง**	7
	2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน	7
	2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)	8
	2.3 การศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม	9
	2.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)	11
	2.5 การวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG, CV และ LCV ตกค้างใน ตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE	12
บทที่ 3	**ผลการทดลองและอภิปราย**	14
	3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน	14
	3.1.1 สัดส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase สำหรับทำ gradient elution	14
	3.1.2 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด MG, CV, LMG, LCV ด้วย HPLC-DAD	14
	3.2 กราฟมาตรฐาน	15
	3.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างในเนื้อปลา	17
	3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)	21

หน้า

3.4.1 Linearity, linear working range, limit of detection และ limit of quantitation 22

3.4.2 Accuracy และ precision 24

3.5 การวิเคราะห์ MG, LMG, CV และ LCV ตกค้างในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE 25

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 27

บรรณานุกรม 28

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 1.1	การแจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาแซ่แข็งจากประเทศต่างๆ ของระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed : RASFF) ของสหภาพยุโรป	3
ตารางที่ 3.1	ค่า slope, intercept และ correlation coefficient (r^2) ของ external calibration curve ของ MG, CV, LMG และ LCV	15
ตารางที่ 3.2	retention time และ recovery ของ MG, CV, LMG และ LCV จากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ	18
ตารางที่ 3.3	recovery ของการหาปริมาณ MG, CV, LMG, และ LCV ตกค้างในเนื้อปลาตัวอย่างที่เติม MG, CV, LMG, และ LCV ชนิดละ 0.002 mg/kg ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่ 4	19
ตารางที่ 3.4	recovery และ relative standard deviation ของ total MG (MG + LMG) และ total CV (CV + LCV)	21
ตารางที่ 3.5	สมการเส้นตรง ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น ความชัน และจุดตัดแกนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน	22
ตารางที่ 3.6	Recovery และ RSD ของ total MG และ total CV ใน spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 2 μg/kg	24
ตารางที่ 3.7	ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total MG และ total CV ในตัวอย่างเนื้อปลาและเนื้อกุ้งที่จำหน่ายในตลาดสดและในซุปเปอร์มาร์เก็ต	26

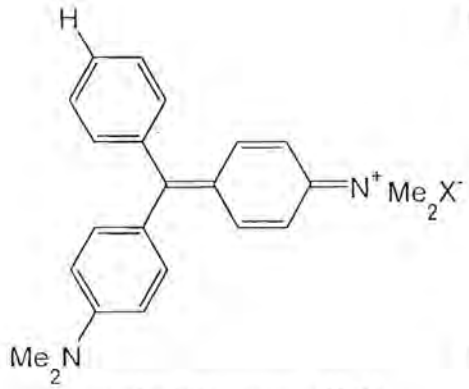
สารบัญภาพ (List of Illustration)

		หน้า
รูปที่ 1.1	โครงสร้างของ malachite green, crystal violet, leucomalachite green และ leucocrystal violet	1
รูปที่ 3.1	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.030 mg/L	15
รูปที่ 3.2	Calibration curve ของ (ก) MG (ข) CV (ค) LMG (ง) LCV ในช่วงความเข้มข้น 0.003 – 0.030 mg/L	17
รูปที่ 3.3	โครงสร้างของ MG และเมตะบอไลต์	19
รูปที่ 3.4	กราฟมาตรฐานระหว่าง total MG (mg/L) กับ total peak area (mAU)	20
รูปที่ 3.5	กราฟมาตรฐานระหว่าง total CV (mg/L) กับ total peak area (mAU)	21

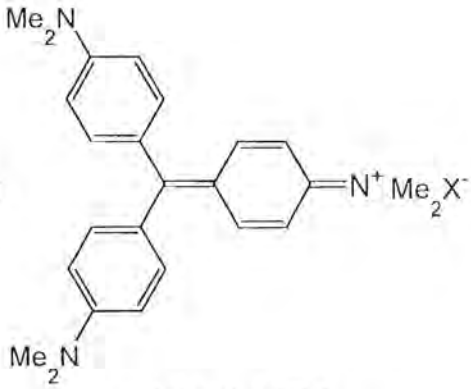
บทที่ 1
บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจและความสำคัญของปัญหา

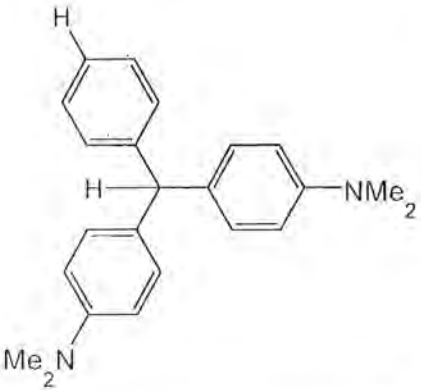
malachite green (MG) และ crystal violet (CV) เป็นสารเคมีที่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบางส่วนนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา จุลินทรีย์ ปรสิต และโปรโตซัวในน้ำ ซึ่งเป็นความเข้าใจที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากสารดังกล่าวไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้



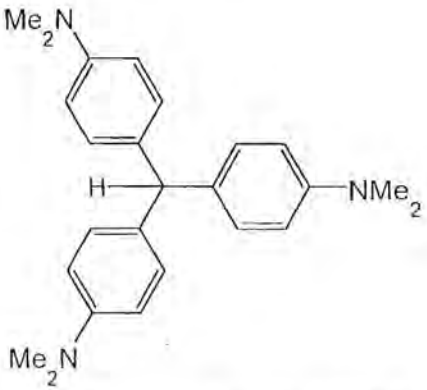
malachite green (MG)



crystal violet (CV)



leucomalachite green (LMG)



leucocrystal violet (LCV)

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ malachite green, crystal violet, leucomalachite green และ leucocrystal violet

MG และ CV เป็นสารสี จัดอยู่ในกลุ่ม N-methylated triphenylmethane[1,2] เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[3] ถูกดูดซับได้ง่ายผ่านทางกระแสน้ำโดยซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ เมื่อมีการสะสมสารเหล่านี้ในปริมาณหนึ่ง อาจทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้[3-7] ดังนั้นในปี ค.ศ.1978 ประเทศสหรัฐอเมริกาจึงควบคุมการใช้ MG อย่างเข้มงวดและอนุญาตให้ใช้เฉพาะหน่วยงานเพาะเลี้ยงเพื่อแพร่พันธุ์เท่านั้น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้เช่นกัน

ระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed : RASFF) ของสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้แจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาแซ่แข็งซึ่งเป็นสินค้าส่งออกจากประเทศต่างๆ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1-1 นอกจากนี้ Commission Regulation No. 2002/657/EC ได้กำหนด minimum required performance limit (MRPL) สำหรับการหาปริมาณ MG และ LMG ที่ตกค้างเป็น 2 µg/kg[6-8] ประเทศไทยจึงต้องมีวิธีการตรวจวัดปริมาณของ MG และ CV ที่ตกค้างในเนื้อปลาเพื่อควบคุมไม่ให้สินค้าส่งออกของไทยมี MG และ CV ตกค้าง เพื่อเป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจในด้านการส่งออกสินค้า

ในอดีตจะมีการวิเคราะห์เฉพาะปริมาณของ MG และ CV ที่ตกค้างในเนื้อปลาเท่านั้น ต่อมามีผู้ศึกษาพบว่า เมื่อ MG และ CV เข้าสู่เนื้อเยื่อของปลา จะเกิดเมแทบอลิซึม กลายเป็น leucomalachite green (LMG) และ leucocrystal violet (LCV) ตามลำดับ[2-7] ทำให้ตรวจไม่พบ MG และ CV แต่เมื่อมีการตรวจวัดปริมาณ LMG และ LCV ที่เดิมไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ พบว่ามี LMG และ LCV ตกค้างในเนื้อปลา ทำให้เกิดความเสียหายในด้านการส่งออก ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณสารทั้ง 4 ชนิดที่ตกค้างในเนื้อปลา โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatograph (HPLC) ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์และทดสอบอาหารโดยทั่วไป

ตารางที่ 1.1 การแจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาแช่แข็งจากประเทศต่างๆ ของระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed : RASFF) ของสหภาพยุโรป

Date	Notified by	Reason for Notifying	Country of origin
03/01/2006	Spain	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen fillets of pangasius	Vietnam
19/01/2006	United Kingdom	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen catfish	Indonesia
24/01/2006	Spain	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen pangasius fillets	Vietnam
14/02/2006	Poland	Unauthorized substance crytal violet and leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
14/02/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen gutted eel	China
27/03/2006	United Kingdom	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen Mekong catfish slices	Vietnam
07/04/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen panga fillets	Vietnam
18/04/2006	Greece	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen pangasius fillets	Vietnam
01/05/2006	Belgium	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen fillets of pangasius hypophthalmus	Vietnam
17/07/2006	Poland	Unauthorized substance crystal violet and leucomalachite green in eel	Indonesia
17/07/2006	Poland	Unauthorized substance malachite green, crystal violet, leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
17/07/2006	Poland	Unauthorized substance crystal violet in frozen gutted eel	Indonesia
24/07/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
24/07/2006	Poland	Unauthorized substance leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
18/08/2006	Poland	Unauthorized substance malachite green and leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
18/08/2006	Poland	Unauthorized substance malachite green and leucomalachite green in frozen gutted eel	Indonesia
27/09/2006	Greece	Unauthorized substance malachite green and leucomalachite green in frozen gutted eel	Vietnam
12/12/2006	United Kingdom	Unauthorized substance crystal violet in frozen salmon skewers	Thailand
23/01/2007	Spain	Unauthorized substance malachite green in trout	Spain
08/03/2007	Denmark	Unauthorized substance leucomalachite green in eel	China via Poland

1.2 สมมติฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

MG, CV, LMG และ LCV มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 1.1) MG และ CV เป็นสารที่มีขั้วและมีสี จึงสามารถดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลได้ โดยจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 618 และ 585 nm ตามลำดับ[2] ต่างจาก LMG และ LCV ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้วและไม่มีสี จึงดูดกลืนแสงได้ในช่วงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 265 nm[2] การวิเคราะห์สารทั้งสี่พร้อมกันในการวิเคราะห์ครั้งเดียว ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ (diode array detector, DAD) จึงอาจทำได้โดยการตั้งโปรแกรมให้เครื่องตรวจวัดที่ค่าความยาวคลื่นหลายค่า (multi-wavelength) และจากสภาพมีขั้วที่แตกต่างกันของสารเหล่านี้ การเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีขั้วต่างกันในสัดส่วนที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด (gradient elution) อาจทำให้สามารถแยกสารทั้งสี่ได้อย่างสมบูรณ์

ปัจจุบันการวิเคราะห์ปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างอยู่ในเนื้อปลา ส่วนใหญ่ใช้เทคนิค liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง[2,4,6,7] จึงอาจดัดแปลงมาใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-VIS) ซึ่งมีราคาถูกกว่า แต่เนื่องจากเทคนิค HPLC-UV-VIS มีสภาพไว (sensitivity) ต่ำกว่าเทคนิค LC-MS/MS ในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยจึงจำเป็นต้องมีการปรับเพิ่มความเข้มข้น (preconcentration) และลดการรบกวนจากเมทริกซ์ด้วยวิธีคลีนอัพ (clean up) ที่เหมาะสม ซึ่งการใช้ solid-phase extraction (SPE) เพื่อคลีนอัพสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว นอกจากนี้อาจใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดและคลีนอัพ[9]

ในปี ค.ศ. 1997 Rushing และ Thompson[3] ได้วิเคราะห์หาปริมาณ MG, gentian violet (GV), leucogentian violet (LGV) และ LMG ในเนื้อปลาดุกและปลาเทร้าท์ โดยใช้เทคนิค HPLC-VIS คลีนอัพด้วย neutral alumina และ propylsulfonic acid cation-exchange solid phase extraction cartridges และใช้ short-chain deactivated (SCD) reversed-phase column (i.d. 250 × 4.6 mm) ที่ต่อด้วย post-column reactor เพื่อออกซิไดส์ LMG และ LGV ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีให้เปลี่ยนเป็นสารที่มีสีคือ MG และ GV ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ของ LMG, MG, LGV และ GV ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg ในเนื้อปลาดุกมีค่าเท่ากับ 75.4 $\pm$ 3.0, 61.3 $\pm$ 4.1, 72.6 $\pm$ 3.7 และ 87.9 $\pm$ 2.5 (n = 4) ในเนื้อปลาเทร้าท์มีค่าเท่ากับ 82.6 $\pm$ 2.3, 48.6 $\pm$ 1.8, 72.1 $\pm$ 2.1 และ 83.8 $\pm$ 4.6 (n = 4)

ในปี ค.ศ. 1998 Tarbin และคณะ[2] ได้เสนอวิธีการสกัดและคลีนอัพเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ malachite green และ crystal violet และ metabolites (leucomalachite green และ leucocrystal violet) ในเนื้อปลาเทร้าท์ และตรวจวิเคราะห์แบบ screening ด้วยเทคนิค HPLC-visible ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS (ESP-MS) โดยใช้คอลัมน์ของ lead(IV) oxide สำหรับ on-line oxidation เพื่อเปลี่ยน LMG และ LCV เป็น MG และ CV ตามลำดับ ก่อนเข้าตรวจวัด

ด้วย visible detector การวิเคราะห์ที่ระดับ 2 μg/kg มีเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (recovery) อยู่ในช่วง 66-116% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าเท่ากับ 1-17% ส่วนการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS (ESP-MS) มี recovery อยู่ในช่วง 61-94% และ RSD 4-15%

ในปี ค.ศ. 2003 Bergwerff และ Scherpenisse[4] ได้เสนอวิธีสกัด MG จากเนื้อปลาเพาะเลี้ยงด้วย McIlvaine buffer (pH 3.0) – acetonitrile และนำไปคลีนอัพด้วย aromatic sulfonic acid solid-phase extraction column หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ liquid chromatography/ tandem mass spectrometry ชนิด electrospray ionization (LC-ESI-MS-MS) มีการเติม ascorbic acid และ N,N,N′,N′,-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride เพื่อลด de-methylation ของ MG และยังคงใช้ PbO_2 post-column oxidation ก่อนที่ตัวอย่างจะเข้าสู่ visible detector (620 nm) หรือ LC-MS/MS โดยใช้ multiple reaction monitoring (MRM) mode สามารถตรวจวิเคราะห์ MG หรือ LMG ที่ระดับ 2.5-2000 μg/kg ใน catfish, eel, rainbow trout, salmon, tropical prawn, turbot โดยมี detection limit 1 μg/kg สำหรับ HPLC และ 0.2 μg/kg สำหรับ LC-MS/MS มี recovery ของ LMG เท่ากับ 86 ± 15% สำหรับกุ้ง และ 105 ± 14% สำหรับปลาไหล นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าการแช่เยือกแข็งและละลาย การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และ -20 °C มีผลกระทบต่อ recovery ของ MG และ LMG

ในปี ค.ศ. 2005 Scherpenisse และ Bergwerff [6] ได้เสนอวิธีหาปริมาณ LMG ในเนื้อปลาเทร้าท์และแพนกาเซียสด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยสกัดเนื้อปลาด้วย McIlvaine buffer-acetonitrile แล้วคลีนอัพด้วย aromatic sulfonic solid phase extraction column จากนั้นเปลี่ยน LMG ให้เป็น MG โดย post-column oxidation ด้วย PbO_2 และวิเคราะห์ปริมาณด้วย LC-MS/MS โดยใช้ multiple reaction monitoring (MRM) mode (m/z 329 → m/z 313) detection limit = 0.11 μg/kg quantification limit = 0.18 μg/kg และ recovery = 66% ที่ระดับ 0.4 μg/kg และ 112% ที่ระดับ 0.1 μg/kg

ในปีเดียวกันนี้ Valle และคณะ[7] ได้พัฒนาวิธีการหาปริมาณของ MG และ LMG ในเนื้อปลาแซลมอนโดยใช้ oxidative pre-column เปลี่ยน LMG ให้เป็น MG ก่อนที่จะตรวจวัดปริมาณโดยเทคนิค liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC-APCI-MS) recovery ของ MG และ LMG ในเนื้อปลาแซลมอนมีค่าเท่ากับ 85 % และ 70 % ตามลำดับ (ที่ 2 μg/kg) ค่า RSD ของ LMG และ MG มีค่าเท่ากับ 1.3 % และ 3.1 % ตามลำดับ

นอกจากนี้ Mitrowska และคณะ[11] ได้ใช้เทคนิค liquid chromatography-visible/ fluorescence detection ในการหาปริมาณ MG และ LMG ในเนื้อปลาคราฟท์ โดยนำเนื้อปลามาสกัดด้วย acetonitrile-buffer mixture และ dichloromethane คลีนอัพด้วย SCX solid phase extraction column และวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยไม่ใช้ PbO_2 post column ตรวจวัด

MG ด้วย visible (620 nm) และตรวจวัด LMG ด้วย FLD (λ_{ex} = 265 nm และ λ_{em} = 360 nm) MG และ LMG มีค่าเท่ากับ 62.8 % และ 91.5 % ตามลำดับ (ที่ 2 µg/kg) ค่า RSD ของ MG และ LMG มีค่าเท่ากับ 8.8 % และ 6.1 % ตามลำดับ วิธีนี้ให้ recovery ตั้งแต่ 60.4-63.5% ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, และ 2 µg/kg สำหรับ MG และ 89.0-91.5% สำหรับ LMG มีค่า RSD เท่ากับ 10.9 และ 8.6% ตามลำดับ detection limit เท่ากับ 0.15 และ 0.13 µg/kg และ quantification limit เท่ากับ 0.37 และ 0.32 µg/kg สำหรับ MG และ LMG ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตาม minimum required performance limit (MRPL) 2 µg/kg

ในปี ค.ศ. 2006 Lee และคณะ[12] ได้เสนอวิธีหาปริมาณ MG และ LMG ในส่วนที่กินได้ของเนื้อปลาทองด้วยวิธี liquid chromatography-ion trap mass spectrometry โดยใช้เทคนิค "time segment" และมี atrazine-d_5 เป็น internal standard การสกัด MG และ LMG ทำโดยใช้ perchloric acid และ acetonitrile ตามด้วย dichloromethane คลีนอัพด้วย Strata-x polymeric solid-phase extraction column ระบบ HPLC คือ reversed-phase, gradient mode และส่วน MS/MS เป็นแบบ multiple-reaction-monitoring, positive ESI-MS linearity ของ matrix calibration curve อยู่ในช่วง 5-500 ng/mL สำหรับ MG และ 1-100 ng/mL สำหรับ LMG recovery มีค่ามากกว่า 71% สำหรับ MG ที่ระดับ 2, 10, 30 ng/g และมากกว่า 89% สำหรับ LMG ที่ระดับ 0.4, 2, 6 ng/g RSD ไม่เกิน 8% detection limit เท่ากับ 0.13 ng/g สำหรับ MG และ 0.06 ng/g สำหรับ LMG

Halme และคณะ[13] ได้วิเคราะห์ MG และ LMG ในปลาเทร้าท์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS, positive-ion electrospray โดยใช้ LMG-D_5 เป็น internal standard ในการวิเคราะห์ LMG และ brilliant green (BG) เป็น internal standard ในการวิเคราะห์ MG ปรากฏว่าได้ recovery อยู่ในช่วง 58-65% (RSD = 7.8-11.2%) สำหรับ MG และ 59-68% (RSD = 9.7-16.9%) สำหรับ LMG และ detection limit เท่ากับ 0.13 และ 0.16 µg/kg สำหรับ MG และ LMG ตามลำดับ ส่วน quantification limit เท่ากับ 0.22 และ 0.27 µg/kg ตามลำดับ

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง
2. พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์ MG , CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงที่ถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว หรือง่ายขึ้น
2. ได้ข้อมูลสถานะการตกค้างของ MG, CV, LMG และ LCV ในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ด้วยเทคนิค HPLC-UV-VIS ทำโดยใช้ Agilent Technologies 1100 series HPLC system ซึ่งประกอบด้วย binary pump, degasser, autosampler, column heater และ diode array detector (DAD) การแยก MG, CV, LMG และ LCV ใช้เทคนิค reversed phase chromatography โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile (ACN) โดยทำ gradient elution และใช้ diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 618 nm เพื่อตรวจวัด MG ความยาวคลื่น 585 nm เพื่อตรวจวัด CV และความยาวคลื่น 264 nm เพื่อตรวจวัด LMG และ LCV

1. นำสารละลายมาตรฐานผสมของ MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.030 mg/L ฉีดเข้าสู่ HPLC ที่สภาวะดังนี้

Injection volume	100 μL
Column	Zorbax stable bond C18, 150 × 4.6 mm, 5 μm
Guard column	Zorbax stable bond C18, 4 × 4 mm, 5 μm
Column temperature	30° C
Mobile phase	ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) : ACN
Flow rate	2 mL/min
Detection	Diode array detector (DAD)
	618 nm for MG detection
	585 nm for CV detection
	265 nm for LMG and LCV detection

2. ปรับสัดส่วนโดยปริมาตรของ mobile phase สำหรับทำ gradient elution เพื่อหา gradient program ที่ทำให้พีกของสารทั้ง 4 ชนิดแยกจากกันได้ดี ดังนี้

เวลา (นาที)	ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) : acetonitrile (v/v)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.00 – 7.00	50 : 50	80 : 20	50 : 50
7.01 – 12.50	65 : 35	65 : 35	35 : 65
12.51 – 20.00	80 : 20	50 : 50	30 : 70

3. ยืนยันตำแหน่งของสารทั้ง 4 ชนิดบนโครมาโทแกรมโดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.050 mg/L เข้าสู่ HPLC โดยใช้สภาวะตามข้อ 1 และใช้ gradient program ที่ทำให้พีกของสารทั้ง 4 ชนิดแยกจากกันได้ดี

2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

1. นำสารละลายมาตรฐานผสม (working standard solution) ของ MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.003, 0.005, 0.010 และ 0.030 mg/L ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD ที่สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

Injection volume	100 µL
Column	Zorbax stable bond C18, 150 × 4.6 mm, 5 µm
Guard column	Zorbax stable bond C18, 4 × 4 mm, 5 µm
Column temperature	30° C
Mobile phase	ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) : ACN
	50 : 50 (0.00 – 7.00 min)
	65 : 35 (7.01 – 12.50 min)
	80 : 20 (12.11 – 20.00 min)
Flow rate	2 mL/min
Detection	Diode array detector (DAD)
	618 nm (0.00 – 7.00 min)
	585 nm (7.01 – 12.00 min)
	265 nm (12.01 – 20.00 min)

2. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสาร (mg/L) และพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของสารแต่ละชนิดในโครมาโทแกรม

2.3 การศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาที่เติม MG, CV, LMG และ LCV (spiked sample) ชนิดละ 2 µg/kg (0.002 mg/kg) โดยการสกัดและคลีนอัพเพื่อกำจัด matrix ต่างๆ ที่มีอยู่ในเนื้อปลา 4 วิธี คือ

วิธีที่ 1 การสกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ acetonitrile (ACN)

1. ชั่งเนื้อปลาที่สับละเอียดแล้ว 5.00 ± 0.01 g ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 50 mL เติม (spike) สารละลายมาตรฐาน MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 1.0 mg/L ชนิดละ 10 µL (spiked sample ที่ได้มี MG, CV, LMG และ LCV ชนิดละ 2 µg/kg หรือ 0.002 mg/kg)

2. เติมสารละลาย hydroxylamine (HA) 25% ปริมาตร 0.5 mL สารละลาย ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) 5 mL สารละลาย *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TSA) 1 M 0.5 mL และ acetonitrile (ACN) 20 mL แล้ว homogenize ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที 3 ครั้ง

3. นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4,400 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเนื้อปลาออกจากสารสกัด

4. ใช้ pastuer pipet ดูดสารละลาย supernatant ที่ได้จากการสกัดเนื้อปลาทั้งหมดลงในขวดแก้วขนาด 40 mL อีกขวดหนึ่ง

5. เติม dichloromethane (DCM) ปริมาตร 10 mL นำไป vortex-mixed แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ 4,400 rpm เป็นเวลา 10 นาที

6. นำสารละลายใสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยการพ่นแก๊สไนโตรเจนที่ 50°C

7. ละลายสารที่ได้ด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) และ ACN (1:1) ปริมาตร 1.00 mL

8. กรองสารละลายด้วย syringe filter ชนิด nylon membrane 0.45 µm ลงใน HPLC vial

9. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC – DAD

วิธีที่ 2 การสกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN และคลีนอัพด้วย SPE cartridge ชนิด cation exchange (Lichrolut® SCX, Merck)

ทำการทดลองข้อ 1-5 เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 หลังจากนั้นทำการคลีนอัพดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำสารละลายใสที่ได้ไปผ่าน SPE cartridge ชนิด cation exchange (Lichrolut® SCX, Merck) โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

- ปรับสภาวะ (condition) ด้วย ACN : DCM (80 : 20) 3 mL
- ใส่ (load) สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการสกัดเนื้อปลาอย่างช้าๆ
- ล้าง (wash) ด้วย ACN 2 mL
- ชะ (elute) ด้วย ACN : NH_3 (9 : 1) 5 mL

2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยการพ่นแก๊สไนโตรเจนที่ 50°C

3. ละลายสารที่ได้ด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) และ ACN (1:1) 1.00 mL

4. กรองด้วย syringe filter ชนิด nylon membrane 0.45 µm ลงใน HPLC vial

5. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC – DAD

วิธีที่ 3 การสกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN และคลีนอัพโดยใช้ SPE 2 ชนิด

ทำการทดลองข้อ 1-5 เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 หลังจากนั้นทำการคลีนอัพด้วย SPE cartridge ชนิด cation exchange (Lichrolut® SCX, Merck) และ SPE cartridge ชนิด anion exchange (Oasis® MAX, Waters) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน SPE cartridge ชนิด cation exchange (Lichrolut® SCX, Merck) โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

- ปรับสภาวะ (condition) ด้วย ACN : DCM (80 : 20) 3 mL
- ใส่ (load) สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการสกัดเนื้อปลาอย่างช้าๆ
- ล้าง (wash) ด้วย ACN 2 mL
- ชะ (elute) ด้วย ACN : NH_3 (9 : 1) 5 mL

2. นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน SPE cartridge ชนิด anion exchange (Oasis® MAX, Waters) โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

- ปรับสภาวะ (condition) ด้วย methanol 5 mL
- ใส่ (load) สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการสกัดเนื้อปลาอย่างช้าๆ
- ล้าง (wash) ด้วยน้ำ milli-Q 5 mL
- ชะ (elute) ด้วย methanol 5 mL

3. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยการพ่นแก๊สไนโตรเจนที่ 50°C

4. ละลายสารที่ได้ด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) และ ACN (1:1) 1.00 mL

5. กรองสารละลายด้วย syringe filter ชนิด nylon membrane 0.45 μm ลงใน HPLC vial

6. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC – DAD

วิธีที่ 4 การสกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN โดยใช้ตัวอย่างปริมาณมาก (large scale) และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดและคลีนอัพ

1. ชั่งเนื้อปลาที่สับละเอียดแล้ว 50.00 ± 0.05 g ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 250 mL เติม (spike) สารละลายมาตรฐาน MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 1.0 mg/L ชนิดละ 100 μL (spiked sample ที่ได้มี MG, CV, LMG และ LCV ชนิดละ 2 μg/kg หรือ 0.002 mg/kg)

2. เติมสารละลาย HA 25% ปริมาตร 5 mL สารละลาย *p*-TSA 1 M ปริมาตร 5 mL และสารละลาย ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) 15 mL แล้ว homogenize ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

3. เติม ACN 75 mL แล้ว homogenize ที่ 10,000 rpm ครั้งละ 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง

4. นำเข้าเตาอบไมโครเวฟที่ 450 watt เป็นเวลา 20 วินาที

5. นำมากรองดูด (suction) ด้วยกรวยบุคเนอร์ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4

6. ถ่ายสารละลายที่กรองได้ลงสู่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL นำไป rotary evaporation ที่ 40 °C จนสารละลายมีปริมาตรประมาณ 5 mL

7. ถ่ายสารละลายลงสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL ด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) และ ACN (1:1)

8. กรองสารละลายด้วย syringe filter ชนิด nylon membrane 0.45 μm ลงใน HPLC vial

9. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC – DAD

2.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ MG, CV, LMG และ LCV ที่ความเข้มข้น 0.003, 0.005, 0.010 และ 0.030 mg/L จำนวน 5 ชุด เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างผลรวมของพื้นที่พีกของ MG และ LMG กับความเข้มข้นรวมของ MG และ LMG และ calibration curve ระหว่างผลรวมของพื้นที่พีกของ CV และ LCV กับความเข้มข้นรวมของ CV และ LCV เพื่อพิจารณา linearity, linear working range, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

2. เตรียม spiked sample จำนวน 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างปลาทับทิมโดยเติม MG, LMG, CV และ LCV ชนิดละ 2 µg/kg หรือ 0.002 mg/kg นำ spiked sample ไปเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ 4 และตรวจวัดปริมาณสารทั้งสี่ด้วยวิธี external calibration curve โดยใช้ calibration curve ในข้อ 1 เพื่อพิจารณา accuracy และ precision ของ total MG และ total CV โดยพิจารณาจาก % recovery และ % relative standard deviation (RSD) ตามลำดับ

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณมาลาไคต์กรีน (MG) ลิวโคมาลาไคต์ (LMG) คริสตัลไวโอเล็ต (CV) และลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต (LCV) ตกค้างในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

ในงานวิจัยนี้ได้นำตัวอย่างเนื้อปลาเพาะเลี้ยงและเนื้อกุ้งเพาะเลี้ยง มาเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ตกค้าง โดยการสกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดและคลีนอัพเพื่อกำจัด matrix ต่างๆ ที่มีอยู่ในเนื้อปลาและเนื้อกุ้ง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งเนื้อปลาหรือเนื้อกุ้งที่สับละเอียดแล้ว 50.00 ± 0.05 g ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 250 mL

2. เติมสารละลาย hydroxylamine (HA) 25% ปริมาตร 5 mL สารละลาย *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TSA) 1 M ปริมาตร 5 mL และสารละลาย ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) 15 mL แล้ว homogenize ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

3. เติม acetonitrile (ACN) 75 mL แล้ว homogenize ที่ 10,000 rpm อีกครั้งละ 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง

4. นำเข้าเตาอบไมโครเวฟที่ 450 watt เป็นเวลา 20 วินาที

5. นำมากรองดูด (suction) ด้วยกรวยบุคเนอร์ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4

6. ถ่ายสารละลายที่กรองได้ลงสู่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL นำไป rotary evaporation ที่ 40 °C จนสารละลายมีปริมาตรประมาณ 5 mL

7. ถ่ายสารละลายลงสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL ด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) และ ACN (1:1)

8. กรองสารละลายด้วย syringe filter ชนิด nylon membrane 0.45 µm ลงใน HPLC vial

9. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC – DAD

HPLC conditions

การวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ด้วยเทคนิค HPLC-UV-VIS ทำโดยใช้ Agilent Technologies 1100 series HPLC system ซึ่งประกอบด้วย binary pump, degasser, autosampler, column heater และ diode array detector (DAD) สภาวะที่ใช้คือ

Injection volume	100 µL
Column	Zorbax stable bond C18, 150 × 4.6 mm, 5 µm
Guard column	Zorbax stable bond C18, 4 × 4 mm, 5 µm
Column temperature	30° C
Mobile phase	ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) : ACN
	50 : 50 (0.00 – 7.00 min)
	65 : 35 (7.01 – 12.50 min)
	80 : 20 (12.11 – 20.00 min)
Flow rate	2 mL/min
Detection	Diode array detector (DAD)
	618 nm (0.00 – 7.00 min)
	585 nm (7.01 – 12.00 min)
	265 nm (12.01 – 20.00 min)

การวิเคราะห์ปริมาณ

วิเคราะห์ปริมาณรวมของ MG และ LMG และปริมาณรวมของ CV และ LCV โดยอาศัย external calibration curve ของ total MG (ปริมาณ MG + LMG) และ total CV (ปริมาณ CV + LCV)

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน

3.1.1 สัดส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase สำหรับทำ gradient elution

MG, CV, LMG และ LCV มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายคลึงกัน แต่ MG และ CV มีสภาพขั้วแตกต่างกับ LMG และ LCV อย่างมาก การแยกสารทั้งสี่ชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีจึงทำได้ยาก จากการทดลองใช้ reversed phase chromatography แยกสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG และ LCV โดยใช้ Zorbax stable bond C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm) และใช้สารละลายผสมของ ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile เป็น mobile phase พบว่า gradient program ที่เหมาะสมคือ

เวลา (นาที)	ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) : acetonitrile (v/v)
0.00 – 7.00	50 : 50
7.01 – 12.50	65 : 35
12.51 – 20.00	80 : 20

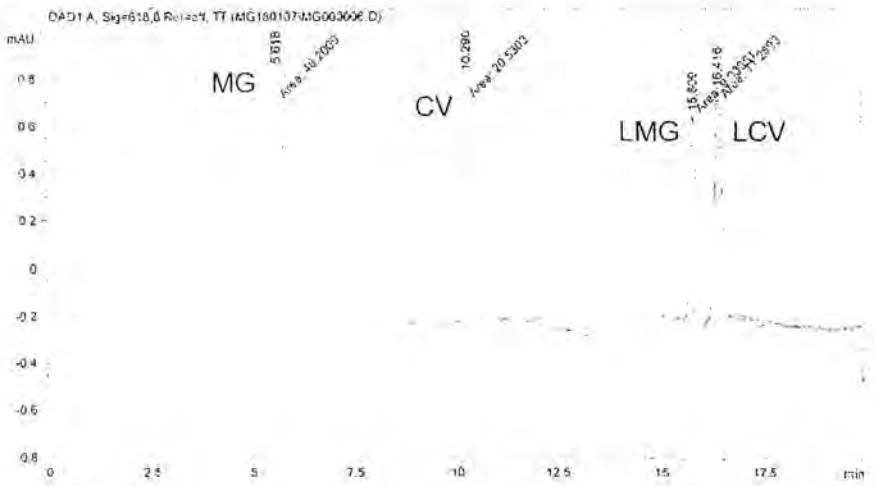
เนื่องจาก gradient program นี้ทำให้พีกของสารทั้งสี่ชนิดแยกกันอย่างสมบูรณ์ โดยมี retention time ของ MG, CV, LMG และ LCV เท่ากับ 5.6, 10.3, 15.8 และ 16.4 นาที ตามลำดับ

3.1.2 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด MG, CV, LMG, LCV ด้วย HPLC-DAD

เนื่องจาก MG, CV, LMG และ LCV มีสมบัติการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน โดย MG และ CV เป็นสารที่มีสี ดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 618 nm และ 585 nm ตามลำดับ ส่วน LMG และ LCV เป็นสารไม่มีสี ดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 265 nm ดังนั้นการตรวจวัดสารทั้งสี่ชนิดให้ได้ในการวิเคราะห์ครั้งเดียวด้วย diode array detector (DAD) จึงต้องใช้ multi-wavelength โดยตั้งโปรแกรมให้ต้นกำเนิดแสงเปล่งแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในเวลาที่สารนั้นถูกแยกออกมาจากคอลัมน์เข้าสู่ detector เมื่อพิจารณาจาก retention time ของ MG, CV, LMG และ LCV จะได้ multi-wavelength program ที่เหมาะสมดังนี้

เวลา (นาที)	ความยาวคลื่น (nm)
0.00 – 7.00	618
7.01 – 12.00	585
12.01 – 20.00	265

โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.010 mg/L ที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและการตรวจวัด แสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.030 mg/L

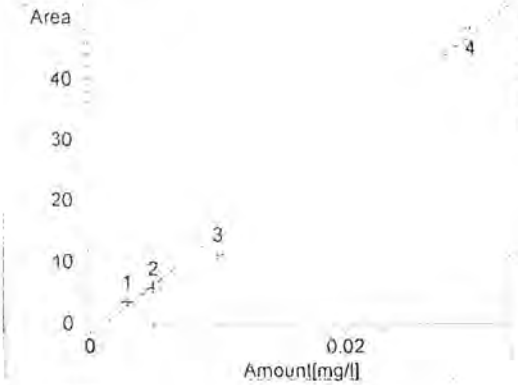
3.2 กราฟมาตรฐาน

การหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี external calibration curve จากการทดลองสร้าง calibration curve ระหว่างความเข้มข้นของสาร (mg/L) และพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของ MG, CV, LMG และ LCV โดยใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.003, 0.005, 0.010 และ 0.030 mg/L พบว่า calibration curve ของ MG, CV, LMG และ LCV เป็นเส้นตรง มี slope, intercept และ correlation coefficient (r^2) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ค่า slope, intercept และ correlation coefficient (r^2) ของ external calibration curve ของ MG, CV, LMG และ LCV

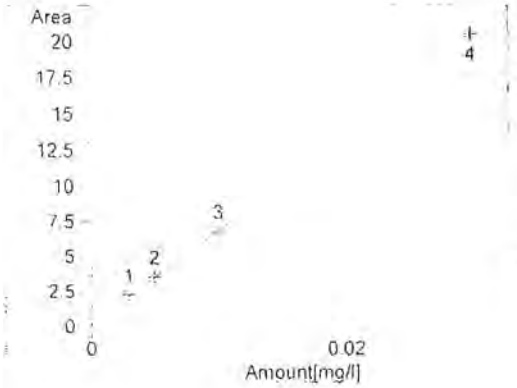
Compound	Retention time (min)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (r^2)
MG	5.6	1637.155	-2.002	0.9948
CV	10.3	680.977	0.009	0.9999
LMG	15.8	302.074	0.003	0.9989
LCV	16.4	381.503	-0.167	0.9993

จาก calibration curve ที่ได้แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ใต้พีกของสารในโครมาโทแกรมมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารในช่วง 0.003 – 0.030 mg/L โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) 0.9948 – 0.9999 นอกจากนี้ค่า slope ของ calibration curve ของสารทุกชนิดมีค่ามาก ซึ่งบ่งชี้ว่าเทคนิคและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้มีสภาพไว (sensitivity) สูง



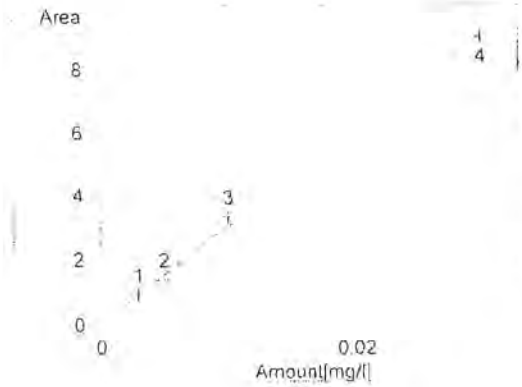

```
MG at exp. RT: 5.613
DAD1 A, Sig=618,8 Ref=off, TT
Correlation:              0.99482
Residual Std. Dev.:       2.31138
Formula: y = mx + b
      m:    1637.15479
      b:      -2.00189
      x: Amount[mg/l]
      y: Area
Calibration Level Weights:
    Level 1     : 1
    Level 2     : 1
    Level 3     : 1
    Level 4     : 1
```

(ก)



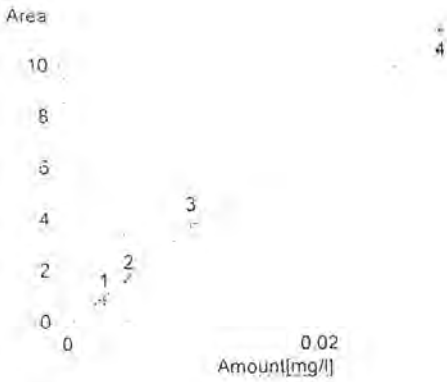

```
CV at exp. RT: 10.290
DAD1 A, Sig=618,8 Ref=off, TT
Correlation:              0.99994
Residual Std. Dev.:       0.10705
Formula: y = mx + b
      m:     680.97721
      b:      9.09312e-2
      x: Amount[mg/l]
      y: Area
Calibration Level Weights:
    Level 1     : 1
    Level 2     : 1
    Level 3     : 1
    Level 4     : 1
```

(ข)




```
LMG at exp. RT: 15.809
DAD1 A, Sig=618,8 Ref=off, TT
Correlation:              0.99891
Residual Std. Dev.:       0.19539
Formula: y = mx + b
      m:     302.07446
      b:      3.44351e-2
      x: Amount[mg/l]
      y: Area
Calibration Level Weights:
    Level 1     : 1
    Level 2     : 1
    Level 3     : 1
    Level 4     : 1
```

(ค)



LCV at exp. RT: 16.416
DAD1 A, Sig=618,8 Ref=off, TT
Correlation: 0.99938
Residual Std. Dev.: 0.18581
Formula: y = mx + b
m: 381.50255
b: -1.67116e-1
x: Amount[mg/l]
y: Area
Calibration Level Weights:
Level 1 : 1
Level 2 : 1
Level 3 : 1
Level 4 : 1

(ง)

รูปที่ 3.2 Calibration curve ของ (ก) MG (ข) CV (ค) LMG (ง) LCV ในช่วงความเข้มข้น 0.003-0.030 mg/L

3.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างในเนื้อปลา

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาวิธีสกัด MG, CV, LMG และ LCV จากเนื้อปลาและคลีนอัพเพื่อกำจัด matrix ต่างๆ ในเนื้อปลาตัวอย่าง 4 วิธี คือ

วิธีที่ 1 สกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN

วิธีที่ 2 สกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN และคลีนอัพด้วย SPE cartridge ชนิด cation exchange (Lichrolut® SCX, Merck)

วิธีที่ 3 สกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN และคลีนอัพโดยใช้ SPE 2 ชนิด

วิธีที่ 4 สกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN โดยใช้ตัวอย่างปริมาณมาก (large scale) และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 retention time และ recovery ของ MG, CV, LMG และ LCV จากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ

วิธี	ตัวอย่างที่	retention time (min)				recovery (%)			
		MG	CV	LMG	LCV	MG	CV	LMG	LCV
1	1	5.616	10.318	15.868	16.490	31.50	17.74	18.32	30.54
	2	5.628	10.330	15.963	16.510	29.18	17.76	18.20	28.89
	3	5.585	10.322	15.935	16.535	32.69	26.67	20.44	39.51
2	1	ND	ND	15.902	ND	-	-	322.6	-
	2	ND	ND	15.943	ND	-	-	335.8	-
	3	ND	ND	15.908	ND	-	-	331.0	-
3	1	ND	ND	14.899	15.804	-	-	117.7	136.6
	2	ND	ND	14.892	ND	-	-	46.3	-
4	1	5.626	10.284	15.838	16.264	58.37	46.54	105.01	129.27
	2	5.606	10.285	15.838	ND	44.17	29.42	58.36	-
	3	5.613	10.301	15.849	16.416	38.17	21.48	50.11	20.60
	4	5.655	10.310	15.849	16.395	62.69	63.32	279.16	49.76
	5	5.500	10.269	15.851	16.393	48.99	34.55	102.52	34.74

ND (not detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้, - = ไม่สามารถคำนวณได้

จากผลการทดลองพบว่า การเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 1 ให้ recovery เพียง 12-31 % ซึ่งมีค่าน้อย และโครมาโทแกรมในช่วง UV ปรากฏพีกรบกวน การที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากไม่ได้ทำการคลีนอัพสารละลายที่ได้จากการสกัด จึงได้ทำการคลีนอัพโดยใช้ SPE โดยการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 2 และ 3

การเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 2 และ 3 ให้โครมาโทรแกรมที่มีแต่พีกของ LMG และ LCV โดย recovery มีค่าเกิน 100 % ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก MG และ CV เปลี่ยนรูปไปเป็น LMG และ LCV ตามลำดับ หรือเกิดจากการสูญเสียสารที่ต้องการวิเคราะห์ไปในขั้นตอนของการล้าง SPE cartridge ดังนั้นจึงได้พัฒนาการสกัดและคลีนอัพโดยใช้ตัวอย่างปริมาณมากขึ้น (large scale) และเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟจากเตาอบไมโครเวฟโดยการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 4

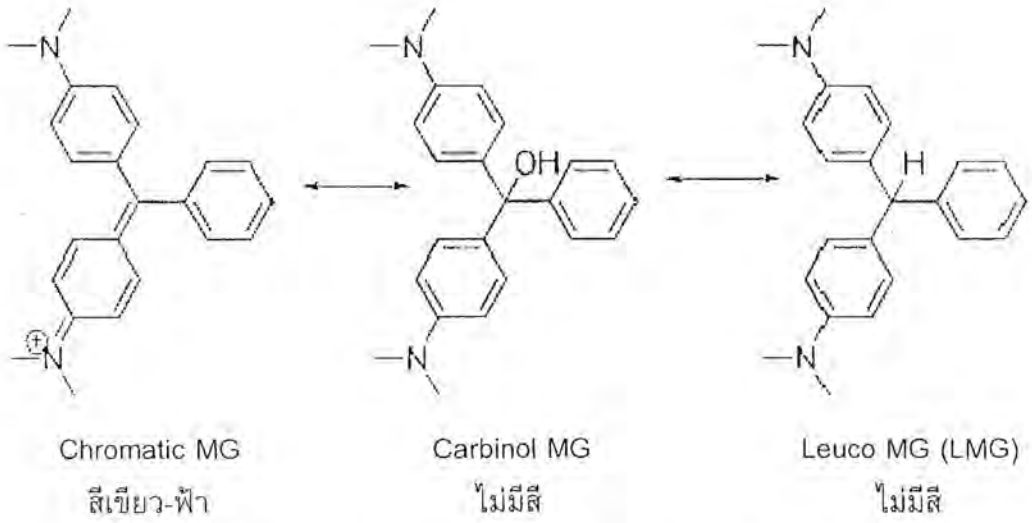
จากผลการทดลองปรากฏพีกของสารครบทั้ง 4 ชนิด และมี % recovery ที่ดีขึ้นกว่าวิธีที่ 1–3 เพราะพลังงานไมโครเวฟที่เหมาะสมจะทำให้โมเลกุลขนาดเล็กที่มีขั้วเคลื่อนที่หรือสั่นเร็ว

ขึ้น จึงทำให้การสกัดเกิดได้ดีและเร็วขึ้น สรุปได้ว่าการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 4 ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความแม่นสูงกว่าวิธีอื่น จึงใช้วิธีนี้เพื่อเตรียมตัวอย่างในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.3 recovery ของการหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ตกค้างในเนื้อปลาตัวอย่างที่เติม MG, CV, LMG และ LCV ชนิดละ 0.002 mg/kg ด้วยเทคนิค HPLC–DAD โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่ 4

สาร	Recovery (%)
MG (n = 5)	50.47 ± 10.06
CV (n = 4)	43.46 ± 15.06
LMG (n = 4)	79.00 ± 28.81
LCV (n = 4)	58.59 ± 48.60

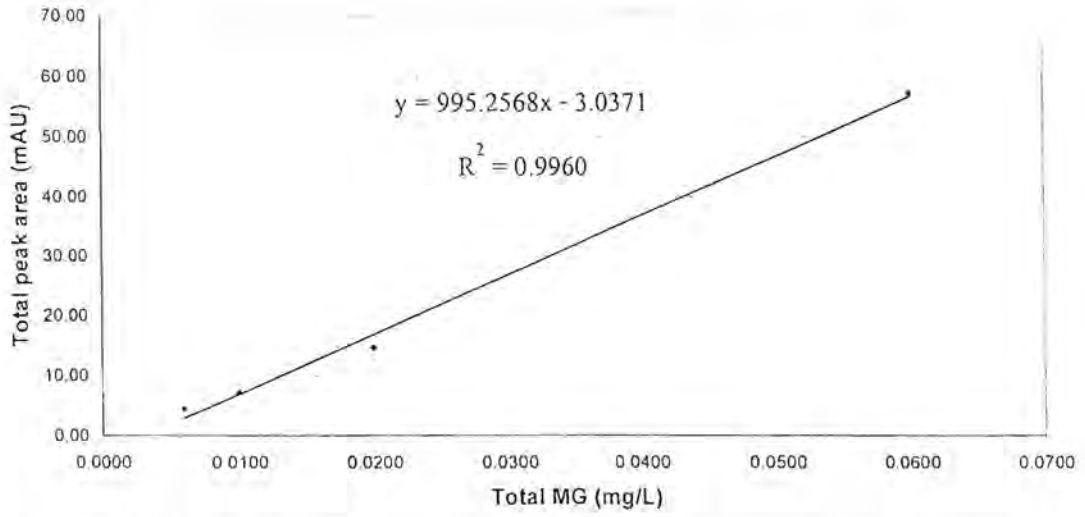
เมื่อพิจารณาค่า recovery ของผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น จะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสารทั้งสี่เพิ่มเติมพบว่า MG ซึ่งมีสีเขียว-ฟ้าหรืออาจเรียก chromatic MG เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ของสัตว์น้ำ เช่น ปลา จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป carbinol MG[13] อยู่ที่ผิวนอกของเซลล์ และจะถูกเปลี่ยนไปเป็น leucomalachite green (LMG) ด้วยเมแทบอลิซึมของปลา การเปลี่ยนแปลงของ MG ดังกล่าวแสดงในรูปที่ 3.3



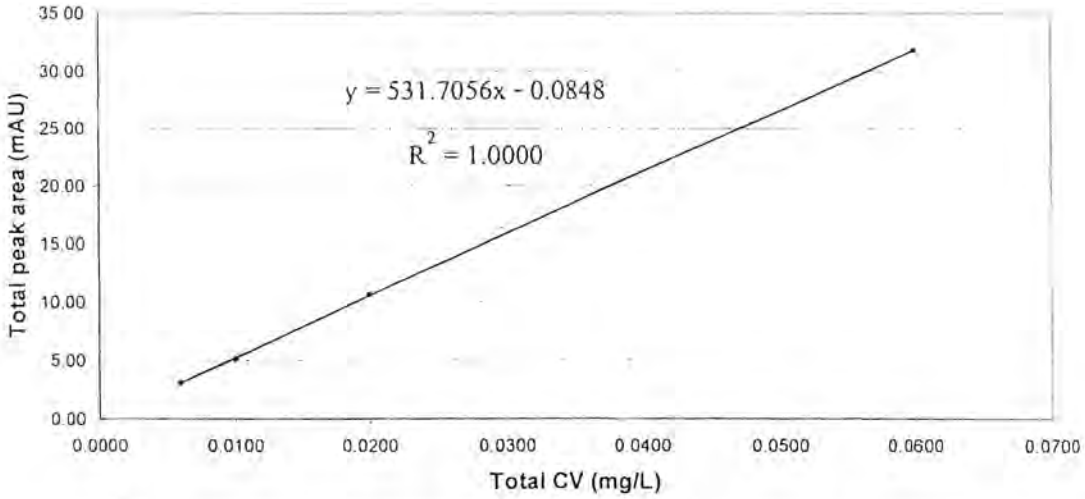
Chromatic MG สีเขียว-ฟ้า | Carbinol MG ไม่มีสี | Leuco MG (LMG) ไม่มีสี

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของ MG และเมตะบอไลต์

เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค LC-MS พบว่า carbinol MG และ LMG มีค่า retention time เท่ากัน (เกิด co-elution) และไม่สามารถตรวจวัดแยกจากกันได้เมื่อใช้เทคนิค HPLC-UV-VISIBLE นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายมาตรฐาน MG เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มี ammonium acetate จะปรากฏ carbinol form อยู่ด้วยเสมอ ปรากฏการณ์เหล่านี้มีผลทำให้ recovery ของ MG ต่ำเกินไปและของ LMG สูงเกินไปอยู่เสมอ นอกจากนี้ยังเกิดปรากฏการณ์ในทำนองเดียวกันกับ CV และ LCV ด้วย ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของสารทั้งสี่จะรายงานผลเป็นปริมาณรวมของ MG และ LMG (total MG) และปริมาณรวมของ CV และ LCV (total CV) โดยได้ออกแบบการประมวลผลและหาปริมาณในรูปของ total MG และ total CV โดยใช้กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างผลรวมของพื้นที่พีก (peak area) ของ MG และ LMG กับความเข้มข้นรวมของ MG และ LMG (หรือ total MG) และกราฟมาตรฐานระหว่างผลรวมขอพื้นที่พีกของ CV และ LCV กับความเข้มข้นรวมของ CV และ LCV (หรือ total CV) กราฟมาตรฐานทั้งสองแสดงในรูปที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ และ recovery ในรูปของ total MG และ total CV แสดงในตารางที่ 3.4



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานระหว่าง total MG (mg/L) กับ total peak area (mAU)



รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐานระหว่าง total CV (mg/L) กับ total peak area (mAU)

ตารางที่ 3.4 recovery และ relative standard deviation (RSD) ของ total MG (MG + LMG) และ total CV (CV + LCV)

Compound	Recovery (%)	RSD (%)
total MG (n = 5)	68.35 ± 24.05	35.19
total CV (n = 4)	50.39 ± 29.94	50.39

3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

งานวิจัยนี้มีแผนงานตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ MG, CV, LMG และ LCV ที่ความเข้มข้น 0.003, 0.005, 0.010 และ 0.030 mg/L จำนวน 5 ชุด เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างผลรวมของพื้นที่พีกของ MG และ LMG กับความเข้มข้นรวมของ MG และ LMG และกราฟมาตรฐานระหว่างผลรวมของพื้นที่พีกของ CV และ LCV กับความเข้มข้นรวมของ CV และ LCV เพื่อพิจารณา linearity, linear working range, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

2. เตรียม spiked sample จำนวน 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างปลาทับทิมโดยเติม MG, LMG, CV และ LCV ชนิดละ 2 µg/kg หรือ 0.002 mg/kg นำ spiked sample ไปเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ 4 และตรวจวัดปริมาณสารทั้งสี่ด้วยวิธี external calibration cruve โดยใช้กราฟมาตรฐานในข้อ 1 เพื่อพิจารณา accuracy และ precision ของ total MG และ total CV โดยพิจารณาจาก recovery และ relative standard deviation (RSD) ตามลำดับ

3.4.1 Linearity, linear working range, limit of detection และ limit of quantitation

จากสารละลายมาตรฐานผสมของ MG, CV, LMG และ LCV ทั้ง 5 ชุด ได้ calibration curve ที่มีสมการเส้นตรง ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น (correlation coefficient, r^2) ความชัน (slope) และจุดตัดแกน y (intercept) ดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 สมการเส้นตรง ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น ความชัน และจุดตัดแกนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

สาร	ครั้งที่	สมการเส้นตรง	correlation coefficient (r^2)	slope	intercept
total MG	1	y = 996.95x – 1.5375	0.9979	996.95	-1.5375
	2	y = 973.97x – 1.2703	0.9989	973.97	-1.2703
	3	y = 968.20x – 2.1621	0.9966	968.20	-2.1621
	4	y = 1036.4x – 3.0948	0.9971	1036.40	-3.0948
	5	y = 995.26x – 3.0371	0.9960	995.26	-3.0371
	ค่าเฉลี่ย	-	0.9973	994.16	-2.2204
	S.D.	-	0.0011	26.81	0.8373
total CV	1	y = 507.05x – 0.1107	0.9992	507.05	-0.1107
	2	y = 512.47x – 0.4950	0.9999	512.47	-0.4950
	3	y = 496.66x + 0.2827	0.9997	496.66	0.2827
	4	y = 529.75x – 0.5901	0.9906	529.75	-0.5901
	5	y = 531.71x – 0.0848	1.000	531.71	-0.0848
	ค่าเฉลี่ย	-	0.9979	515.53	-0.1996
	S.D.	-	0.0041	15.01	0.3512

จากตารางที่ 3.5 จะเห็นได้ว่า calibration curve ของ total MG และ total CV เป็นเส้นตรงที่มีค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น (correlation coefficient, r^2) มากกว่า 0.9900 ทั้งสิ้น แสดงว่า calibration curve ที่ได้มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ดี เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ

linear working range ของสารแต่ละชนิดครอบคลุมตั้งแต่ 0.003 mg/L ถึง 0.030 mg/L ซึ่งเท่ากับช่วงความเข้มข้น 0.0006 mg/kg ถึง 0.006 mg/kg (หรือ 0.6 µg/kg ถึง 6.0 µg/kg) ในตัวอย่าง ซึ่งครอบคลุมปริมาณของ MG และ CV ตกค้างที่กำหนดให้ตรวจวัดได้คือ 2 µg/kg

ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) หมายถึงระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งกำหนดว่าที่ความเข้มข้นนี้จะต้องให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของการตรวจวัดสารต่อสัญญาณรบกวนมีค่าประมาณ 3 เท่า

ขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) หมายถึงระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถใช้หาปริมาณของสารได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งกำหนดไว้ว่าที่ความเข้มข้นนี้จะต้องให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของการตรวจวัดสารต่อสัญญาณรบกวนมีค่าประมาณ 10 เท่า

limit of detec ›n (LOD) คำนวณได้จาก

$$LOD = \frac{3 \times \text{S.D. of intercept}}{\text{average slope}}$$

$$\text{LOD of total MG} = \frac{3 \times 0.8373}{994.16} = 0.002527 \text{ mg/L} = 2.527 \text{ µg/L sample solution}$$

$$= 2.527 \frac{\text{µg total MG}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}}$$

$$= 0.5053 \text{ µg/kg sample}$$

$$\text{LOD of total CV} = \frac{3 \times 0.3512}{515.53} = 0.002044 \text{ mg/L} = 2.044 \text{ µg/L sample solution}$$

$$= 2.044 \frac{\text{µg total CV}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}}$$

$$= 0.4087 \text{ µg/kg sample}$$

limit of quantitation (LOQ) คำนวณได้จาก

$$LOQ = \frac{10 \times \text{S.D. of intercept}}{\text{average slope}}$$

$$\text{LOQ of total MG} = \frac{10 \times 0.8373}{994.16} = 0.008422 \text{ mg/L} = 8.422 \text{ µg/L sample solution}$$

$$= 8.422 \frac{\text{µg total MG}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}}$$

$$= 1.684 \text{ µg/kg sample}$$

$$\text{LOQ of total CV} = \frac{10 \times 0.3512}{515.53} = 0.006812 \text{ mg/L} = 6.812 \text{ µg/L sample solution}$$

$$= 6.812 \frac{\text{µg total CV}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}}$$

$$= 1.362 \text{ µg/kg sample}$$

3.4.2 Accuracy และ precision

ความแม่น (accuracy) เป็นค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงระหว่างค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับค่าจริง ความแม่นของวิธีวิเคราะห์สามารถพิจารณาได้จากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\%\text{recovery} = \frac{[\text{analyte}]}{[\text{spike}] + [\text{blank}]} \times 100$$

ความเที่ยง (precision) คือค่าที่บอกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวซ้ำหลายครั้งมีความใกล้เคียงกันเพียงใด ความเที่ยงแสดงได้ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\%\text{RSD} = \frac{\text{S.D}}{\bar{X}} \times 100$$

S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ย (mean value)

% recovery และ % relative standard deviation (RSD) ของการวิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 0.002 mg/kg แสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 Recovery และ RSD ของ total MG และ total CV ใน spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 2 μg/kg หรือ 0.002 mg/kg

ตัวอย่าง	%Recovery ± %RSD (n=5)	
	Total MG	Total CV
เนื้อปลาช่อน	74.10 ± 8.23	104.47 ± 6.44
เนื้อปลากระพงขาว	56.20 ± 9.60	68.01 ± 4.62
เนื้อปลาทับทิม	55.95 ± 4.36	93.38 ± 2.64
เนื้อกุ้งก้ามกราม	75.92 ± 5.12	78.12 ± 1.26

ตามเกณฑ์ของ AOAC[14] %recovery ที่ยอมรับได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.002 mg/kg อยู่ในช่วง 40 – 120 % และ %RSD ไม่เกิน 30%

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.6 พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มี % recovery 55.95 – 75.92 % สำหรับ total MG และ 68.01 – 104.47 % สำหรับ total CV และมี RSD 4.36 – 9.60 % สำหรับ total MG และ 1.26 – 6.44 % สำหรับ total CV ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.5 การวิเคราะห์ MG, LMG, CV และ LCV ตกค้างในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

ในงานวิจัยนี้ได้นำตัวอย่างเนื้อปลาและเนื้อกุ้งเพาะเลี้ยงที่จำหน่ายในตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร มาเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ตกค้าง โดยการสกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ acetonitrile (ACN) และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดและคลีนอัพเพื่อกำจัด matrix ต่างๆ ที่มีอยู่ในเนื้อปลาและเนื้อกุ้ง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE โดยแยก MG, CV, LMG และ LCV ด้วย reversed phase chromatography โดยใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax stable bond C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm พร้อม guard column ชนิดเดียวกัน mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile (ACN) โดยทำ gradient elution ที่อัตราส่วนโดยปริมาตร 50 : 50 (0.00 – 7.00 min), 65 : 35 (7.01 – 12.50 min) และ 80 : 20 (12.11 – 20.00 min) ตรวจวัดสารทั้งสี่ชนิดพร้อมกันด้วยเครื่องตรวจวัด diode array detector (DAD) ที่หลายความยาวคลื่น (multi-wavelength) ได้แก่ 618 nm (0.00-7.00 min), 585 nm (7.01-12.00 min) และ 265 nm (12.01-20.00 min) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโดยอาศัย external calibration curve ของ total MG (ปริมาณ MG + LMG) และ total CV (ปริมาณ CV + LCV) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total MG และ total CV ในตัวอย่างเนื้อปลาและเนื้อกุ้งที่จำหน่ายในตลาดสดและในซุปเปอร์มาร์เก็ต

ชนิดของตัวอย่าง		ปริมาณที่ตรวจพบ (μg/kg)	
		Total MG	Total CV
เนื้อปลาช่อน	ตลาดสด	Not detected	1.890×10^{-4}
	ซุปเปอร์มาร์เก็ต	Not detected	Not detected
เนื้อปลานิล	ตลาดสด	1.269×10^{-4}	3.091×10^{-3}
	ซุปเปอร์มาร์เก็ต	5.054×10^{-3}	3.598×10^{-3}
เนื้อปลาทับทิม	ตลาดสด	9.269×10^{-4}	Not detected
	ซุปเปอร์มาร์เก็ต	Not detected	2.954×10^{-3}
เนื้อปลากระพง	ตลาดสด	Not detected	Not detected
	ซุปเปอร์มาร์เก็ต	Not detected	Not detected
เนื้อกุ้งก้ามกราม	ตลาดสด	Not detected	Not detected
	ซุปเปอร์มาร์เก็ต	Not detected	3.308×10^{-3}

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณ total MG และ total CV ตกค้างในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงที่มีจำหน่ายในตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร พบว่าสัตว์น้ำที่เลี้ยงในบ่อ ได้แก่ ปลาช่อน ปลานิล ปลาทับทิม และกุ้งก้ามกราม พบการตกค้างของสารมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเล็ต และเมตะบอไลต์ ส่วนปลากระพงซึ่งจะเลี้ยงในกระชัง มีน้ำไหลผ่าน หรืออยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ไม่พบการตกค้างของสารมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเล็ต และเมตะบอไลต์ ซึ่งน่าจะแสดงว่าไม่มีการใช้สารเหล่านี้ในการเพาะเลี้ยง

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ มาลาไคต์กรีน (MG) คริสตัลไวโอเลต (CV) ลิวโคมาลาไคต์กรีน (LMG) และลิวโคคริสตัลไวโอเลต (LCV) ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงพร้อมกัน ด้วยวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็วขึ้น โดยใช้เทคนิค HPLC-UV-VIS ซึ่งเครื่องมือที่ใช้มีในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารส่วนใหญ่ เนื่องจากมีราคาถูกกว่าเครื่องมือสำหรับเทคนิค liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

วิธีที่พัฒนาขึ้นทำโดยการสกัดตัวอย่างเนื้อปลาหรือเนื้อกุ้ง ด้วยสารละลายผสมของ ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) กับ acetonitrile (ACN) และใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัดและคลีนอัพ แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE โดยแยก MG, CV, LMG และ LCV ด้วย reversed phase chromatography โดยใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax stable bond C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm พร้อม guard column ชนิดเดียวกัน mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile (ACN) โดยทำ gradient elution ที่อัตราส่วนโดยปริมาตร 50:50 (0.00-7.00 min), 65:35 (7.01-12.50 min) และ 80:20 (12.11-20.00 min) ตรวจวัดสารทั้งสี่ชนิดพร้อมกันด้วยเครื่องตรวจวัด diode array detector (DAD) ที่หลายความยาวคลื่น (multi-wavelength) ได้แก่ 618 nm (0.00-7.00 min), 585 nm (7.01-12.00 min) และ 265 nm (12.01-20.00 min) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโดยอาศัย external calibration curve ของ total MG (ปริมาณ MG + LMG) และ total CV (ปริมาณ CV + LCV) วิธีนี้มี linear working concentration range ในช่วง 0.6 μg/kg – 6 μg/kg limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.5053 μg/kg สำหรับ total MG และ 0.4087 μg/kg สำหรับ total CV limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 1.684 μg/kg สำหรับ total MG และ 1.362 μg/kg สำหรับ total CV สามารถวิเคราะห์ปริมาณ total MG และ total CV ที่เติมลงในเนื้อปลาหรือเนื้อกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 0.002 mg/kg โดยมี % recovery 55.95 – 75.92 % สำหรับ total MG และ 68.01 – 104.47 % สำหรับ total CV และมี RSD 4.36 – 9.60 % สำหรับ total MG และ 1.26 – 6.44 % สำหรับ total CV วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารมาลาไคต์กรีน (MG) คริสตัลไวโอเลต (CV) ลิวโคมาลาไคต์กรีน (LMG) และลิวโคคริสตัลไวโอเลต (LCV) ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

บรรณานุกรม

1. Cho, B. P., Yang, T., Blankenship, L. R., Moody, J. D., Churchwell, M., Beland, F. A. and Culp, S. J., "Synthesis and characterization of N-demethylated metabolites of malachite green and leucomalachite green" ***Chem. Res. Toxicol***, 16, (2003) : 285-294.
2. Tarbin, J. A., Barnes, K. A., Bygrave, J. and Farrington, W. H., "Screening and confirmation of triphenylmethane dyes and their leuco metabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS" ***Analyst***, 123, (1998) : 2567-2571.
3. Rushing, L. G. and Thompson Jr, H. C., "Simultaneous determination of malachite green, gential violet and their leuco metabolites in catfish or trout tissue by high-performance liquid chromatography with visible detection" ***Journal of chromatography B***, 688, (1997) : 325-330.
4. Bergwerff, A. A. and Scherpenisse, P., "Determination of residues of malachite green in aquatic animals" ***Journal of chromatography B***, 788 (2003) : 351-359.
5. Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. "Toxicological effects of malachite green" ***Aquatic Toxicology***, 66 (2004) : 319-329.
6. Scherpenisse, P. and Bergwerff, A. A., "Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry" ***Analytica Chimica Acta***, 529 (2005) : 173-177.
7. Valle, L., Diaz, C., Zanocco, A. L. and Richter, P., "Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry" ***Journal of Chromatography A,*** 1067 (2005) : 101-105
8. http://www.fisheries.go.th /quality/knowledge/malachite.htm
9. รัตนา ลิมปสถิรกิจ "การใช้เทคนิคไมโครเวฟไดเจสชันในการเตรียมตัวอย่างประเภทอาหารเพื่อการวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ตกค้าง" โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2544)
10. Mitrowska, K., Posyniak, A., Zmudzki, J., "Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescene detection" ***Journal of Chromatography*** **A**, 1089 (2005) : 187-192

11. Lee, K.C., Wu, J.L., Cai, Z., "Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry" ***Journal of Chromatography*** B, 843 (2005) : 247-251
12. Halme, K., Lindfors, E., Peltonen, K., "Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry" *Food Additives and Contaminants*, 21 (2004) : 641-648.
13. http://en.wikipedia.org/wiki/Malachite green
14. AOAC manual for Peer Verified Methods program, Arlington, VA, Nov 1993

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) **นางพรพรรณ อุดมกาญจนนันท์**
   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Pornpan Udomkanjananan
2. เลขประจำตัวประชาชน 3 1009 01082 19 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-218-7614 โทรสาร 02-254-1309 E-mail: pornpan.u@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา
M.S.	Analytical Chemistry	Oregon State University (U.SA.)	2523
วท.บ.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2519

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

   Chemical Education และการใช้ small scale chemistry technique ใน research methodology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

   7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

   (1) การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะตกค้างในกุ้ง โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมเกี่ยวกับกุ้งแบบครบวงจร ชุดโครงการวิจัยเพื่อการพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร-อุตสาหกรรมอาหาร ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2544 – 2546

   (2) The Use of Microwave Oven in the Cleanup Process to Determine the Antibiotics in Shrimps. Pornpan Udomkanjananan and Suchada Chuanuwatanakul (2003) , *Abstracts of 29th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-23 October 2003.*

(3) Development of a Test Kit for Insecticide Residues in Vegetables and Fruits. ทุนการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2545

(4) การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งเพื่อหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ทุนการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2546

(5) การวิเคราะห์และการดัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2548 – 2549

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

(1) การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2550 – 2551

ดำเนินการแล้วประมาณ 80%

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) **นางสุชาดา จูอนุวัฒนกุล**
   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Suchada Chuanuwatanakul
2. เลขประจำตัวประชาชน 3 1014 01029 24 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02-218-7614 โทรสาร 02-254-1309 Email: suchada.c@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา
Doctor in Science	Analytical Chemistry	Okayama University (Japan)	2551
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เคมีวิเคราะห์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2524
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2521

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ Analytical Chemistry, Food Chemistry
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
   7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
   (1) การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะตกค้างในกุ้ง โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมเกี่ยวกับกุ้งแบบครบวงจร ชุดโครงการวิจัยเพื่อการพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร – อุตสาหกรรมอาหาร ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2544 – 2546
   (2) การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งเพื่อหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอล ทุนการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2546
   (3) การวิเคราะห์และการดัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2548 – 2549
   (4) Udomkanjananan, P. and Chuanuwatanakul, S., "The Use of Microwave Oven in the Cleanup Process to Determine the Antibiotics in Shrimps", *Abstracts of 29th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-23 October 2003*, (2003).

(5) Preechaworapun, A., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Grudpan, K., Motomizu, S., Chailapakul, O., "Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode", *Talanta*, 2006, *68*, 1726–1731.
(6) Treetepvijit, S., Preechaworapun, A., Praphairaksit, N., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Chailapakul, O., "Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines", *Talanta*, 2006, *68*, 1329–1335.
(7) Ngamukot, P., Charoenraks, T., Chailapakul, O., Motomizu, S., Chuanuwatanakul, S., "Cost-effective flow cell for the determination of Malachite green and leucomalachite green at boron-doped diamond thin-film electrode", *Anal. Sci.*, 2006, *22*, 111–116.
(8) Treetepvijit, S., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Sato, R., Chailapakul, O., "Electroanalysis of tetracycline using nickel-implanted boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system" *Anal. Sci.*, 2005, *21*, 531–535.
(9) Charoenraks, T., Chuanuwatanakul, S., Honda, K., Yamaguchi, Y., Chailapakul, O., "Analysis of Tetracycline Antibiotics Using HPLC with Pulsed Amperometric Detection", *Anal. Sci.*, 2005, *21*, 241–245.
(10) Boonsong, K., Chuanuwatanakul, S., Wangfuengkanagul, N., Chailapakul, O., "Electroanalysis of lincomycin using boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system", *Sensors and Actuators B*, 2005, *108*, 627–632.
(11) Chuanuwatanakul, S., Chailapakul, O., and Motomizu, S., "Electrochemical analysis of chloramphenicol using boron-doped diamond electrode applied to a flow-injection system", *Anal. Sci.*, 2008, *24*, 493–498.
(12) Chuanuwatanakul, S., W. Duangchai, W., O. Chailapakul, O., and Motomizu, S., "Determination of trace heavy metals by sequential injection-anodic stripping voltammetry using bismuth film screen-printed carbon electrode" *Anal. Sci.*, 2008, *24*, 589–594.
(13) Chuanuwatanakul, S., Punrat, E., Panchompoo, J., Chailapakul, O., and Motomizu, S., "On-line Preconcentration and Determination of Trace Heavy Metals by Sequential Injection-Anodic Stripping Voltammetry Using Bismuth Film Screen-printed Carbon Electrode", *J. Flow Injection Anal.*, 2008, 25, 49–52.

7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ

(1) การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคด์กรีนและเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคด์กรีนตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2550 – 2551 ดำเนินการแล้วประมาณ 80%