

รายงานการวิจัยเรื่อง

การตรวจวิเคราะห์สารมาลาโคต์กรีนและเมตะบอไลต์ลิโวมาลาโคต์กรีนตกค้าง
ในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง 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)

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

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุชาดา จูอนุวัฒน์กุล

ภาควิชาเคมี และห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใน โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทาง
อาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550



จุฬาลง

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 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 วิธีวิเคราะห์อีกวิธีหนึ่งคือการตรวจวิเคราะห์มาลาไคต์กรีน ลิวโคมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเล็ต ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง เช่น ปลา กุ้ง พร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC-DAD(multiwavelength) คอลัมน์ชนิด Zorbax stable bond C18, 150x4.6 mm, 5 μ m พร้อม guard column ชนิดเดียวกัน mobile phase คือ ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) และ acetonitrile และใช้ gradient elution ตรวจวัดสารทั้งสองชนิดพร้อมกันด้วยเครื่องตรวจวัดแบบ 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)

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. 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 μ m 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).

สารบัญ

| | 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 | 7 |
| บทที่ 2 การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเลต และเมตะบอไลต์ที่ตกค้าง ในสัต์ว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE | 8 |
| 2.1 การทดลอง | 8 |
| 2.1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน | 8 |
| 2.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) | 9 |
| 2.1.3 การเตรียมตัวอย่าง | 10 |
| 2.1.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) | 12 |
| 2.1.5 การวิเคราะห์ MG, LMG, CV และ LCV ในเนื้อปลาตัวอย่าง | 13 |
| 2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์ | 13 |
| 2.2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน | 13 |
| 2.2.2 กราฟมาตรฐาน | 15 |
| 2.2.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ MG, LMG, CV และ LCV ที่ตกค้างใน เนื้อปลาตัวอย่าง | 17 |
| 2.2.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) | 21 |
| 2.2.5 การวิเคราะห์ MG, LMG, CV และ LCV ในเนื้อปลา/กุ้งตัวอย่าง | 25 |
| 2.3 สรุปผลการทดลอง | 25 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| บทที่ 3 | การตรวจวิเคราะห์สารมาลาโคต์กรีนและลิโคมาลาโคต์กรีนที่ตกค้างในสัตว์น้ำ เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค LC-MS/MS | 26 |
| 3.1 | การทดลอง | 26 |
| 3.1.1 | การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS | 26 |
| 3.1.2 | การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG ตกค้างในเนื้อปลา ด้วยเทคนิค LC-MS/MS | 27 |
| 3.2 | ผลการทดลอง | 31 |
| 3.2.1 | สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS | 31 |
| 3.2.2 | ผลการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MG, LMG ตกค้างในเนื้อ ปลาด้วยเทคนิค LC-MS/MS (sample extraction and clean-up) | 32 |
| 3.3 | วิจารณ์ผลการทดลอง | 33 |
| บทที่ 4 | สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย | 35 |
| 4.1 | สรุปผลการทดลอง | 35 |
| 4.1.1 | วิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC-DAD | 35 |
| 4.1.2 | วิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS | 36 |
| 4.2 | โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป | 36 |
| 4.3 | ข้อเสนอแนะ | 36 |
| บรรณานุกรม | | 37 |
| ภาคผนวก | | 38 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | | 43 |

สารบัญตาราง (List of Tables)

| | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1.1 การแจ้งเตือนถึงการตรวจพบ MG, CV, LMG, และ LCV ในเนื้อปลา แช่แข็งจากประเทศต่างๆ ของระบบการเตือนภัยสินค้าอาหารและ อาหารสัตว์ ของสหภาพยุโรป | 3 |
| ตารางที่ 2.2 retention time และ recovery ของ MG, CV, LMG, และ LCV จาก การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ | 18 |
| ตารางที่ 2.3 recovery ของการหาปริมาณ MG, CV, LMG, และ LCV ตกค้างใน เนื้อปลาทัวอย่างที่ได้เติม MG, CV, LMG, และ LCV ชนิดละ 0.002 mg/kg ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่ 4 | 19 |
| ตารางที่ 2.4 recovery และ relative standard deviation ของ total MG (MG + LMG) และ total CV (CV + LCV) | 21 |
| ตารางที่ 2.5 สมการเส้นตรง ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้น ความชัน และจุดตัดแกนที่ได้ จากกราฟมาตรฐาน | 22 |
| ตารางที่ 2.6 recovery และ RSD ของ total MG และ total CV ใน spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 2 µg/kg | 24 |
| ตารางที่ 2.7 ปริมาณ total MG และ total CV ตกค้างในปลาและกุ้งตัวอย่าง | 25 |

สารบัญภาพ (List of Illustration)

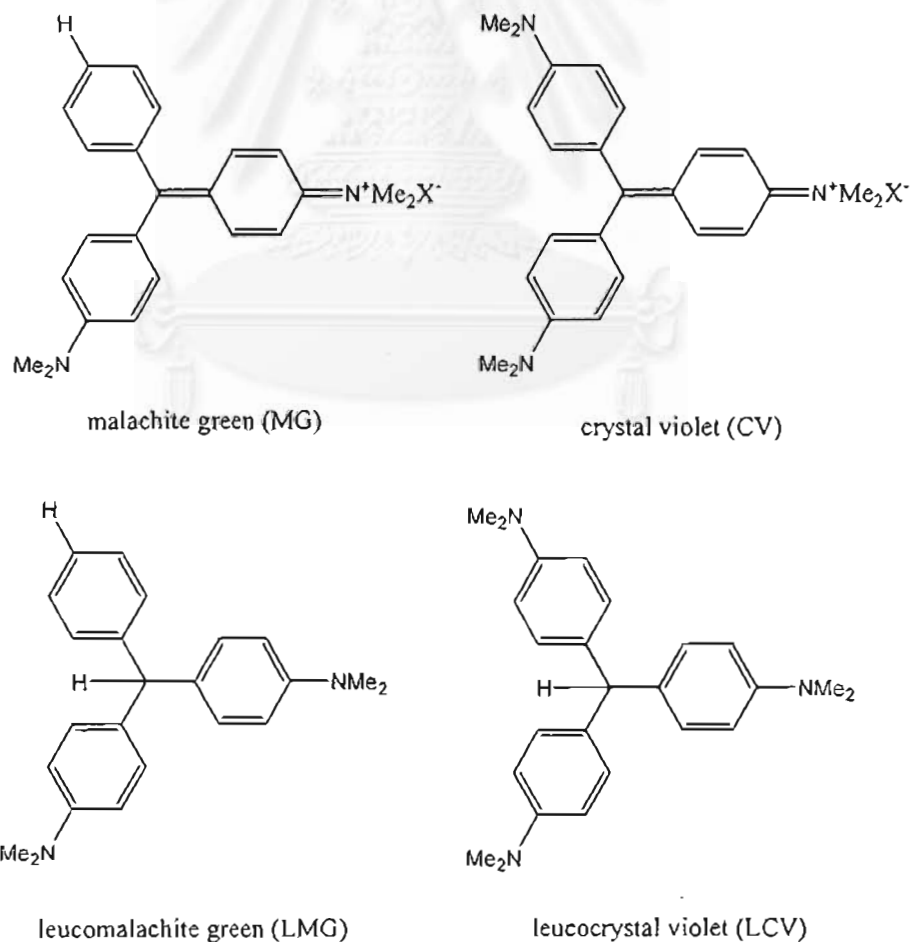
| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ malachite green, crystal violet, leucomalachite green และ leucocrystal violet | 1 |
| รูปที่ 2.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG, และ LCV ความเข้มข้น 0.030 mg/L | 15 |
| รูปที่ 2.2 Calibration curve ของ (ก) MG (ข) CV (ค) LMG (ง) LCV ในช่วงความเข้มข้น 0.003-0.030 mg/L | 17 |
| รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ MG และเมตะบอไลต์ | 19 |
| รูปที่ 2.4 กราฟมาตรฐานระหว่าง total MG (mg/L) กับ total peak area (mAU) | 20 |
| รูปที่ 2.5 กราฟมาตรฐานระหว่าง total CV (mg/L) กับ total peak area (mAU) | 21 |
| รูปที่ 3.1 โครงสร้างเมตะบอไลต์ของ MG | 33 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 มุมเหตุจูงใจและความสำคัญของปัญหา

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} เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม¹ ถูกดูดซับได้ง่ายผ่านทางกระแสน้ำโดยซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ เมื่อมีการสะสมสารเหล่านี้ในปริมาณหนึ่ง อาจทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้³⁻⁷ 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 ต่อมาเมื่อผู้ศึกษาพบว่า 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 crystal 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 ตามลำดับ² ต่างจาก LMG และ LCV ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้วและไม่มีสี จึงดูดกลืนแสงได้ในช่วงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 265 nm² 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} จึงอาจคิดแปลงมาใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเล็ต-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 Thompson³ ได้วิเคราะห์หาปริมาณ MG, gentian violet (GV), leucogentian violet (LGV) และ LMG ในเนื้อปลาคูคและปลาเทราท์ 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 ในเนื้อปลาคูคมีค่าเท่ากับ 75.4 ± 3.0, 61.3 ± 4.1, 72.6 ± 3.7 และ 87.9 ± 2.5 (n = 4) ในเนื้อปลาเทราท์มีค่าเท่ากับ 82.6 ± 2.3, 48.6 ± 1.8, 72.1 ± 2.1 และ 83.8 ± 4.6 (n = 4)

ในปี ค.ศ. 1998 Tarbin และคณะ² ได้เสนอวิธีการสกัดและคลีนอัพเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ malachite green และ crystal violet และ metabolites (leucomalachite green และ leucocrystal violet) ในเนื้อปลาเทราท์ 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 ก่อนเข้าตรวจวัดด้วย 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 Scherpenisse⁴ ได้เสนอวิธีสกัด MG จากเนื้อปลาเพาะเลี้ยงด้วย McIlvaine buffer (pH 3.0) – acetonitrile และนำไปกลั่นอ็อปด้วย 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 PbO₂ 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 Bergwerff⁶ ได้เสนอวิธีหาปริมาณ LMG ในเนื้อปลาเทร้าท์และแพนกาเซียสด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยสกัดเนื้อปลาด้วย McIlvaine buffer-acetonitrile แล้วกลั่นอ็อปด้วย aromatic sulfonic solid phase extraction column จากนั้นเปลี่ยน LMG ให้เป็น MG โดย post-column oxidation ด้วย PbO₂ 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 และคณะ⁷ 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 และคณะ¹¹ ได้ใช้เทคนิค liquid chromatography-visible/fluorescence detection ในการหาปริมาณ MG และ LMG ในเนื้อปลาคาร์พท์ โดยนำเนื้อปลามา

สกัดด้วย acetonitrile-buffer mixture และ dichloromethane คลื่นอัลตราไวท์ด้วย SCX solid phase extraction column และวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยไม่ใช้ PbO_2 post column ตรวจวัด MG ด้วย visible (620 nm) และตรวจวัด LMG ด้วย FLD ($\lambda_{ex} = 265$ nm และ $\lambda_{em} = 360$ nm) MG และ LMG มีค่าเท่ากับ 62.8 % และ 91.5 % ตามลำดับ (ที่ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ และ quantification limit เท่ากับ 0.37 และ 0.32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ สำหรับ MG และ LMG ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตาม minimum required performance limit (MRPL) 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$

ในปี ค.ศ. 2006 Lee และคณะ¹² ได้เสนอวิธีหาปริมาณ MG และ LMG ในส่วนที่กินได้ของเนื้อปลาทองด้วยวิธี liquid chromatography-ion trap mass spectrometry โดยใช้เทคนิค "time segment" และมี atrazine-d₅ เป็น internal standard การสกัด MG และ LMG ทำโดยใช้ perchloric acid และ acetonitrile ตามด้วย dichloromethane คลื่นอัลตราไวท์ด้วย Strata-x polymeric solid-phase extraction column ระบบ HPLC คือ reversed-phase, gradient mode และ ส่วน 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 และคณะ¹³ ได้วิเคราะห์ MG และ LMG ในปลาเทราท์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS, positive-ion electrospray โดยใช้ LMG-D₅ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ สำหรับ MG และ LMG ตามลำดับ ส่วน quantification limit เท่ากับ 0.22 และ 0.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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

การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเลต และเมตะบอไลต์ที่ตกค้าง ในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค HPLC-UV-VISIBLE

2.1 การทดลอง

2.1.1 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 μ L |
| Column | Zorbax stable bond C18, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m |
| Guard column | Zorbax stable bond C18, 4 \times 4 mm, 5 μ m |
| Column temperature | 30 $^{\circ}$ 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 ที่ทำให้พีคของสารทั้ง 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 ชนิดบน โครมาโทแกรมโดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.050 mg/L เข้าสู่ HPLC โดยใช้สภาวะตามข้อ 1 และใช้ gradient program ที่ทำให้พีคของสารทั้ง 4 ชนิดแยกจากกันได้

2.1.2 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 μ L |
| Column | Zorbax stable bond C18, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m |
| Guard column | Zorbax stable bond C18, 4 \times 4 mm, 5 μ m |
| Column temperature | 30 $^{\circ}$ C |
| Mobile phase | ammonium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5) : acetonitrile 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) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารแต่ละชนิดใน โครมาโทแกรม

2.1.3 การเตรียมตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ MG, CV, LMG และ LCV ในเนื้อปลาที่เติม MG, CV, LMG และ LCV (spiked sample) ชนิดละ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 ปริมาตร 0.5 mL และ acetonitrile (ACN) 20 mL แล้ว homogenize ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที 3 ครั้ง
3. นำไป centrifuge เพื่อแยกเนื้อปลาออกจากสารสกัดด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 4,400 rpm เป็นเวลา 10 นาที
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
- ใส้ (load) สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการสกัดเนื้อปลาอย่างช้าๆ
- ล้าง (wash) ด้วย ACN 2 mL
- ชะ (elute) ด้วย ACN : NH₃ (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 และกลืนอ็อปโดยใช้ SPE 2 ชนิด

ทำการทดลองข้อ 1-5 เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 หลังจากนั้นทำการกลืนอ็อปด้วย 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
- ใส้ (load) สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการสกัดเนื้อปลาอย่างช้าๆ
- ล้าง (wash) ด้วย ACN 2 mL
- ชะ (elute) ด้วย ACN : NH₃ (9 : 1) 5 mL

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

- ปรับสภาวะ (condition) ด้วย methanol 5 mL
- ใส้ (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) และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 อีกครั้งละ 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง
4. นำเข้าเตาอบไมโครเวฟที่ 450 watt เป็นเวลา 20 วินาที
5. นำมากรองดูด (suction) ด้วยกรวยบุคเนอร์ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4
6. ถ่ายสารละลายที่กรองได้ลงสู่ขวดแก้วขนาด 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

2.1.4 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 เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างผลรวมพื้นที่พีคของ MG และ LMG กับความเข้มข้นรวมของ MG และ LMG และ calibration curve ระหว่างผลรวมพื้นที่พีคของ 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 ตัวอย่างจากตัวอย่างปลาที่บดหยาบโดยเติม MG, LMG, CV และ LCV ชนิดละ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ หรือ 0.002 mg/kg นำ spiked sample ไปเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ 4 และตรวจวัดปริมาณสารทั้งสี่ด้วยวิธี external calibration curve โดยใช้ calibration curve ในข้อ 1 เพื่อ

พิจารณา accuracy และ precision ของ total MG และ total CV โดยพิจารณาจาก % recovery และ % relative standard deviation (RSD) ตามลำดับ

2.1.5 การวิเคราะห์ MG, LMG, CV และ LCV ในปลาตัวอย่าง

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 μ L (spiked sample ที่ได้มี MG, CV, LMG และ LCV ชนิดละ 2 μ g/kg หรือ 0.002 mg/kg)
2. เติมสารละลาย HA 25% ปริมาตร 5 mL สารละลาย *p*-TSA 1 M ปริมาตร 5 mL และ สารละลาย 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 อีกครั้งละ 1 นาที จำนวน 3 ครั้ง
4. นำเข้าเตาอบไมโครเวฟที่ 450 watt เป็นเวลา 20 วินาที
5. นำมากรองคูด (suction) ด้วยกรวยบุนเนอร์ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4
6. ถ่ายสารละลายที่กรองได้ลงสู่ขวดกั้นกลมขนาด 250 mL นำไป rotary evaporation ที่ 40 °C จนสารละลายมีปริมาตรประมาณ 5 mL
7. ถ่ายสารละลายลงสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL ด้วย สารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) และ ACN (1:1)
8. กรองสารละลายด้วย syringe filter ชนิด nylon membrane 0.45 μ m ลงใน HPLC vial
9. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC – DAD

2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.2.1 สภาพที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐาน

2.2.1.1 สัดส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase สำหรับทำ gradient elution

MG, CV, LMG และ LCV มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายคลึงกัน แต่ MG และ CV มีสภาพขั้วแตกต่างกับ LMG และ LCV อย่างมาก การแยกสารทั้งสี่ชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี จึงทำได้ยาก จากการทดลองใช้ reversed phase chromatography แยกสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG และ LCV โดยใช้ Zorbax stable bond C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μ m) และใช้ สารละลายผสมของ 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 |

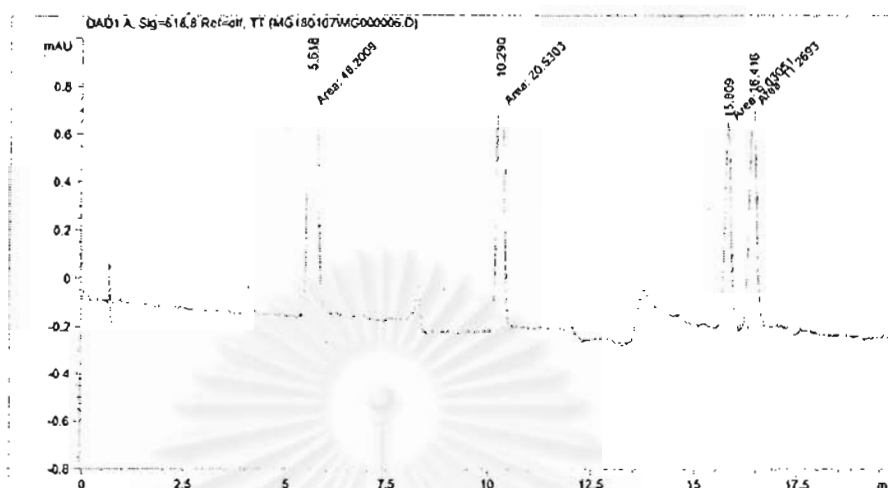
เนื่องจาก gradient program นี้ทำให้พีคของสารทั้งสี่ชนิดแยกกันอย่างสมบูรณ์ โดยมี retention time ของ MG, CV, LMG และ LCV เท่ากับ 5.6, 10.3, 15.8 และ 16.4 นาที ตามลำดับ

2.2.1.2 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 ดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 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 2.1



รูปที่ 2.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของ MG, CV, LMG และ LCV ความเข้มข้น 0.030 mg/L

2.2.2 กราฟมาตรฐาน

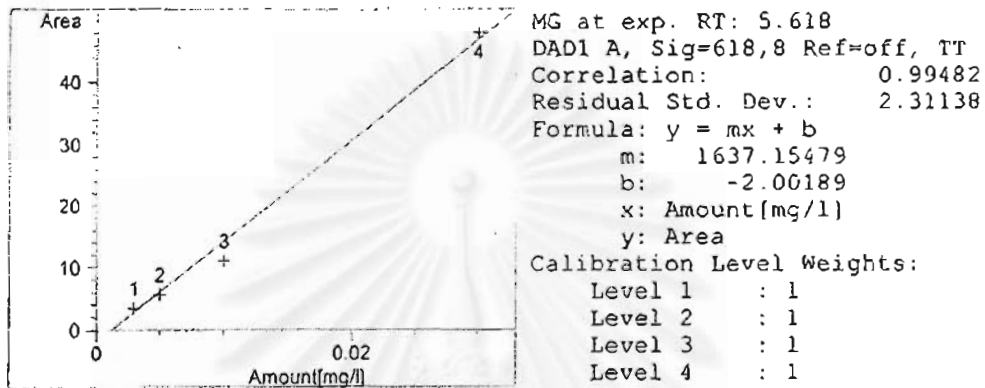
การหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี external calibration curve จากการทดลองสร้าง calibration curve ระหว่างความเข้มข้นของสาร (mg/L) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของ MG, CV, LMG และ LCV โดยใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.003, 0.005, 0.010 และ 0.030 mg/L พบว่า calibration curve ของ MG, CV, LMG และ LCV เป็นเส้นตรง มี slope, intercept และ correlation coefficient (r^2) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่า slope, intercept และ correlation coefficient (r^2) ของ external calibration curve ของ MG, CV, LMG และ LCV

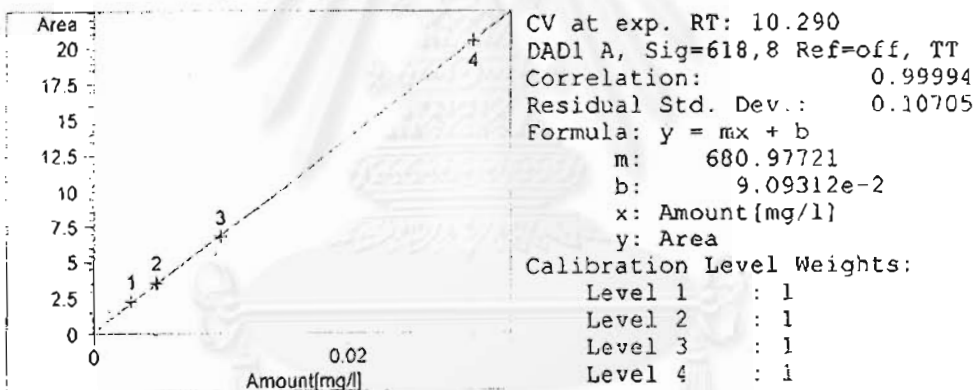
| Compound | Retention time (min) | Slope | Intercept | Correlation coefficient (r^2) |
|----------|----------------------|----------|-----------|-----------------------------------|
| MG | 5.6 | 1637.155 | -2.002 | 0.9948 |
| CV | 10.3 | 680.977 | 0.009 | 0.9999 |
| LMG | 15.8 | 302.074 | 0.003 | 0.9989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

จาก calibration curve ที่ได้แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ใต้พีคของสารในโครมาโทแกรมมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารในช่วง 0.003 – 0.030 mg/L โดยมีค่า correlation

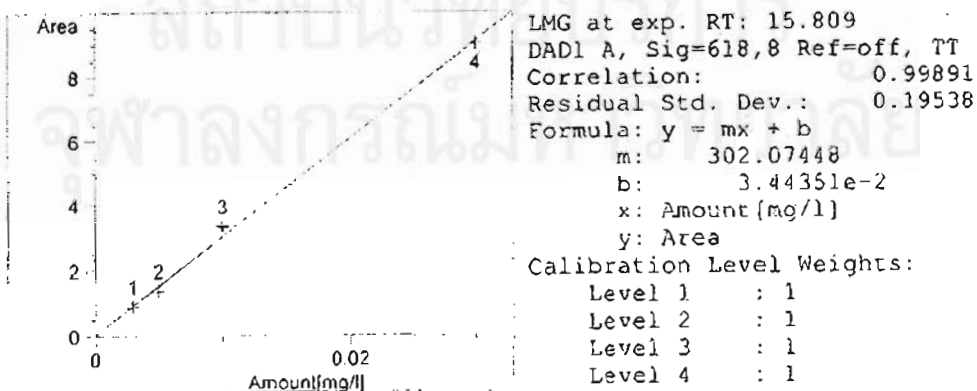
coefficient (r^2) มากกว่า 0.9990 นอกจากนี้ค่า slope ของ calibration curve ของสารทุกชนิดมีค่ามาก ซึ่งบ่งชี้ว่าเทคนิคและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้มีสภาพไว (sensitivity) สูง



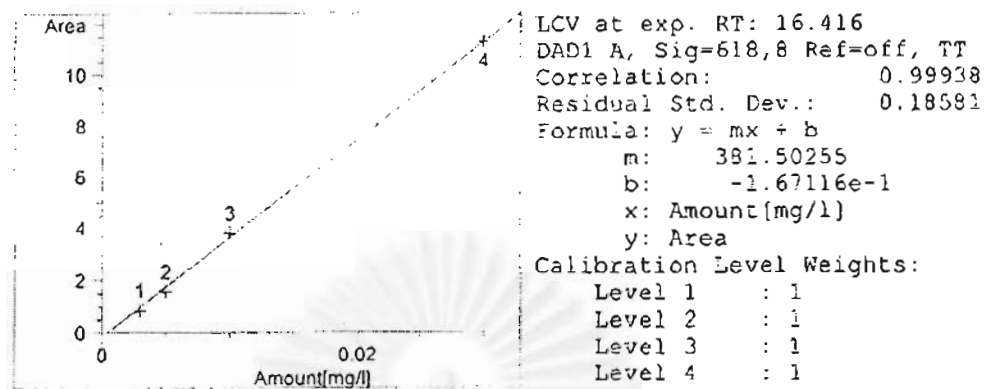
(n)



(u)



(ค)



(ง)

รูปที่ 2.2 Calibration curve ของ (ก) MG (ข) CV (ค) LMG (ง) LCV ในช่วงความเข้มข้น 0.003-0.030 mg/L

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ที่ตกค้างในเนื้อปลาตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาวิธีสกัด MG, CV, LMG และ LCV จากเนื้อปลาและคลินอล์ฟเพื่อกำจัด matrix ต่างๆ ในเนื้อปลาดังกล่าว 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 และคลินอล์ฟด้วย SPE cartridge ชนิด cation exchange (Lichrolut[®] SCX, Merck)

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

วิธีที่ 4 สกัดด้วยสารละลายผสมของ 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) กับ ACN โดยใช้ตัวอย่างปริมาณมาก (large scale) และใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 retention time และ recovery ของ MG, CV, LMG และ LCV จากการเตรียมตัวอย่าง ด้วยวิธีต่างๆ

| 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 % ซึ่งยังมีค่าน้อย และโครมาโทแกรมในช่วง UV ปรากฏพีคครบถ้วน การที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากไม่ได้ทำการคลีนออฟสารละลายที่ได้จากการสกัด จึงได้ทำการคลีนออฟโดยใช้ SPE โดยการเตรียมตัวอย่างวิธีที่ 2 และ 3

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

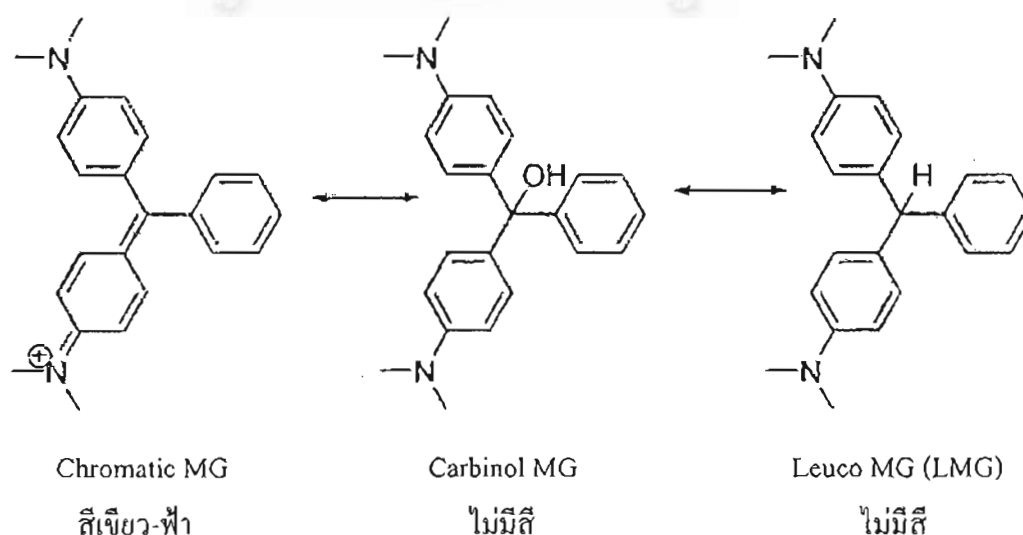
จากผลการทดลองปรากฏพีคของสารครบทั้ง 4 ชนิด และมี % recovery ที่ดีขึ้นกว่าวิธีที่ 1-3 เพราะพลังงานไมโครเวฟที่เหมาะสมจะทำให้โมเลกุลขนาดเล็กที่มีขั้วเคลื่อนที่หรือสั่นเร็วขึ้น จึง

ทำให้การสกัดเกิดได้ดีและเร็วขึ้น สรุปได้ว่าการเตรียมสารตัวอย่างวิธีที่ 4 ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูงกว่าวิธีอื่น จึงใช้วิธีนี้เพื่อเตรียมตัวอย่างในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 2.3 recovery ของการหาปริมาณ MG, CV, LMG และ LCV ตกค้างในเนื้อปลาตัวอย่างที่เติม MG, CV, LMG และ LCV ชนิดละ 0.002 mg/kg ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่ 4

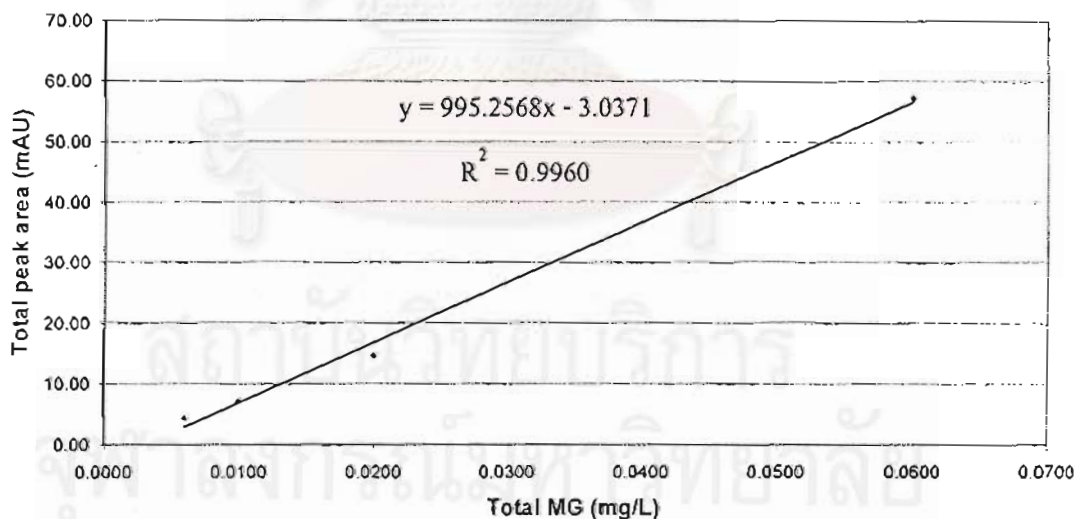
| สาร | Recovery (%) |
|-------------|---------------|
| MG (n = 5) | 50.47 ± 10.06 |
| CV (n = 4) | 43.46 ± 15.06 |
| LMG (n = 4) | 79.00 ± 28.81 |
| LCV (n = 4) | 58.59 ± 48.60 |

เมื่อพิจารณาค่า recovery ของผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น จะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสารทั้งสี่เพิ่มเติมพบว่า MG ซึ่งมีสีเขียว-ฟ้าหรืออาจเรียก chromatic MG เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ของสัตว์น้ำ เช่น ปลา จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป carbinol MG¹⁴ อยู่ที่ผิวนอกของเซลล์ และจะถูกเปลี่ยนไปเป็น leucomalachite green (LMG) ด้วยเมแทบอลิซึมของปลา การเปลี่ยนแปลงของ MG ดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2.3

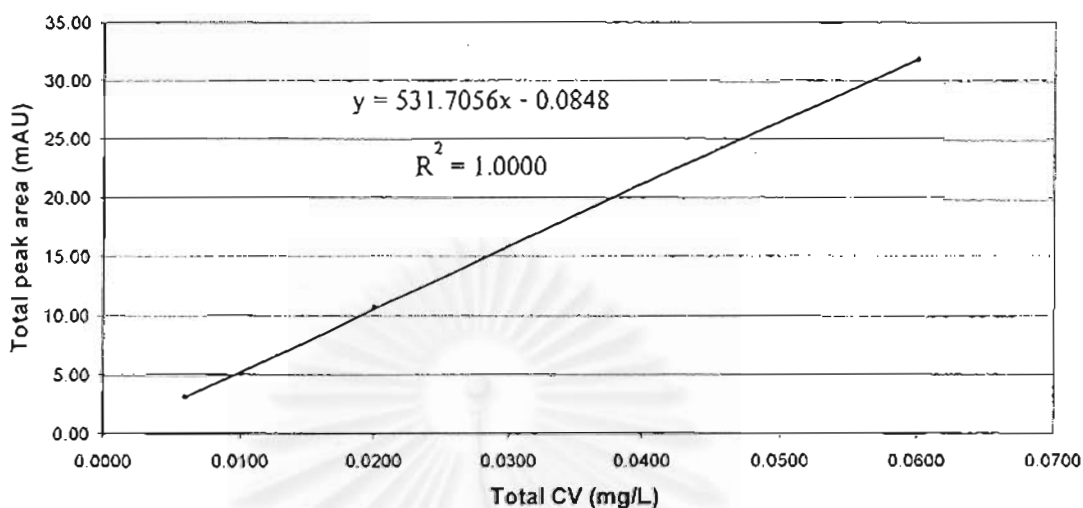


รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ MG และเมแทบอลิต์

เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค LC-MS พบว่า carbinol MG และ LMG มีค่า retention time เท่ากัน (เกิด co-elution) และไม่สามารถตรวจวัดแยกจากกันได้เมื่อใช้เทคนิค HPLC-UV นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายมาตรฐาน MG เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มี ammonium acetate จะปรากฏ carbinol form อยู่ด้วยเสมอ ปรากฏการณ์เหล่านี้มีผลทำให้ recovery ของ MG ต่ำเกินไป และของ LMG สูงเกินไปอยู่เสมอ นอกจากนี้ก็เกิดปรากฏการณ์ในทำนองเดียวกันกับ 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) ระหว่างผลรวมของพื้นที่พีค (peak area) ของ MG และ LMG รวมกัน กับความเข้มข้นรวมของ MG และ LMG (หรือ total MG) และกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่พีคของ CV และ LCV รวมกัน กับความเข้มข้นรวมของ CV และ LCV (หรือ total CV) กราฟมาตรฐานทั้งสองแสดงในรูปที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ และ recovery ในรูปของ total MG และ total CV แสดงในตารางที่ 2.4



รูปที่ 2.4 กราฟมาตรฐานระหว่าง total MG (mg/L) กับ total peak area (mAU)



รูปที่ 2.5 กราฟมาตรฐานระหว่าง total CV (mg/L) กับ total peak area (mAU)

ตารางที่ 2.4 recovery และ relative standard deviation 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 |

2.2.4 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 จุด เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างผลรวมพื้นที่พีคของ MG และ LMG กับความเข้มข้นรวมของ MG และ LMG และกราฟมาตรฐานระหว่างผลรวมพื้นที่พีคของ 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 ตัวอย่างจากตัวอย่างปลาหับทิมโดยเติม MG, LMG, CV และ LCV ชนิดละ 2 µg/kg หรือ 0.002 mg/kg นำ spiked sample ไปเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ 4 และตรวจวัดปริมาณสารทั้งสิ้นด้วยวิธี external calibration cruve โดยใช้กราฟมาตรฐานในข้อ 1 เพื่อพิจารณา accuracy และ precision ของ total MG และ total CV โดยพิจารณาจาก recovery และ relative standard deviation (RSD) ตามลำดับ

2.2.4.1 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) และ จุดตัดแกน y (intercept) ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 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 2.5 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ถึง 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ในตัวอย่าง ซึ่งครอบคลุมปริมาณของ MG และ CV ตกค้างที่กำหนดให้ตรวจวัดได้คือ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$

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

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

limit of detection (LOD) คำนวณได้จาก

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

$$\begin{aligned} \text{LOD of total MG} &= \frac{3 \times 0.8373}{994.16} = 0.002527 \text{ mg/L} = 2.527 \text{ } \mu\text{g/L sample solution} \\ &= 2.527 \frac{\mu\text{ g total MG}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}} \\ &= 0.5053 \text{ } \mu\text{g/kg sample} \\ \text{LOD of total CV} &= \frac{3 \times 0.3512}{515.53} = 0.002044 \text{ mg/L} = 2.044 \text{ } \mu\text{g/L sample solution} \\ &= 2.044 \frac{\mu\text{ g total MG}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}} \\ &= 0.4087 \text{ } \mu\text{g/kg sample} \end{aligned}$$

limit of quantitation (LOQ) คำนวณได้จาก

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

$$\begin{aligned} \text{LOQ of total MG} &= \frac{10 \times 0.8373}{994.16} = 0.008422 \text{ mg/L} = 8.422 \text{ } \mu\text{g/L sample solution} \\ &= 8.422 \frac{\mu\text{ g total MG}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}} \\ &= 1.684 \text{ } \mu\text{g/kg sample} \\ \text{LOQ of total CV} &= \frac{10 \times 0.3512}{515.53} = 0.006812 \text{ mg/L} = 6.812 \text{ } \mu\text{g/L sample solution} \\ &= 6.812 \frac{\mu\text{ g total MG}}{\text{L sample solution}} \times \frac{10 \text{ mL sample solution}}{50 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ g sample}}{1 \text{ kg sample}} \\ &= 1.362 \text{ } \mu\text{g/kg sample} \end{aligned}$$

2.2.4.2 Accuracy และ precision

ความแม่นยำ (accuracy) เป็นค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงระหว่างค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับค่าจริง ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สามารถพิจารณาได้จากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ซึ่งคำนวณได้จาก

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

ความเที่ยง (precision) คือค่าที่บ่งบอกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันหลายครั้งมีความใกล้เคียงกันเพียงใด 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 ทั้ง 5 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.6 recovery และ RSD ของ total MG และ total CV ใน spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 2 µg/kg หรือ 0.002 mg/kg

| ครั้งที่ | % recovery | |
|----------|------------|----------|
| | total MG | total CV |
| 1 | 72.32 | 89.69 |
| 2 | 52.23 | 14.05* |
| 3 | 45.81 | 21.01 |
| 4 | 107.25 | 56.22 |
| 5 | 64.15 | 34.64 |
| RSD (%) | 35.19 | 59.42 |

* ตรวจไม่พบสาร LCV

จากผลการทดลองในตารางที่ 2.6 พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มี recovery ตั้งแต่ 45.81 - 107.25% สำหรับ total MG และ 21.01 - 89.69 % สำหรับ total CV และมี RSD เท่ากับ 35.19% สำหรับ total MG และ 59.42% สำหรับ total CV

2.2.5 การวิเคราะห์ MG, LMG, CV และ LCV ในปลาและกุ้งตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ total MG และ total CV ตกค้าง ได้แก่ ปลาทับทิม ปลากระพงขาว กุ้งก้ามกรามและปลาแซลมอน ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.7

ตาราง 2.7 ปริมาณ total MG และ total CV ตกค้างในปลาและกุ้งตัวอย่าง

| ชนิดของตัวอย่าง | ปริมาณที่ตรวจพบ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | |
|-----------------|---|----------|
| | total MG | total CV |
| ปลาทับทิม | 0.002218 | ND |
| ปลากระพงขาว | ND | ND |
| กุ้งก้ามกราม | 0.002384 | ND |
| ปลาแซลมอน | ND | ND |

ND (not detectable) = ไม่สามารถตรวจวัดได้

2.3 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ มาลาโคไคต์กรีน (MG) คริสตัลไวโอเลต (CV) ลิวโคมาลาโคไคต์กรีน (LMG) และลิวโคคริสตัลไวโอเลต (LCV) โดยการสกัดตัวอย่างเนื้อปลาด้วยสารละลายผสมของ ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) กับ acetonitrile (ACN) และใช้ไมโครวฟช่วยในการสกัดและกลืนอ็อป แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase สารละลายผสมของ ammonium acetate buffer 0.05 M (pH 4.5) กับ acetonitrile (ACN) เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีรูปแบบการชะเป็นแบบเกรเดียนต์ และตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดไดโอดอะเรย์ที่หลายความยาวคลื่น (multi-wavelength) คือ 618, 585 และ 265 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณ total MG และ total CV ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงที่เติมลงบนเนื้อปลาที่ระดับความเข้มข้น 0.002 mg/kg โดยมีค่า recovery 45.81 - 107.25 % สำหรับ total MG และ 21.01 - 89.69 % สำหรับ total CV detection limit เท่ากับ 0.5053 $\mu\text{g}/\text{kg}$ สำหรับ total MG และ 0.4087 $\mu\text{g}/\text{kg}$ สำหรับ total CV และ quantitation limit คือ 1.684 $\mu\text{g}/\text{kg}$ สำหรับ total MG และ 1.362 $\mu\text{g}/\text{kg}$ สำหรับ total CV

บทที่ 3

การตรวจวิเคราะห์สารมาลาไคต์กรีน และเมตะบอไลต์ลิวโคมาลาไคต์กรีนตกค้าง ในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3.1 การทดลอง

3.1.1 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 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

สถานะที่เหมาะสมของ LC-MS/MS

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

3.1.2 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 ปลา ทับทิม ซึ่งเป็นปลาเลี้ยง และมีความเป็นไปได้ในการที่จะใช้ malachite green ใส่ในบ่อปลา

วิธีที่ 1 (E1) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย 5% TCA

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- บีบ 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 H₂O ตามด้วย Acetonitrile

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งซั่งตัวอย่างละ 2.00 \pm 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- เปิด milliQ H₂O 1.00 mL ใส่ลงไป
- เปิด 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 N₂ จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.2 M NH₄OAc 1.00 mL (ด้วยการเปิด)
- 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
- แบ่งซั่งตัวอย่างละ 2.00 \pm 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- เปิด TCA 5% ใส่ลงไป 2.00 mL, vortex-mixed
- เปิด 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 N₂ จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.05 M NH₄OAc pH 4.5 : Acn = 1:1 ปริมาตร 1.00 mL (ด้วยการเปิด), 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 4 (E4) เตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วย 5% TCA ตามด้วย Acetonitrile และ N_2 purge ที่ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$

- สับหรือบดเนื้อปลาให้ละเอียดพอประมาณใน food blender
- แบ่งชั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- บีบ TCA 5% ใส่ลงไป 2.00 mL, vortex-mixed
- บีบ 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 $40\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acn = 1:1 ปริมาตร 1.00 mL (ด้วยการบีบ), 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
- บีบ 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acn = 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 $40\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนแห้ง
- ละลายใหม่ด้วย 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acn = 1:1 ปริมาตร 1.00 mL (ด้วยการบีบ), 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
- แบ่งซั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปิด 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acn = 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 : Acn = 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
- แบ่งซั่งตัวอย่างละ 2.00 ± 0.01 g ใส่ในขวด 40 mL clear glass vial
- ปิเปิด 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acn = 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 นิ้ว สูง 2 นิ้ว ที่บรรจุน้ำ 600 mL

- Centrifuge ที่ความเร็ว 4400 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- ใช้ autopipet คูด่วนใสมา 4.00 mL ใส่ใน vial อีกใบหนึ่ง
- Purge ด้วย N_2 จนแห้ง
- เติม 50 μ L ของ 100 ppb crystal violet (CV) เพื่อเป็น 5 ppb internal standard และเติม 950 μ L 0.05 M NH_4OAc pH 4.5 : Acn = 1:1, vortex-mixed
- กรองผ่าน 0.45 μ m syringe filter ลงใน HPLC vial ประมาณ 1 mL
- เตรียม spiked sample ที่ระดับ 1, 2, 3, 5 ppb ระดับละ 5 ซ้ำ เพื่อทดสอบวิธีการเตรียม ตัวอย่าง

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 1:3 0.05 M ammonium acetate pH 4.5 : acetonitrile ปริมาตร 8.00 mL นำไปโซโม่จีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 24000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง ปิดปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์มโดยเขยิบบางส่วน นำไปวางในอ่างแก้วกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว ที่บรรจุน้ำ 600 mL นำอ่างทั้งชุดใส่ในเตาอบไมโครเวฟ ให้คลื่นไมโครเวฟที่ 270 wats เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวซ์ที่ 4400g เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตคูดูละลายใสมา 4.00 mL ใส่ในขวดอีกใบหนึ่ง นำไปปั่นด้วยแก๊สไนโตรเจนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ $40^\circ C$ จนแห้ง ปิเปต internal standard CV (100 μ g/L) ปริมาตร 50 μ L และตัวทำละลาย 1:1 0.05 M ammonium acetate pH 4.5 : acetonitrile ปริมาตร 950 μ L ผสมให้เข้ากันดี นำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 μ m ลงสู่ขวด HPLC vial

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ

วิธีวิเคราะห์คือ standard addition method และ internal standard calibration curve โดยเตรียมชุดตัวอย่างดังนี้

ตัวอย่าง 2.00 g

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

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

ตัวอย่าง 2.00 g + 3 μ g/kg MG + 3 μ g/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) = $-b/m$

3.2 ผลการทดลอง

3.2.1 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

Flowrate: 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)

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

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

จากการวิเคราะห์ spiked sample และหาปริมาณ MG และ LMG ด้วยวิธี external standard calibration method ก็กับการเตรียมตัวอย่างแบบ E 1-5 และวิธี internal standard calibration method ก็กับการเตรียมตัวอย่างแบบ 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) เป็นดังนี้

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

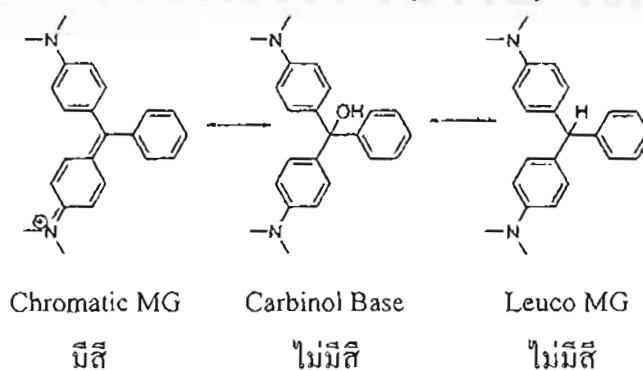
| compound | mass | Linear equation | r | Accuracy (%recovery) |
|----------|-------------|--------------------------|--------|----------------------|
| MG | 329.3/313.2 | $Y=0.00966x + -0.000237$ | 0.9579 | 78.6-103 |
| | 329.3/208.4 | $Y=0.036x + -0.00363$ | 0.9892 | 68.8-106 |
| LMG | 331.3/165.4 | $Y=0.0207x + -0.00431$ | 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 |

3.3 วิจัยรณผลการทดลอง

จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสารทั้งสี่เพิ่มเติมพบว่า MG ซึ่งมีสีฟ้า-เขียว หรืออาจเรียก chromatic MG เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ของสัตว์น้ำ เช่น ปลา จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป carbinol MG อยู่ที่ผิวนอกของเซลล์ และถูกเปลี่ยนไปเป็น leucomalachite green (LMG) ด้วยเมตะบอลิซึมของปลา รูปต่างๆ ของ MG แสดงในรูปที่ 3-1 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



รูปที่ 3-1 โครงสร้างเมตะบอลิต์ของ 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



บทที่ 4

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 วิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC-DAD

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารส่วนมาก คือการตรวจวิเคราะห์มาลาไคต์กรีน ลิวโคมาลาไคต์กรีน คริสตัลไวโอเล็ต ลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต ตกค้างในสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง เช่น ปลา กุ้ง พร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC-DAD (multiwavelength) คอลัมน์ชนิด Zorbax stable bond C18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m 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)

ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC-DAD

Linearity: $r^2 \geq 0.9900$ (ทั้ง total MG และ total CV)

Linear working concentration range: 0.6 μ g/kg – 6 μ g/kg (ทั้ง total MG และ total CV)

Limit of detection (LOD): 0.5053 μ g/kg สำหรับ total MG

0.4087 μ g/kg สำหรับ total CV

Limit of quantitation (LOQ): 1.684 μ g/kg สำหรับ total MG

1.362 μ g/kg สำหรับ total CV

% recovery (ที่ระดับ 2 μ g/kg): 45.81 % ถึง 107.25 % สำหรับ total MG

21.01 % ถึง 89.69 % สำหรับ total CV

ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (40 % - 110 %) ที่กำหนดไว้ใน AOAC

% RSD (ที่ระดับ 2 μ g/kg): 35.19 % สำหรับ total MG

59.42 % สำหรับ total CV

ค่า % RSD ที่ยอมรับได้ซึ่งกำหนดโดย AOAC ที่ระดับความเข้มข้น 1 μ g/kg เท่ากับ 30 % RSD จะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้ยังไม่มีความเที่ยงเป็นที่น่าพอใจ เพราะวิธีการเตรียมตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นหลายขั้นตอน

4.1.2 วิธีวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ MG และ LMG พร้อมกันในตัวอย่างสัตว์น้ำเพาะเลี้ยง ให้ความถูกต้องแม่นยำสูง ด้วยการเตรียมตัวอย่างที่มีขั้นตอนง่ายและรวดเร็วขึ้น ใช้เตาอบไมโครเวฟในการสกัดและคลินอิฟ 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 สำหรับปลาเชลมอน, % recovery อยู่ในช่วง 69-106 % (MG), 84-110 % (LMG) สำหรับปลาทับทิม, % recovery อยู่ในช่วง 93-103 % (MG), 93-120 % (LMG) สำหรับกุ้ง

4.2 โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

1. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณมาลาโคต์กรีนและลิโวโคมาลาโคต์กรีนในตัวอย่างต่างๆ เช่น ปลาเพาะเลี้ยง กุ้งเพาะเลี้ยง ด้วยเทคนิค HPLC-DAD
2. สรุปผลการวิจัย และเขียนรายงาน
3. เขียนบทความเพื่อเสนอผลงานในการประชุมวิชาการหรือตีพิมพ์ในวารสาร

4.3 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., Zanooco, 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>



ภาคผนวก ก

80 A
1

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

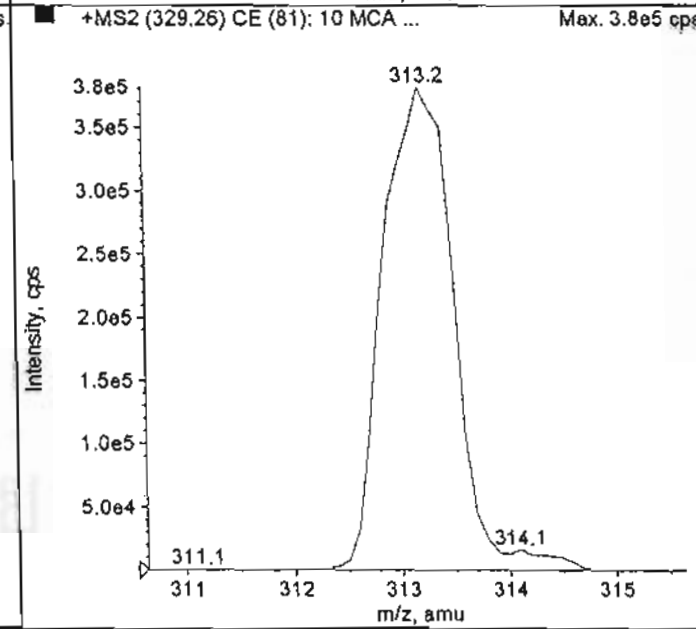
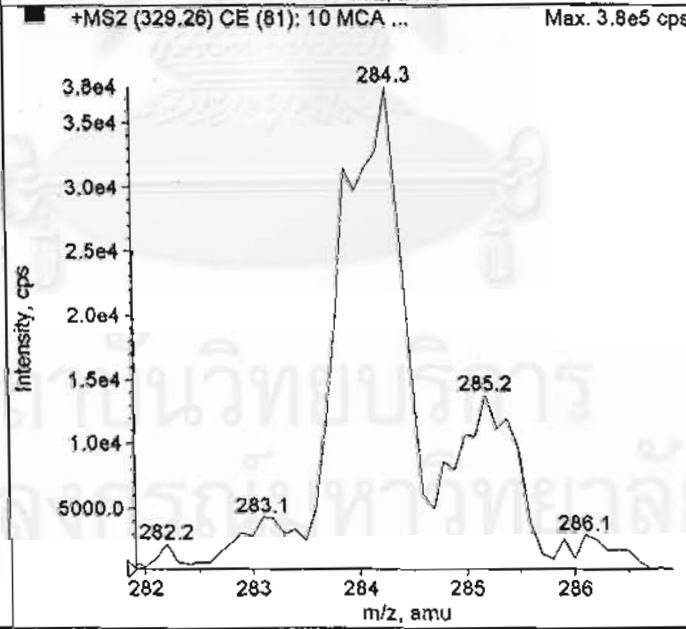
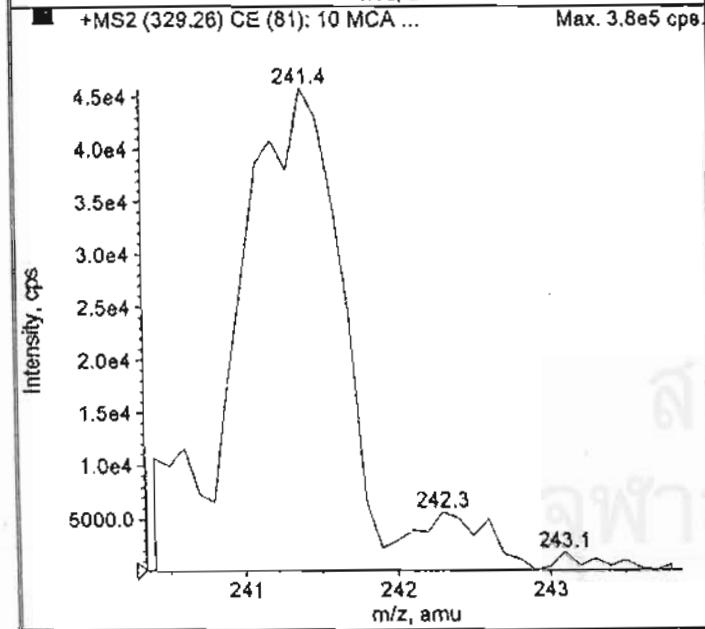
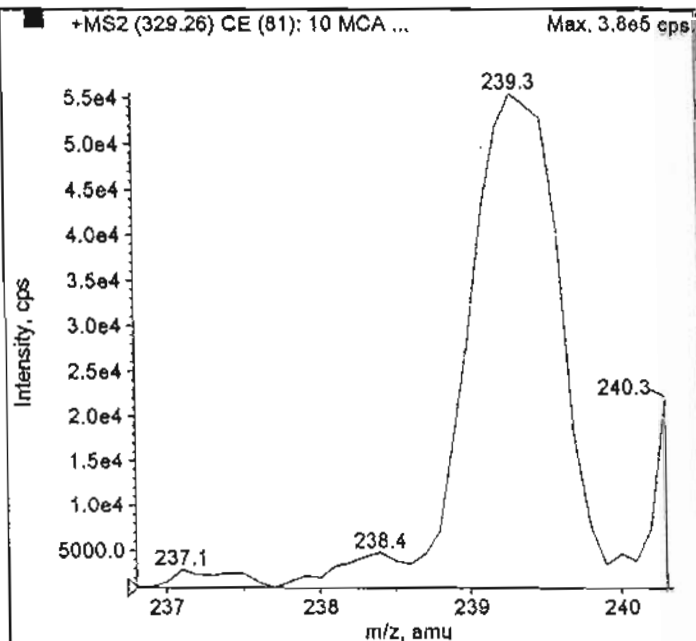
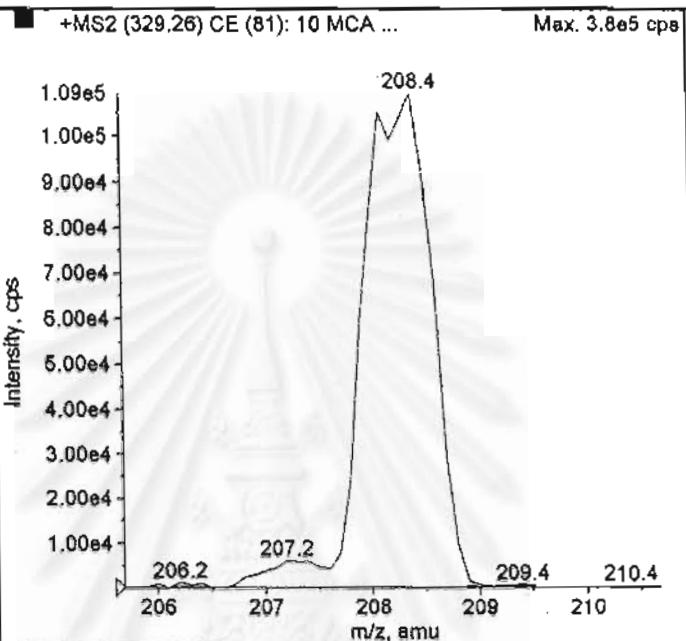
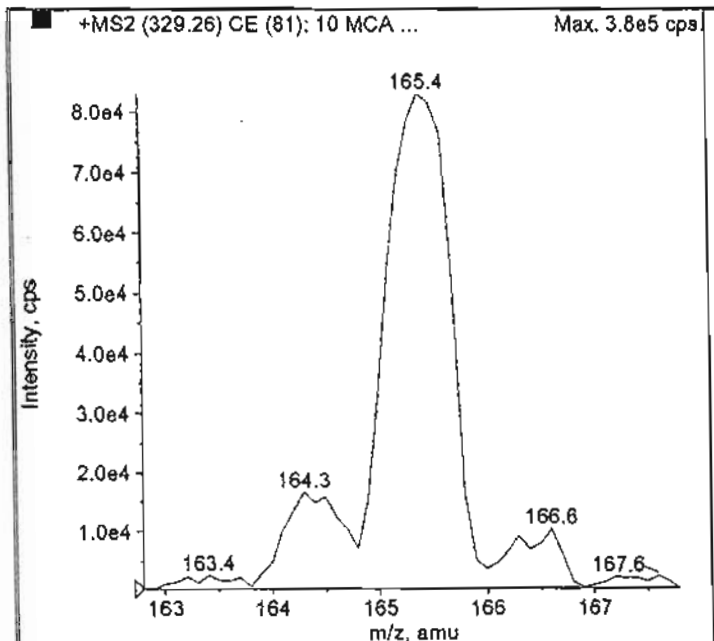
| Masses(amu) | Current Value | New Value | Intensity(cps) |
|-----------------|---------------|-----------|----------------|
| 329.265/165.304 | 30.0 | 81.0 | 6265 |
| 329.265/208.188 | 30.0 | 49.0 | 8448 ✓ |
| 329.265/239.307 | 30.0 | 107.0 | 5417 |
| 329.265/241.379 | 30.0 | 75.0 | 4678 |
| 329.265/284.418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

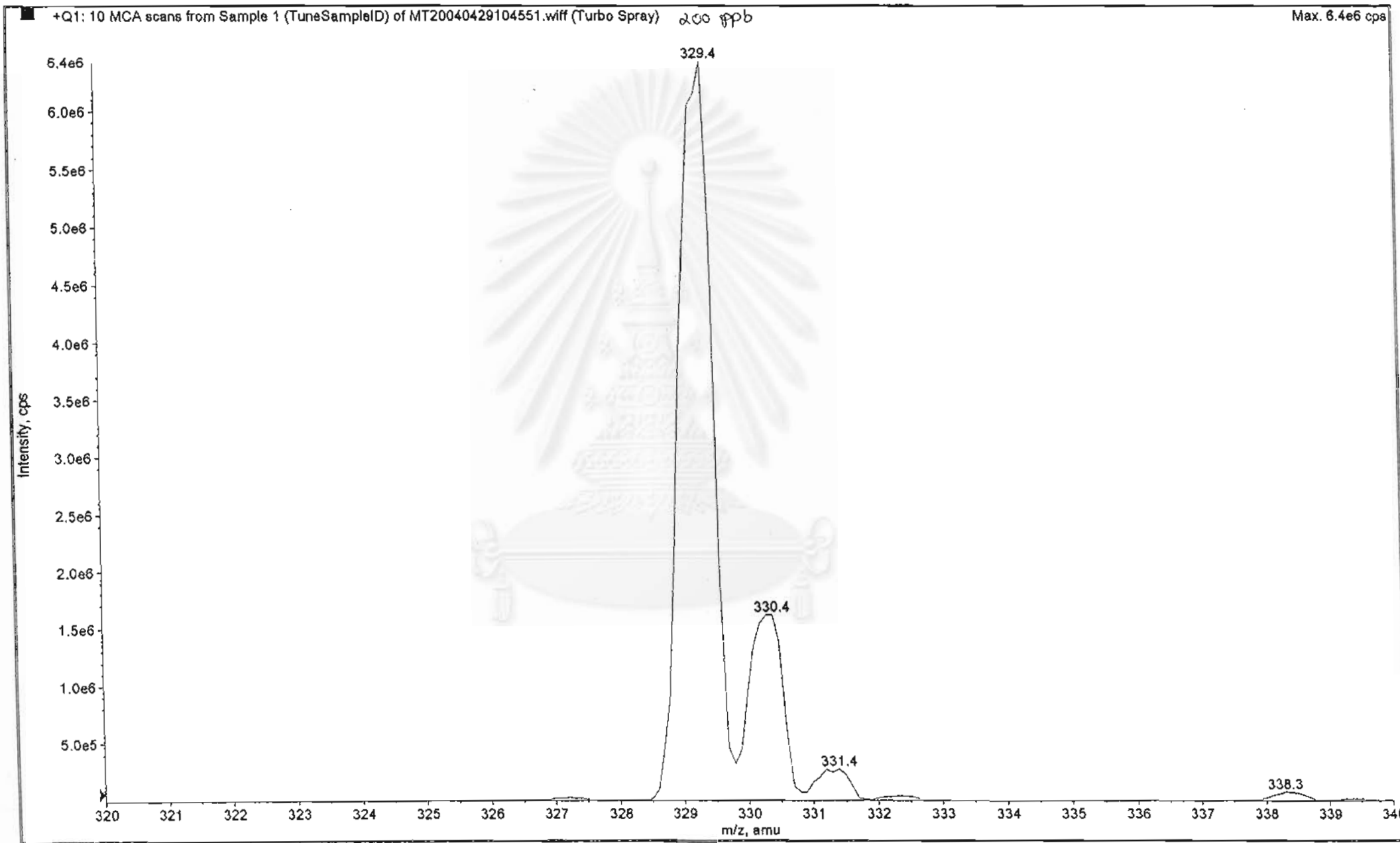
Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

| 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.





61 B

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 |

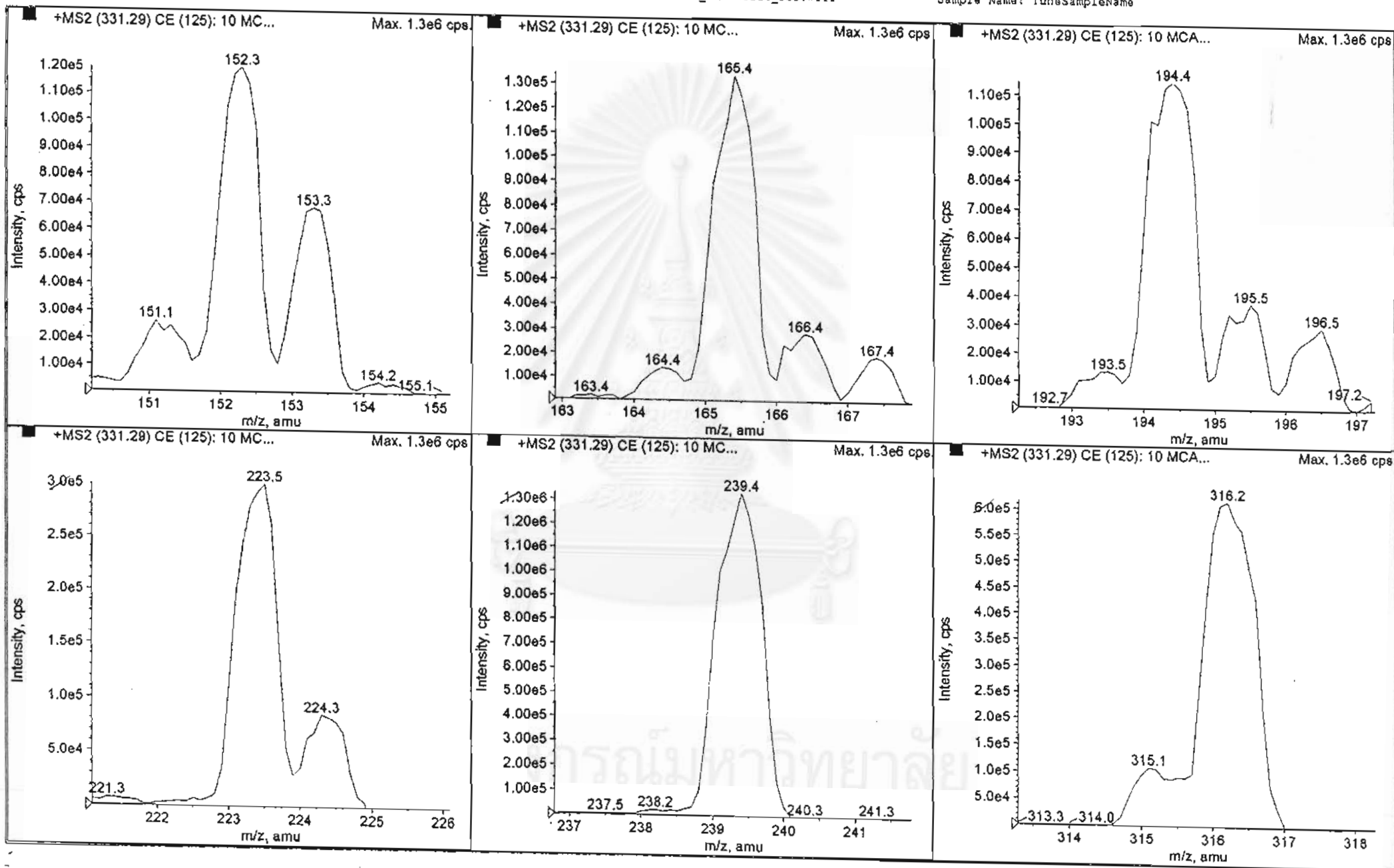
Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

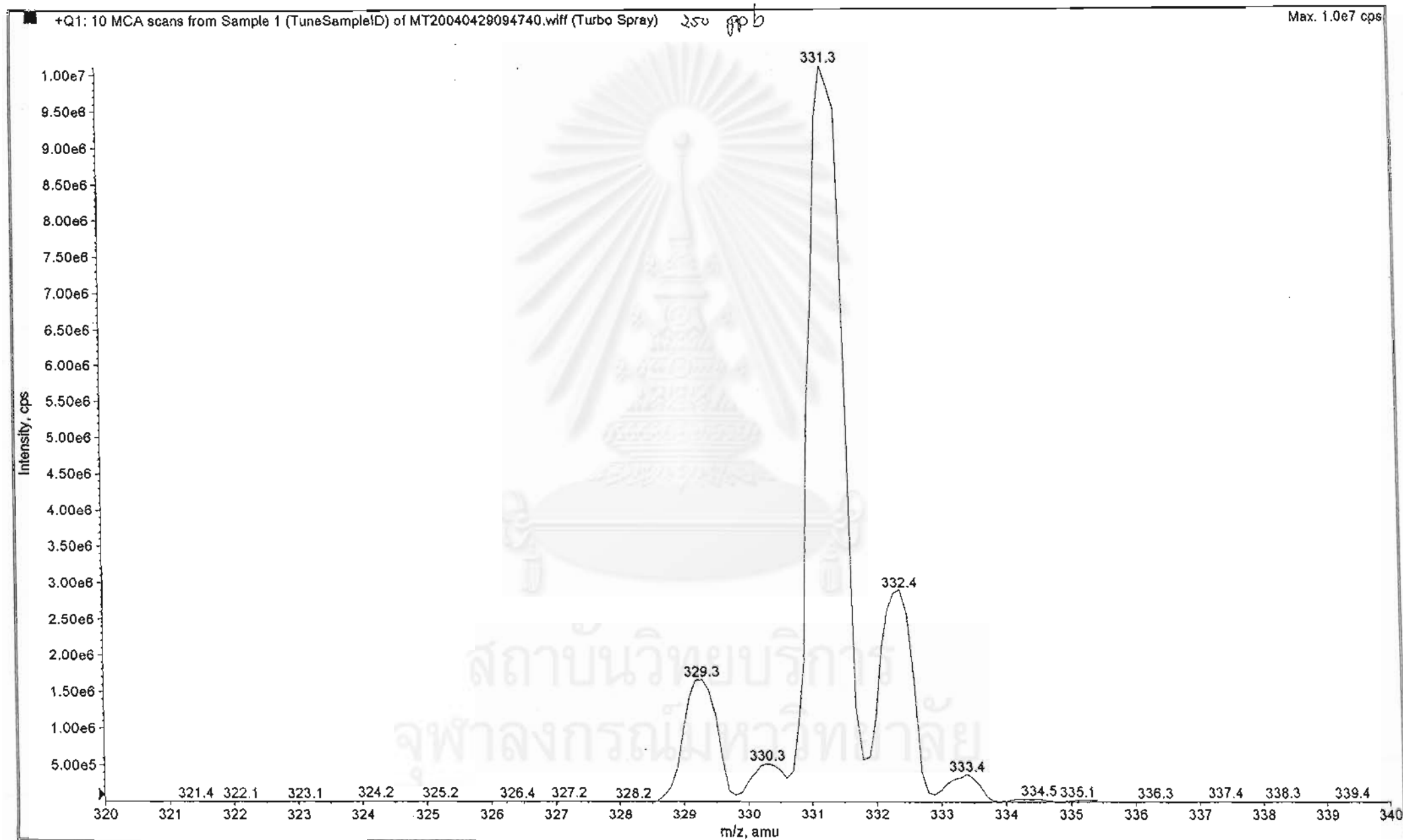
| Masses (amu) | Current Value | New Value | Intensity (cps) |
|------------------------------|--|------------|-----------------|
| 331.292/152.711 | 15.0 | 8.0 | 1253 |
| Parameter: CXP | Start: 0.0 | Stop: 55.0 | Step: 2.0 |
| Masses (amu) | Current Value | New Value | Intensity (cps) |
| 331.292/165.404 | 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.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





15: C

Thursday, April 29, 2004, 11:04

Infusion Quantitative Optimization

dv.

MS/MS Analysis, positive

Precursor ion: Base Peak Ion, Search Range: 370.000 to 376.000 (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

Crystal Violet

Find base peak ion - Start Mass: 370.000 Stop Mass: 376.000

base peak ion mass: 372.278

Initial Q1 Scan

Target Compound Mass (amu) Intensity (cps) (5 MCA Average)
Crystal Violet 372.234 1748880

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

Masses (amu) Current Value New Value Intensity (cps)
372.234 30.0 96.0 1776630

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

Masses (amu) Current Value New Value Intensity (cps)
372.234 200.0 330.0 1851361

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

Masses (amu) Current Value New Value Intensity (cps)
372.234 96.0 71.0 1874078

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

Masses (amu) Current Value New Value Intensity (cps)
372.234 330.0 310.0 1733981

Final Q1 Scan

Target Compound Mass (amu) Intensity (cps) (5 MCA Average)
Crystal Violet 372.236 (M+) 1577680

Final Q1MI Method: Crystal Violet_QOpt_FinalQ1MI_Pos.dam

Target Compound: Crystal Violet

Initial Product Mass Initial Product Ion Intensity (cps) (26 MCA Sum)

356.336 545000
340.178 201000
235.329 91000
239.641 85000
268.320 82000
311.420 60000

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

Masses (amu) Current Value New Value Intensity (cps)
372.236/235.329 30.0 79.0 13195
372.236/239.641 30.0 125.0 10167
372.236/268.320 30.0 91.0 11483
372.236/311.420 30.0 89.0 6140
372.236/340.178 30.0 73.0 52432 ✓
372.236/356.336 30.0 53.0 144897 ✓

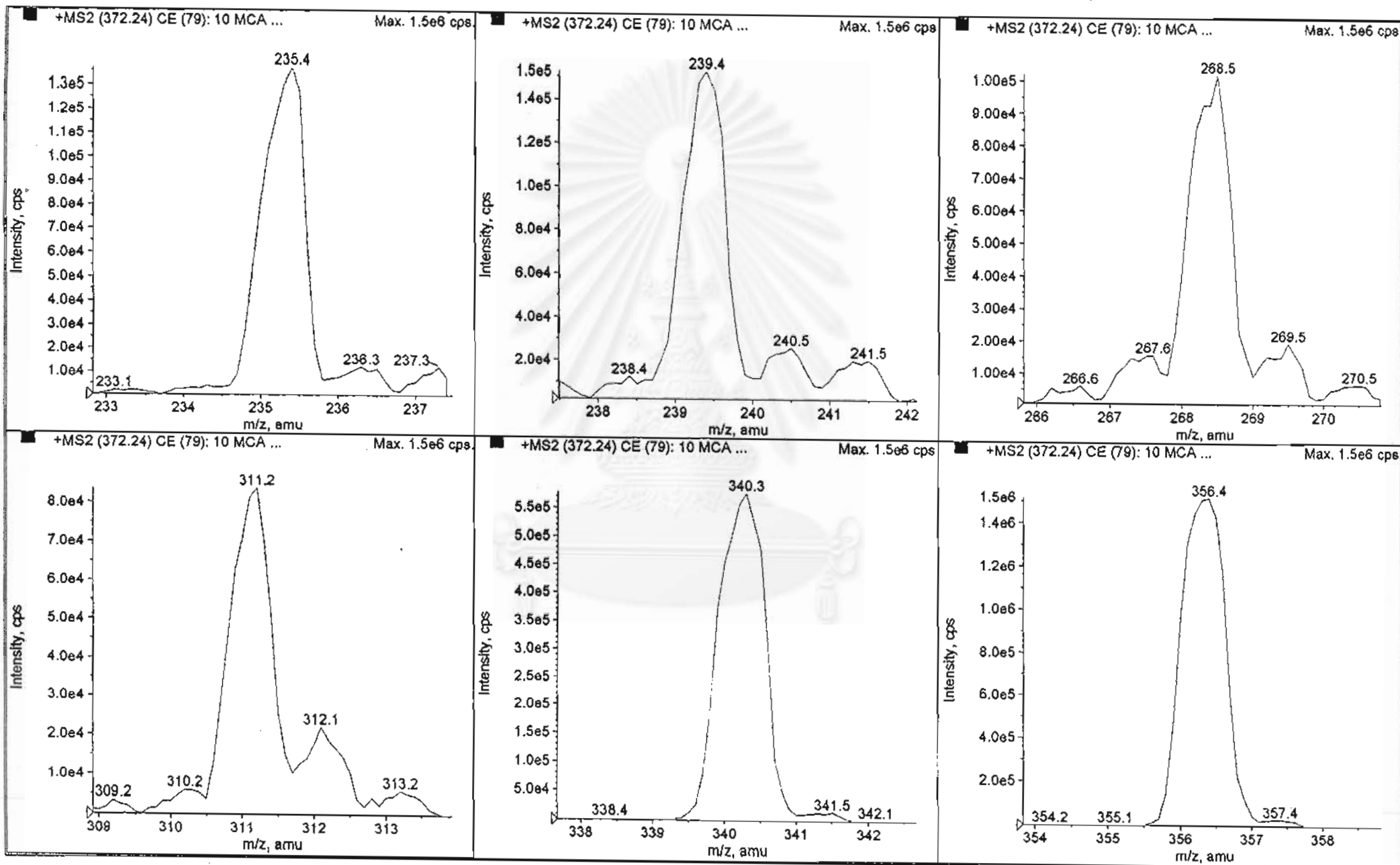
Parameter: CXP Start: 0.0 Stop: 55.0 Step: 2.0

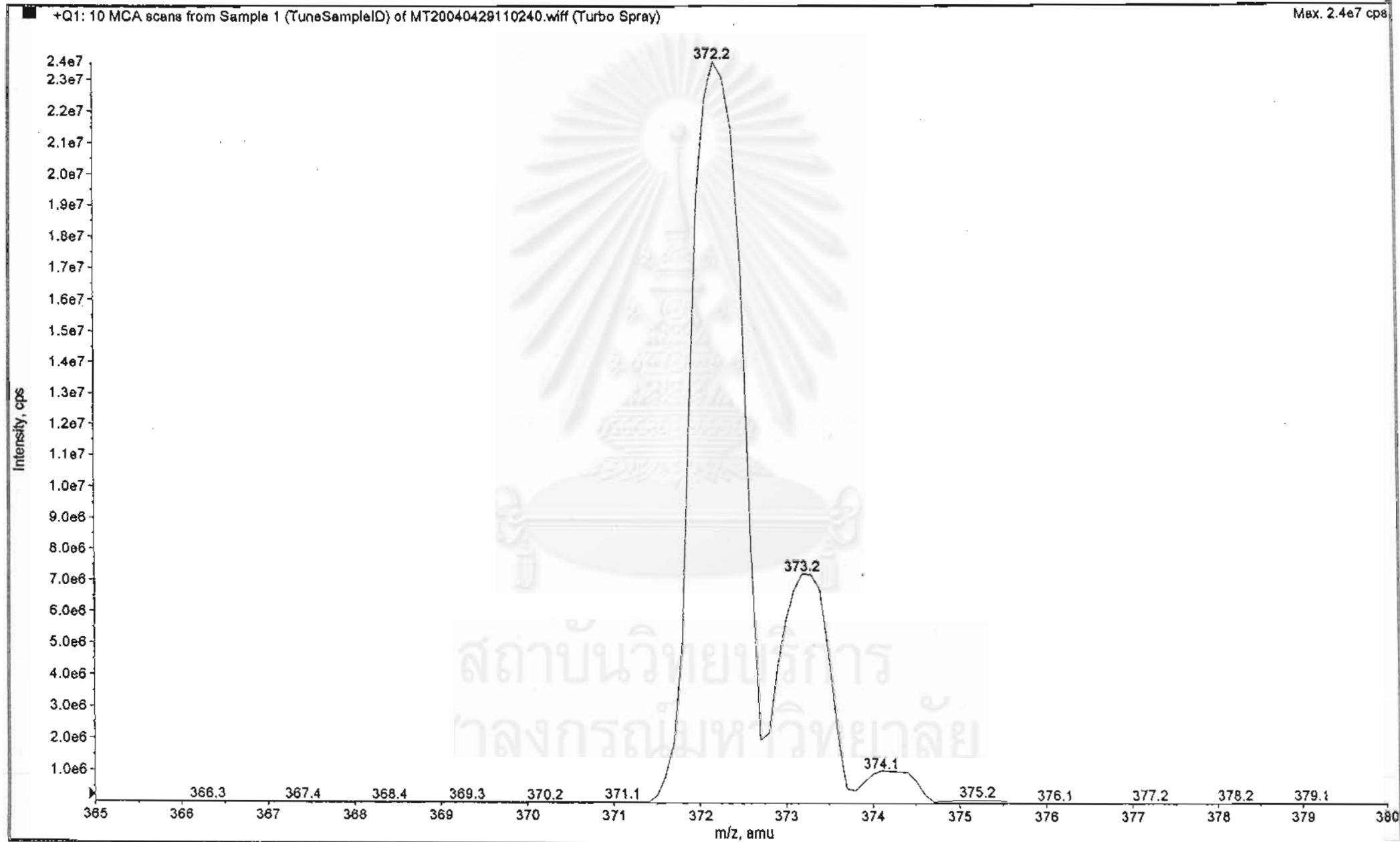
| Masses (amu) | Current Value | New Value | Intensity(cps) |
|------------------------------|---|------------|----------------|
| 372.236/235.329 | 15.0 | 12.0 | 13757 |
| Parameter: CXP | Start: 0.0 | Stop: 55.0 | Step: 2.0 |
| Masses (amu) | Current Value | New Value | Intensity(cps) |
| 372.236/239.641 | 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.







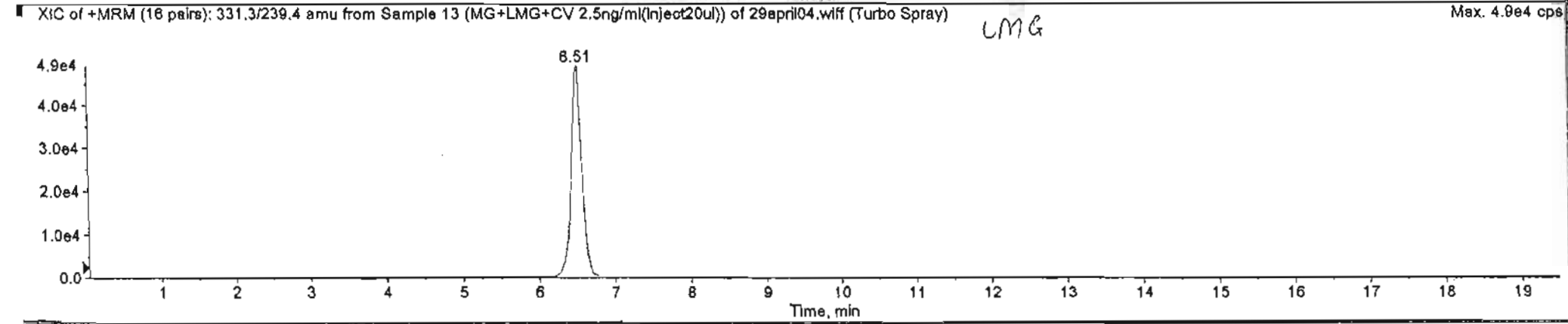
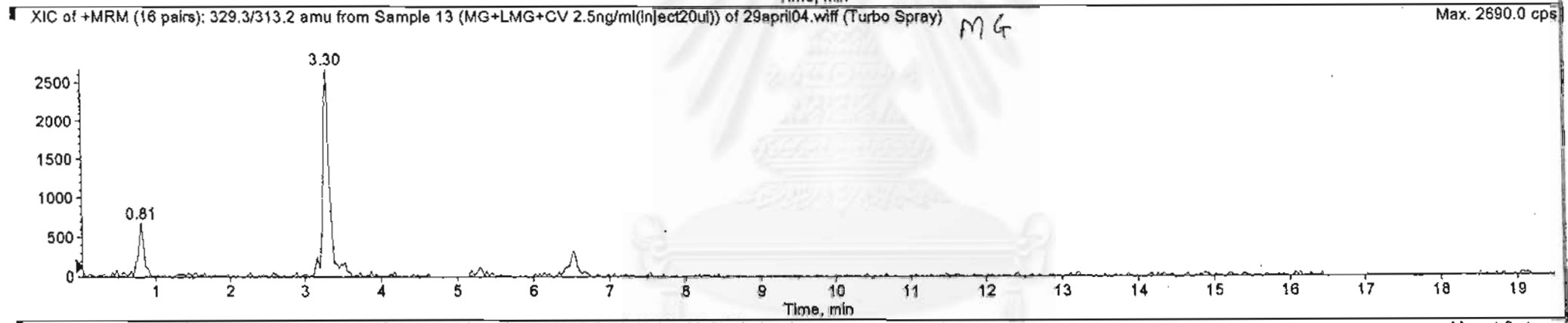
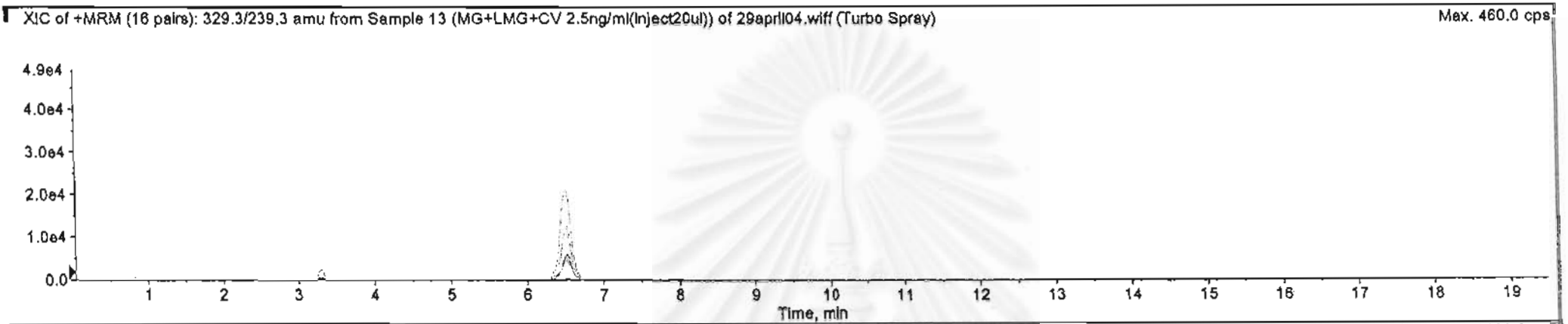
Starting Time: 04:13:48 PM
Starting Date: Thursday, May 06, 2004
Sample Name: MG+LMG+CV 2.5ng/ml(Inject20ul)

API-3000 SN/D-12270307 Chemistry, CU.
Acq. File: 29april04.wiff

Page 1 of 1

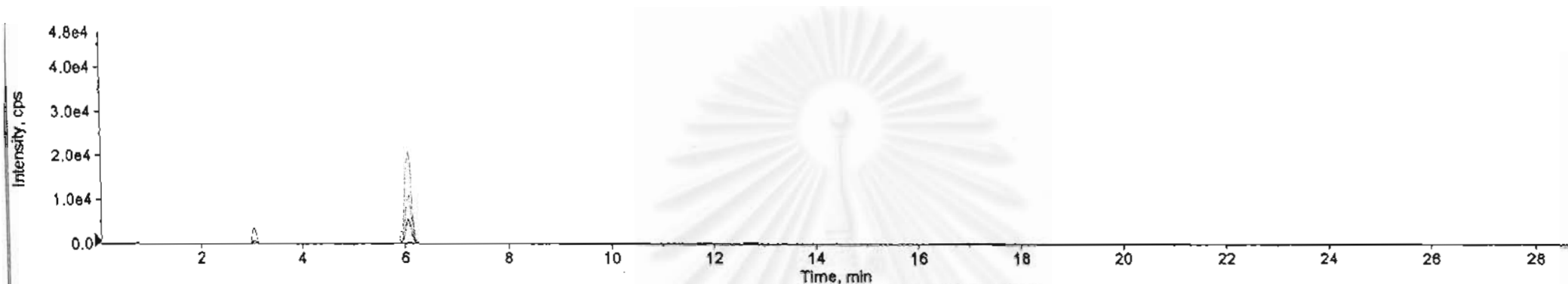
Sample Name: MG+LMG+CV 2.5ng/ml(Inject20ul)

267 D
1



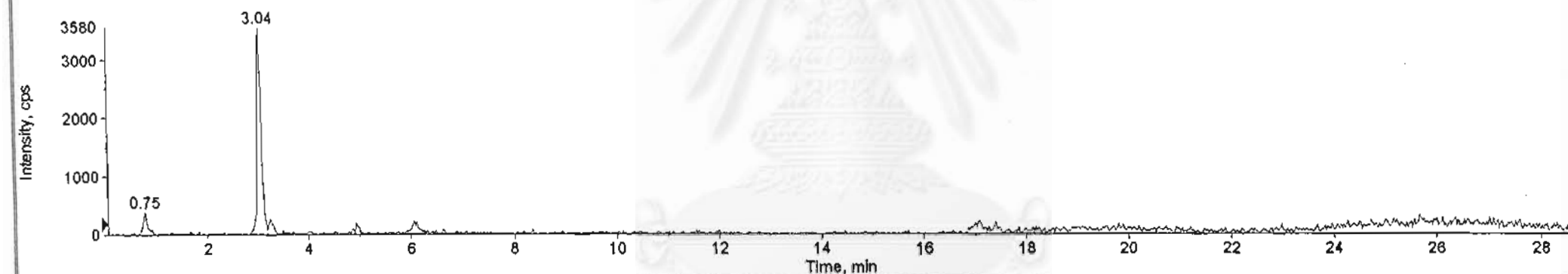
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/239.3 amu from Sample 15 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml (Inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray)

Max. 680.0 cps



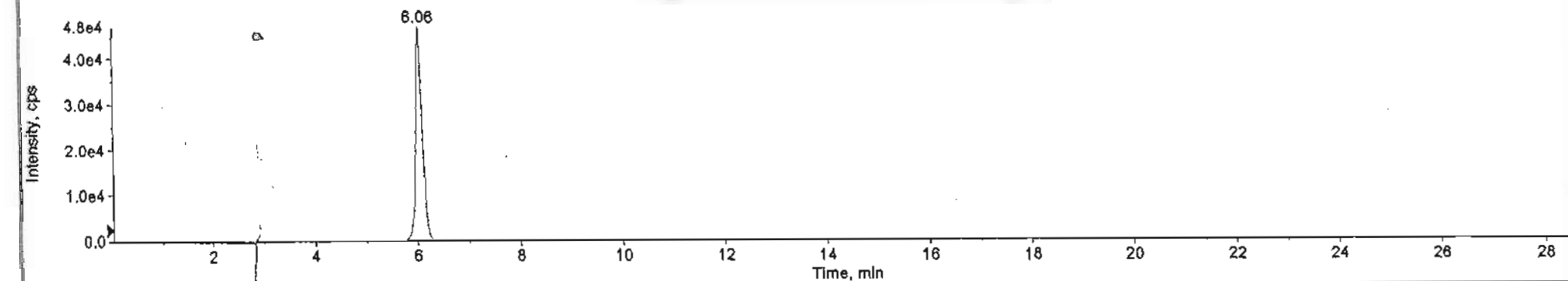
XIC of +MRM (16 pairs): 329.3/313.2 amu from Sample 15 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml (Inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray) *MG*

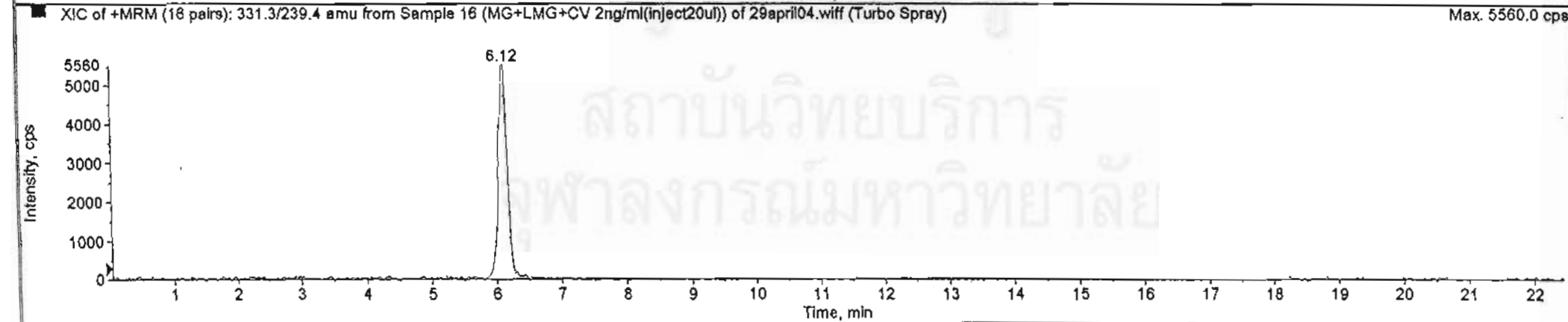
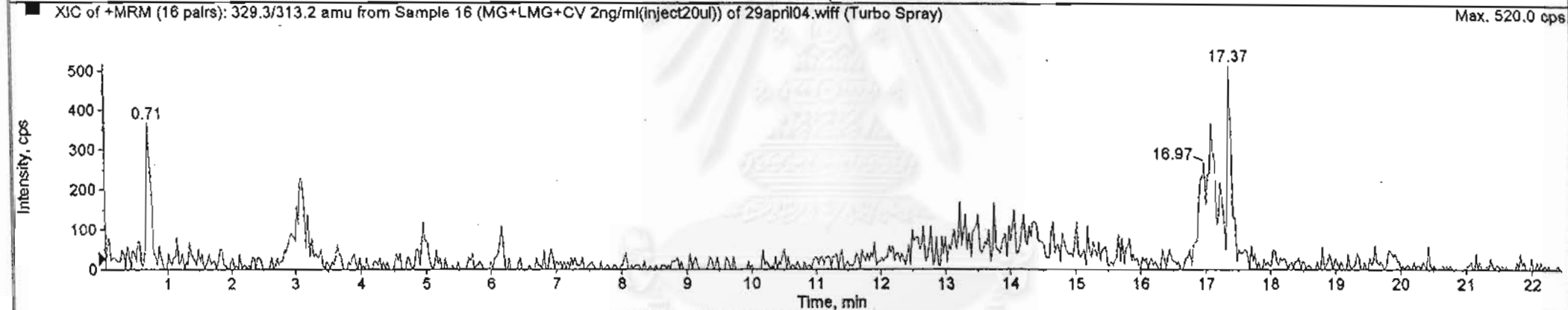
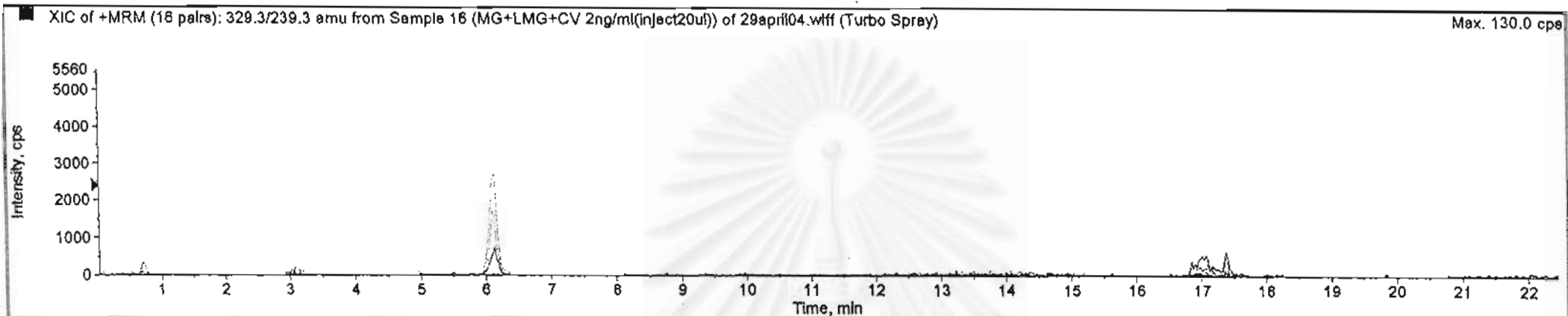
Max. 3580.0 cps

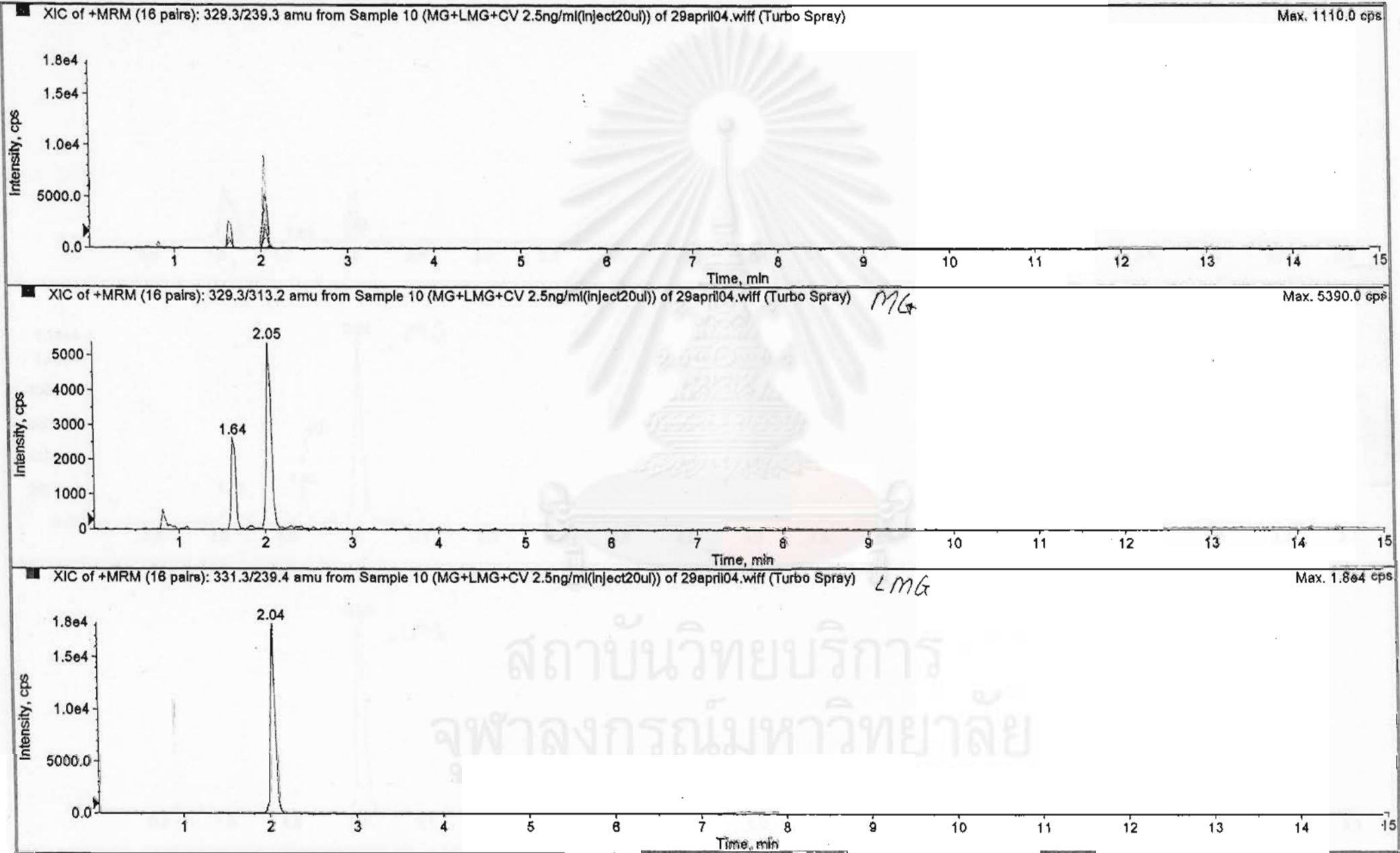


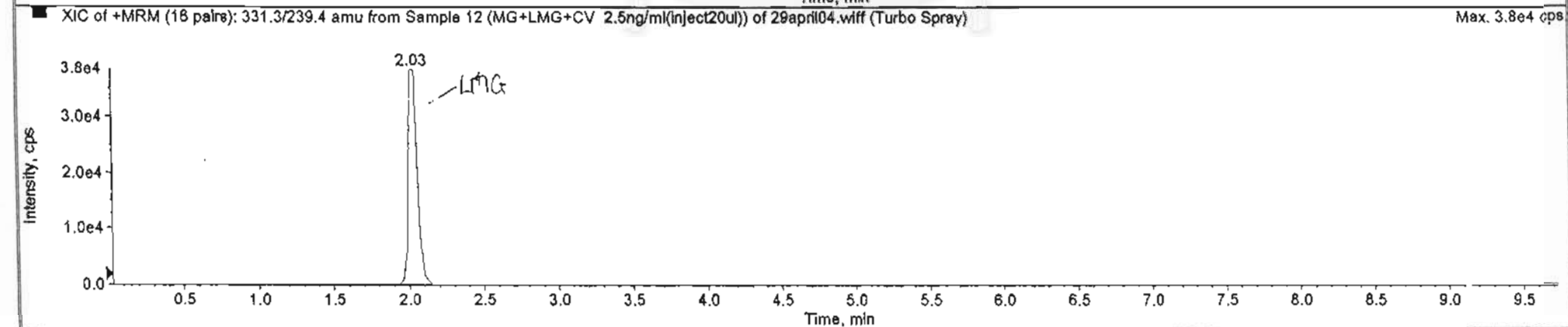
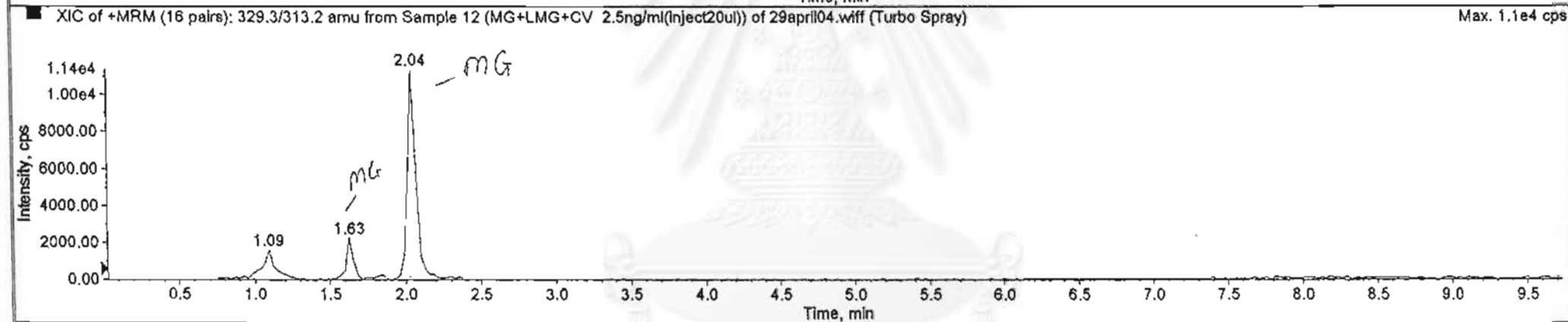
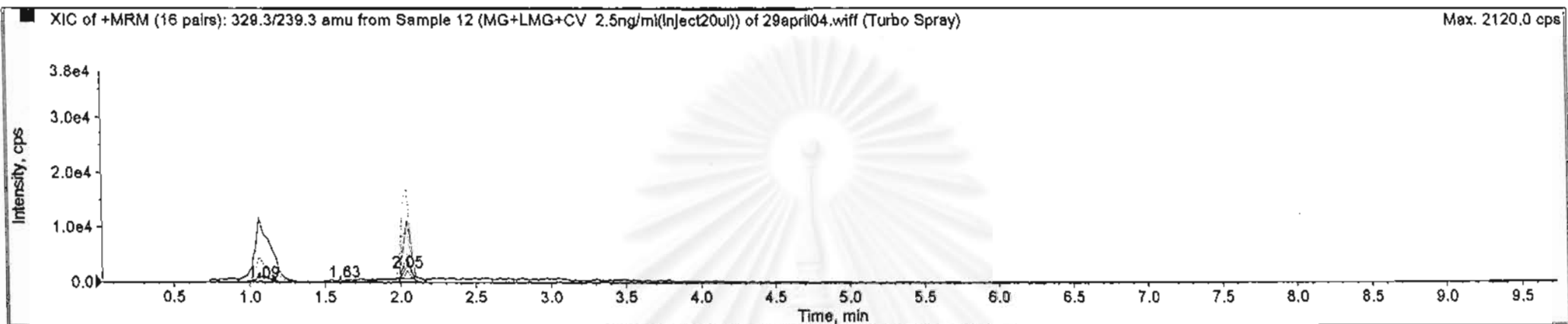
XIC of +MRM (16 pairs): 331.3/239.4 amu from Sample 15 (MG+LMG+CV 2.5ng/ml (Inject20ul)) of 29april04.wiff (Turbo Spray) *LMG*

Max. 4.8e4 cps





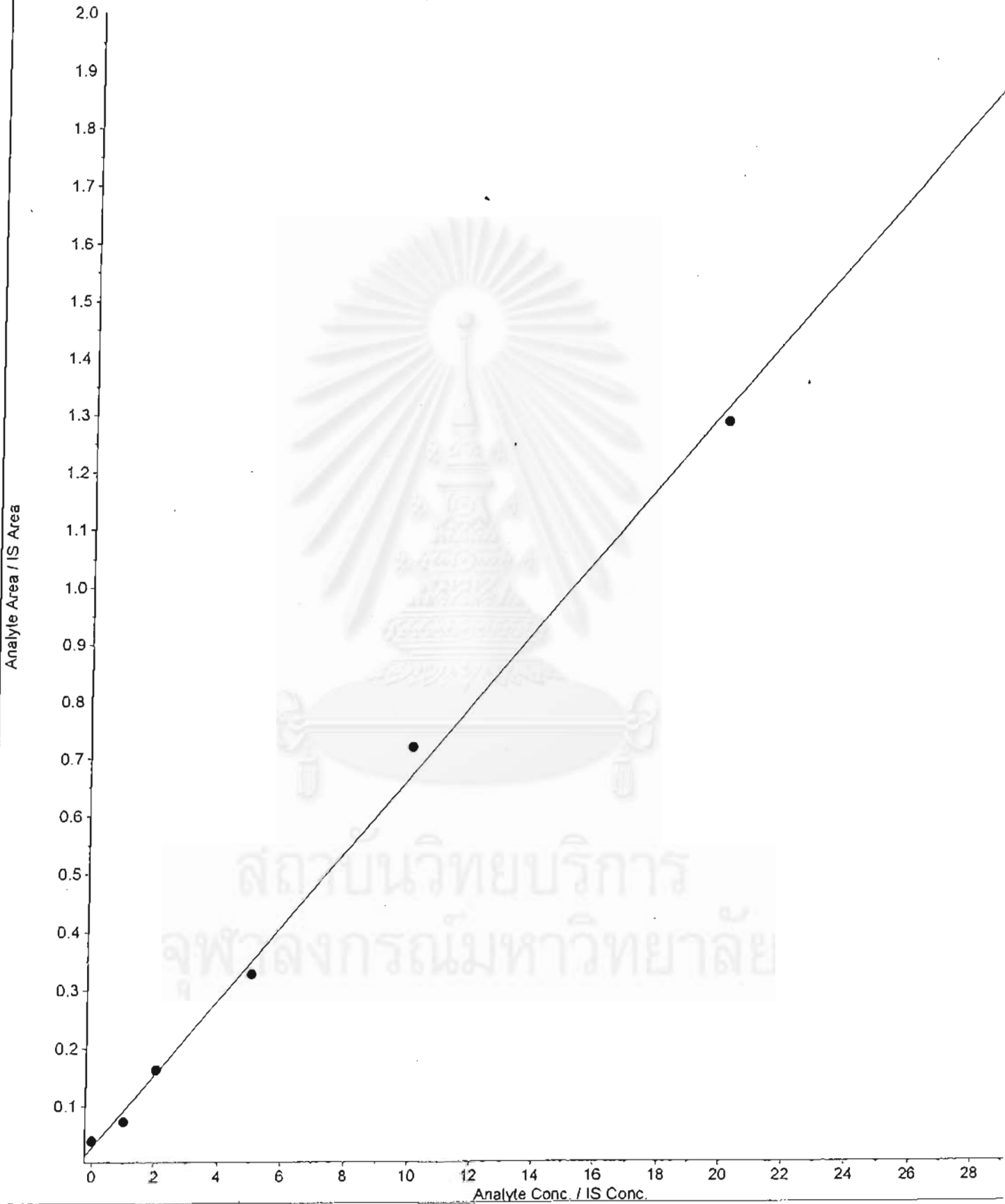




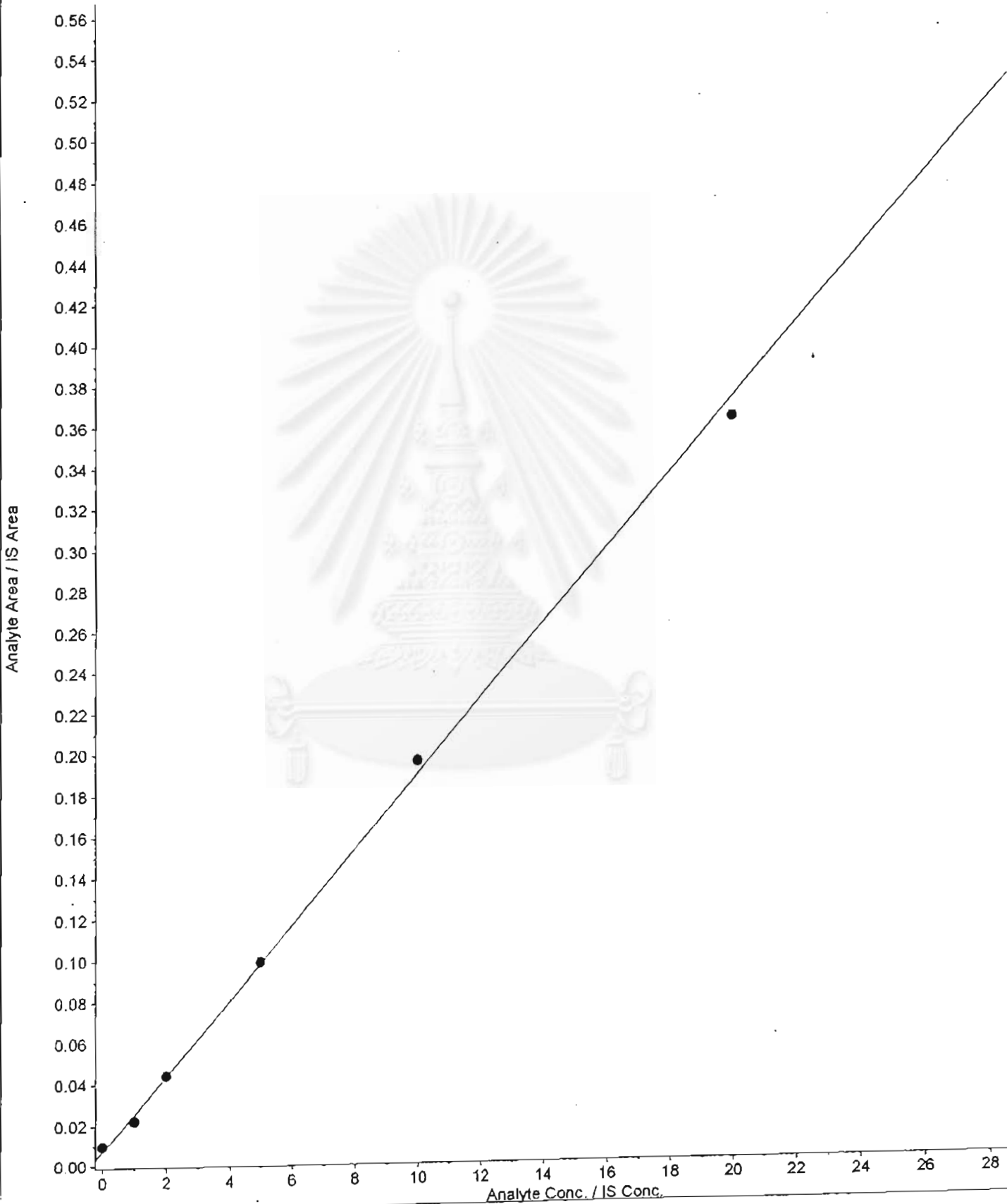


๕๐ E
1

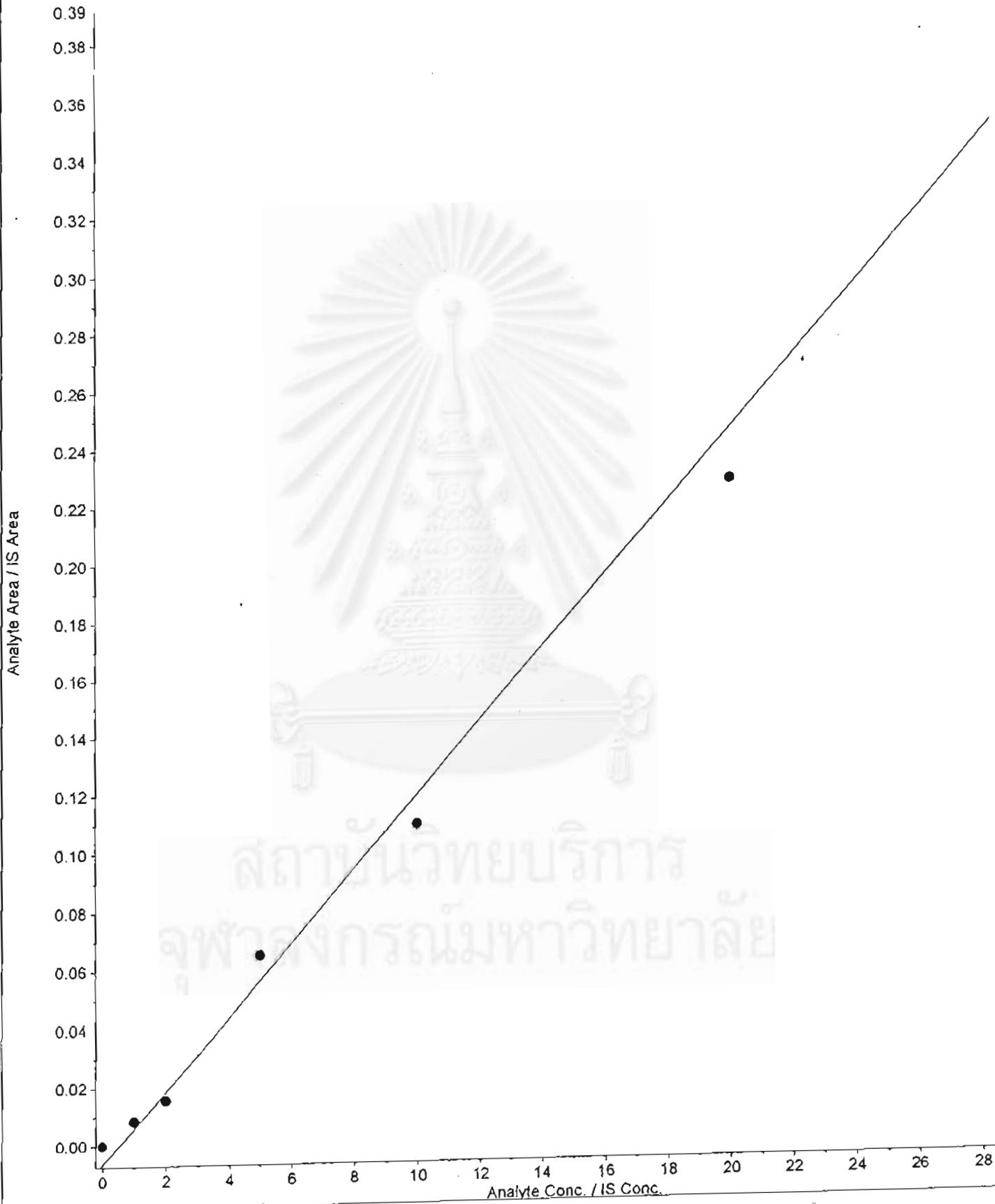
05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (MG 329.3 / 313.2): "Linear" Regression ("No" weight(ng): $y = 0.0643x + 0.0289$ ($r = 0.9994$)



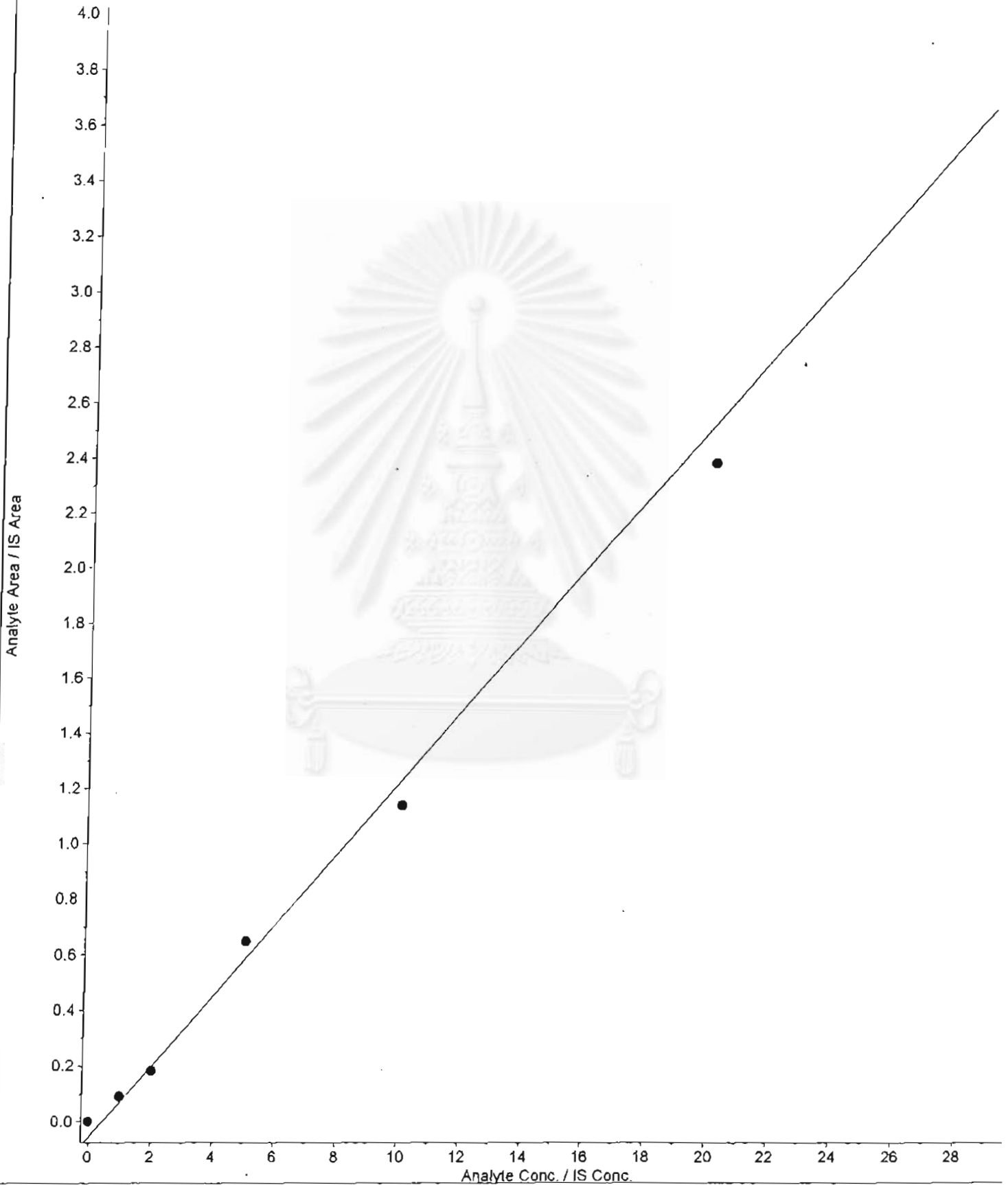
05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (MG.329.3 / 208.4): "Linear" Regression ("No" weighting): $y = 0.0182x + 0.00738$ ($r = 0.9997$)



05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): $y = 0.0125x + -0.00654$ ($r = 0.9968$)



■ 05-07-04 validation 0-30 ppb E3.rdb (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): $y = 0.129x + -0.0586$ ($r = 0.9980$)





STD. ADDN.
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 |

MG 329.3 → 208.4

MG 329.3 → 315.2

LMG 331.3 / 165.4

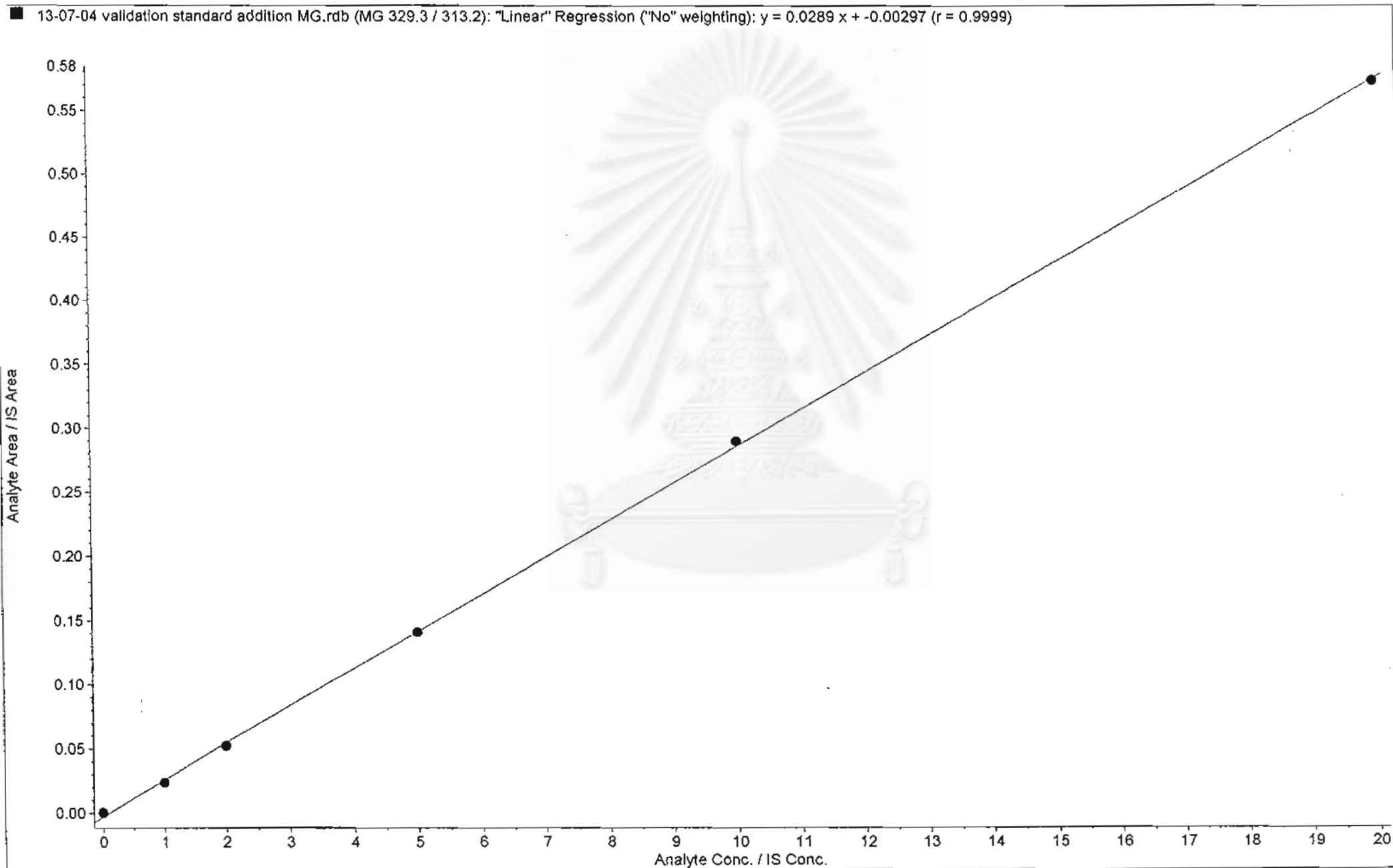
LMG 331.3 / 259.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

std. add.ⁿ
 MG

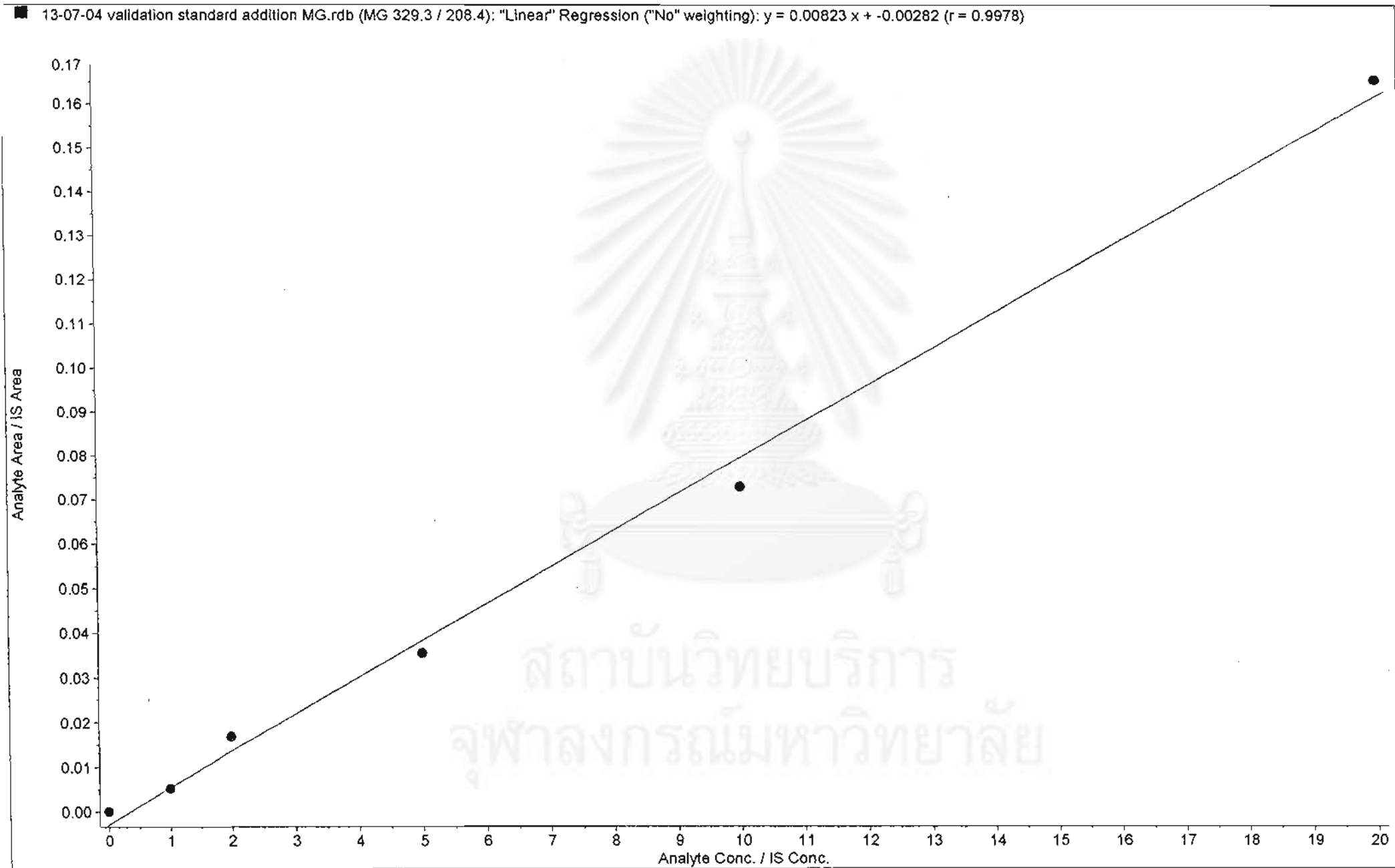
| | Sample Name | Sample Type | File Name | Analyte Peak Area (counts) | Analyte Concentration (ng/mL) | IS Peak Area (counts) | Calculated Concentration (ng/mL) | Accuracy (%) |
|----|-------------------------|----------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| 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 |





Printing Time: 04:56:29 PM
Printing Date: Tuesday, July 13, 2004
Sample Name: S14 Control E4

Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: S14 Control E4



rinting Time: 03:51:24 PM
 rinting Date: Thursday, July 22, 2004
 ample Name: Salmon Control E5M

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

Page 1 of 2

Salmon E5M

Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,.. Sample Name: Salmon Control E5M

STD. ADDN

| | 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. |

MLG 329.3/208.4
 $y = 0.022x - 0.00124$
 $r = 0.9991$

MLG 329.3/313.2
 $y = 0.0669x - 0.0015$
 $r = 0.9996$

LMG 331.3/165.4
 $y = 0.00758x + 0.000021$
 $r = 0.9857$

LMG 331.3/239.4
 $y = 0.102x - 0.0169$
 $r = 0.9913$

| | Sample Name | Sample Type | File Name | Analyte Peak Area (counts) | Analyte Concentration (ng/mL) | IS Peak Area (counts) | Calculated Concentration (ng/mL) | Accuracy (%) |
|----|----------------------|----------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| 36 | 5 Salmon + 2 ppb E5M | Quality Contro | July\22-07-04.wiff | 1.05e+004 | 2.00 | 6.91e+004 | 2.31 ✓ | 116. |



TABULASI FZSH E5M

STY ANDU.

| | 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. $y = 0.00966x + -0.000237$ |
| 3 | F4+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 5.09e+003 | 2.00 | 1.80e+005 | 1.57 | 78.6 $r = 0.9579$ |
| 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. $y = 0.036x + -0.00363$ |
| 8 | F4+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 5.04e+004 | 2.00 | 1.80e+005 | 1.38 | 68.8 $r = 0.9892$ |
| 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. $y = 0.0207x + -0.00431$ |
| 13 | F4+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 4.00e+003 | 2.00 | 1.80e+005 | 2.32 | 116. $r = 0.9917$ |
| 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. $y = 0.25x + -0.0645$ |
| 18 | F4+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 1.25e+004 | 2.00 | 1.80e+005 | 2.02 | 101. $r = 0.9829$ |
| 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. |

326.3/208.4
 329.3/313.2
 331.3/165.4
 331.3/239.4

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Shrimp E5M
 STD ADDM

| | 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 |

mg 329.3 / 208.4
 $y = 0.0178x + 0.005279$
 $r = 0.9792$
 mg 329.3 / 313.2
 $y = 0.0618x + 0.0169$
 $r = 0.9805$
 Lmg 331.3 / 165.4
 $y = 0.00562x + -0.00257$
 $r = 0.9716$
 Lmg 331.3 / 239.4
 $y = 0.0552x + -0.00581$
 $r = 0.9977$

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

nting Time: 04:53:19 PM
nting Date: Tuesday, July 13, 2004
ple Name: S14 Control E4

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

Page 1 of 1

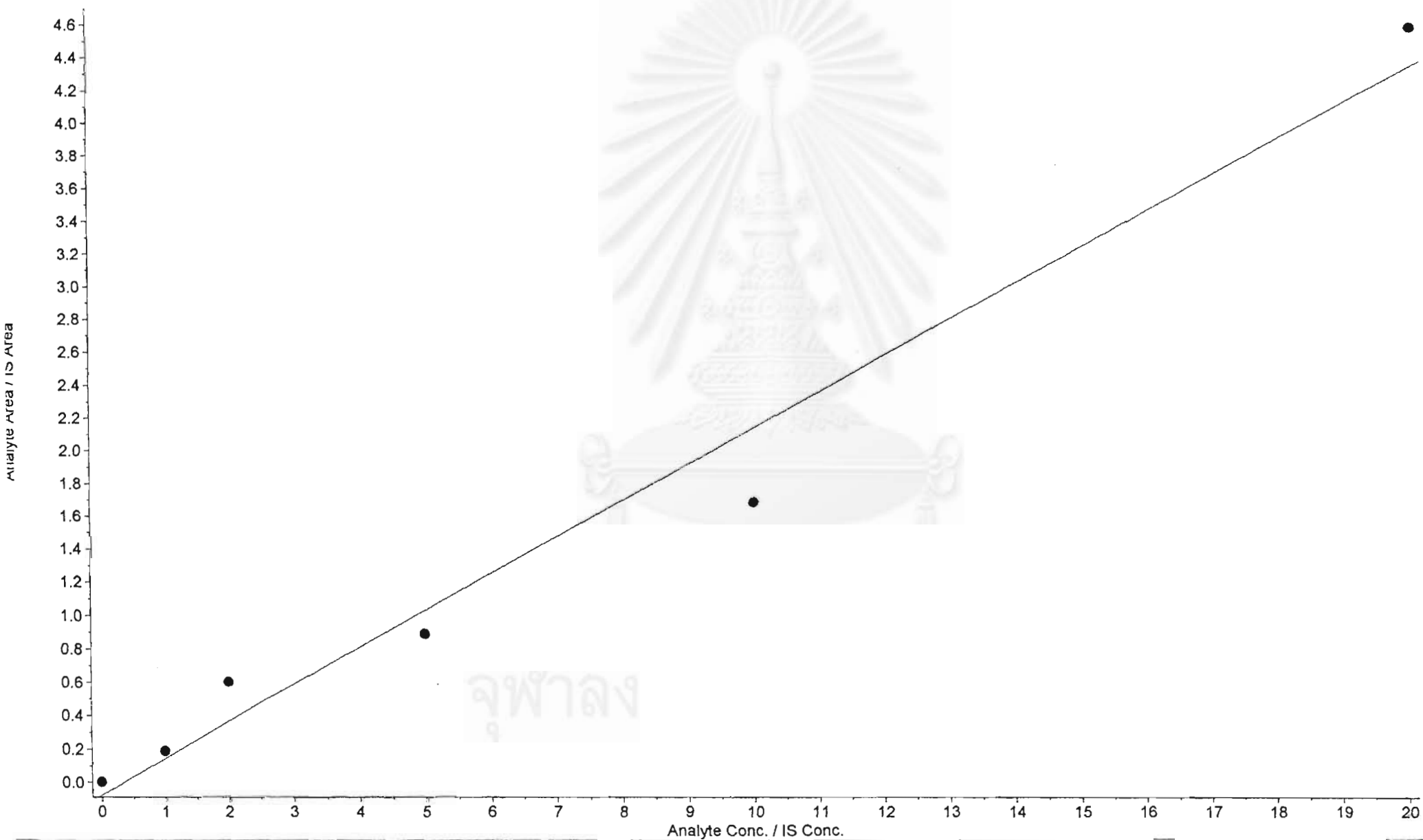
Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam,. Sample Name: S14 Control E4

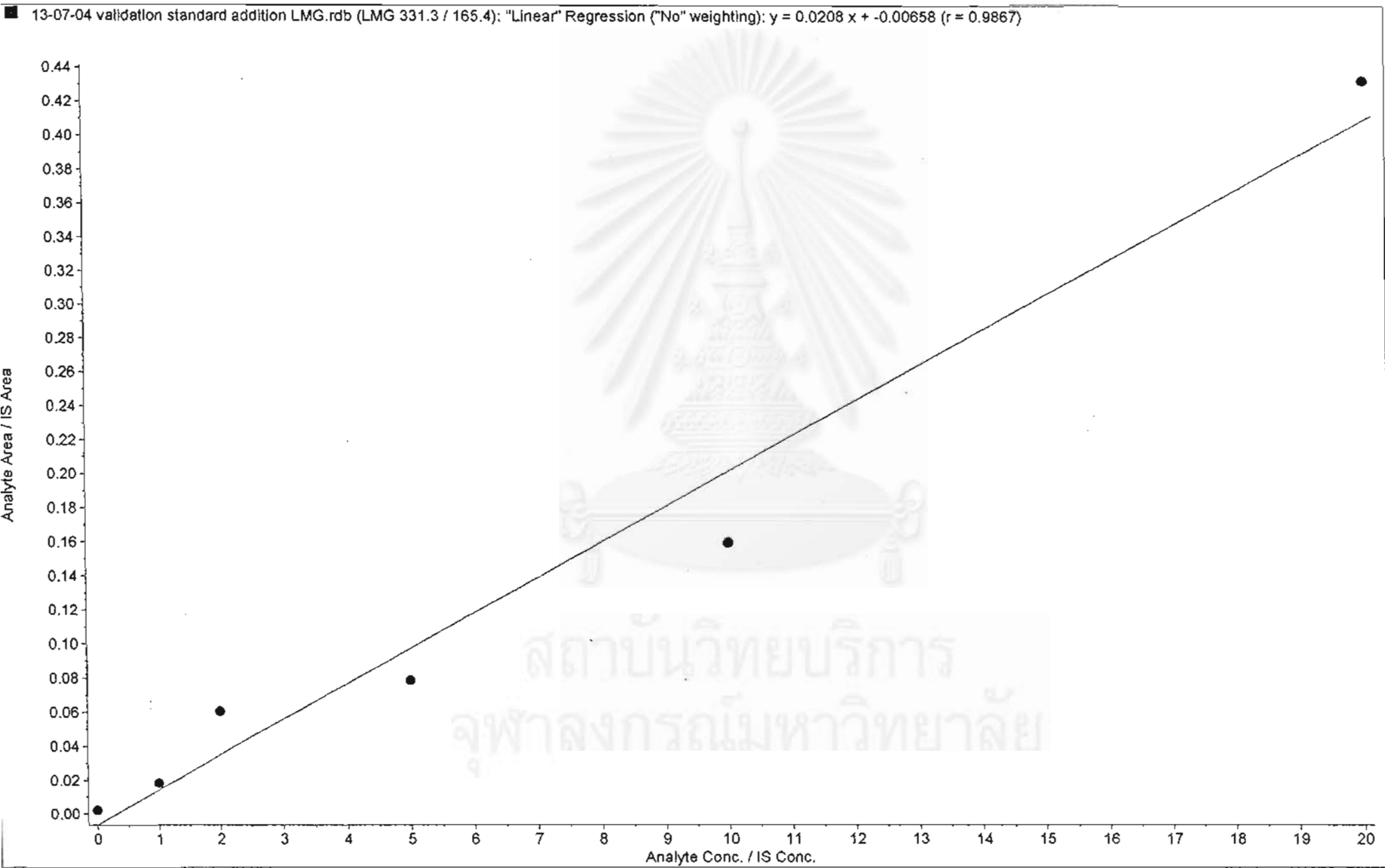
Std. add^M
LMG

| | Sample Name | Sample Type | File Name | Analyte Peak Area (counts) | Analyte Concentration (ng/mL) | IS Peak Area (counts) | Calculated Concentration (ng/mL) | Accuracy (%) |
|---|------------------|----------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| | S14 Control E4 | Standard | July\13-07-04.wiff | 3.26e+002 | 0.00 | 1.75e+005 | 0.406 | N/A |
| | S14 Control E4 | Standard | July\13-07-04.wiff | 0.00e+000 | 0.00 | 1.75e+005 | No Peak | N/A |
| | S14 Spiked LMG 1 | Standard | July\13-07-04.wiff | 2.04e+003 | 1.00 | 1.12e+005 | 1.19 | 119. |
| | S14 Spiked LMG 1 | Standard | July\13-07-04.wiff | 2.12e+004 | 1.00 | 1.12e+005 | 1.21 | 121. |
| | S14 Spiked LMG 2 | Standard | July\13-07-04.wiff | 1.01e+004 | 2.00 | 1.67e+005 | 3.23 | 161. |
| | S14 Spiked LMG 2 | Standard | July\13-07-04.wiff | 1.00e+005 | 2.00 | 1.67e+005 | 3.06 | 153. |
| | S14 Spiked LMG 5 | Standard | July\13-07-04.wiff | 8.00e+003 | 5.00 | 1.02e+005 | 4.09 | 81.9 |
| | S14 Spiked LMG 5 | Standard | July\13-07-04.wiff | 9.06e+004 | 5.00 | 1.02e+005 | 4.36 | 87.2 |
| | S14 Spiked LMG 1 | Standard | July\13-07-04.wiff | 1.67e+004 | 10.0 | 1.05e+005 | 7.98 | 79.8 |
| 0 | S14 Spiked LMG 1 | Standard | July\13-07-04.wiff | 1.77e+005 | 10.0 | 1.05e+005 | 7.96 | 79.6 |
| 1 | S14 Spiked LMG 2 | Standard | July\13-07-04.wiff | 6.80e+004 | 20.0 | 1.57e+005 | 21.1 | 106. |
| 2 | S14 Spiked LMG 2 | Standard | July\13-07-04.wiff | 7.24e+005 | 20.0 | 1.57e+005 | 21.1 | 105. |
| 3 | S14 Spiked 5 ppb | Quality Contro | July\13-07-04.wiff | 1.27e+004 | 5.00 | 1.23e+005 | 5.28 | 106. |
| 4 | S14 Spiked 5 ppb | Quality Contro | July\13-07-04.wiff | 1.24e+005 | 5.00 | 1.23e+005 | 4.90 | 98.0 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13-07-04 validation standard addition LMG.rdb (LMG 331.3 / 239.4): "Linear" Regression ("No" weighting): $y = 0.222x + -0.0785$ ($r = 0.9881$)





nting Time: 04:57:28 PM
 nting Date: Wednesday, July 21, 2004
 ple Name: S14 control E5M

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

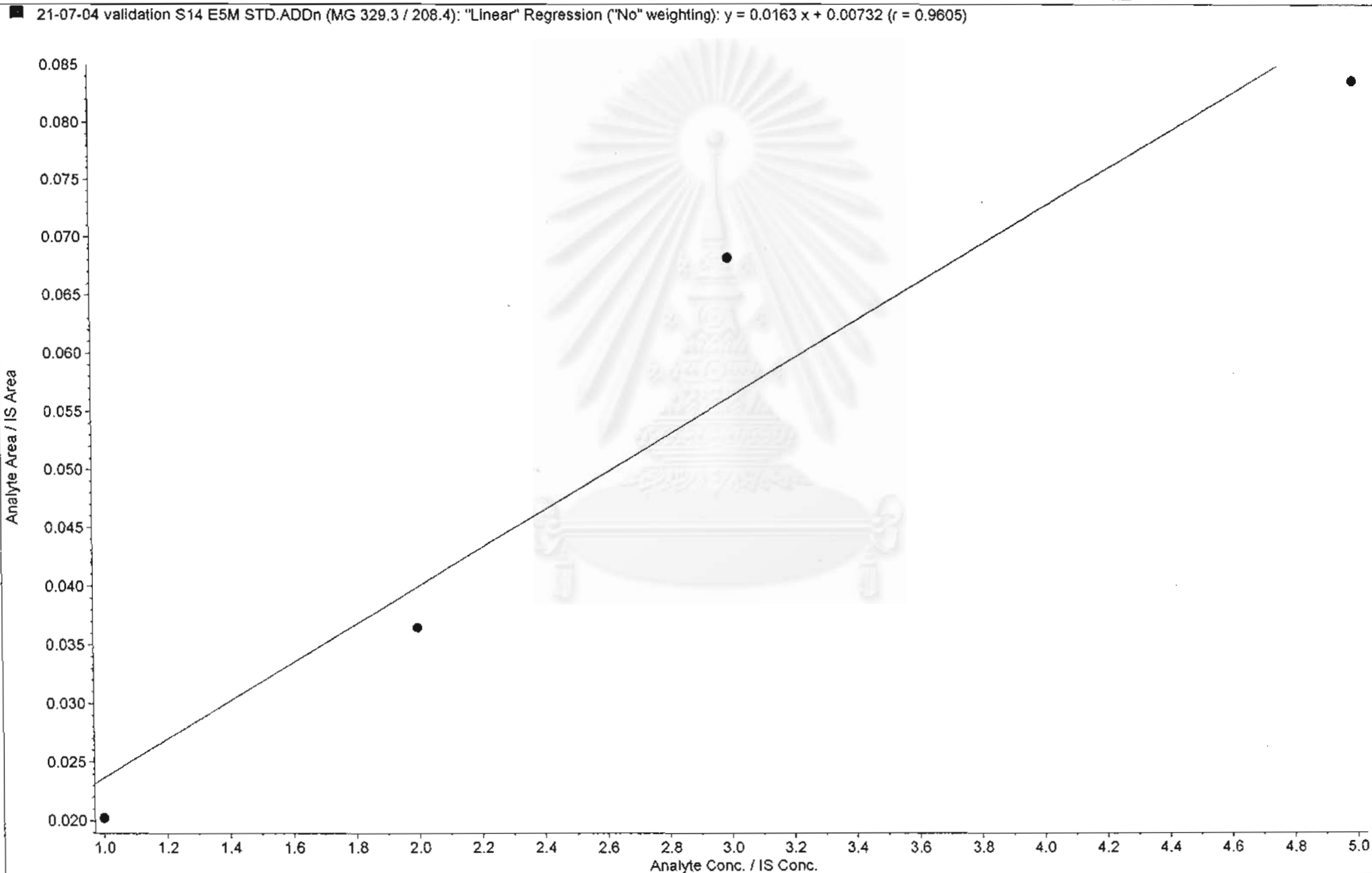
Page 1 of 1

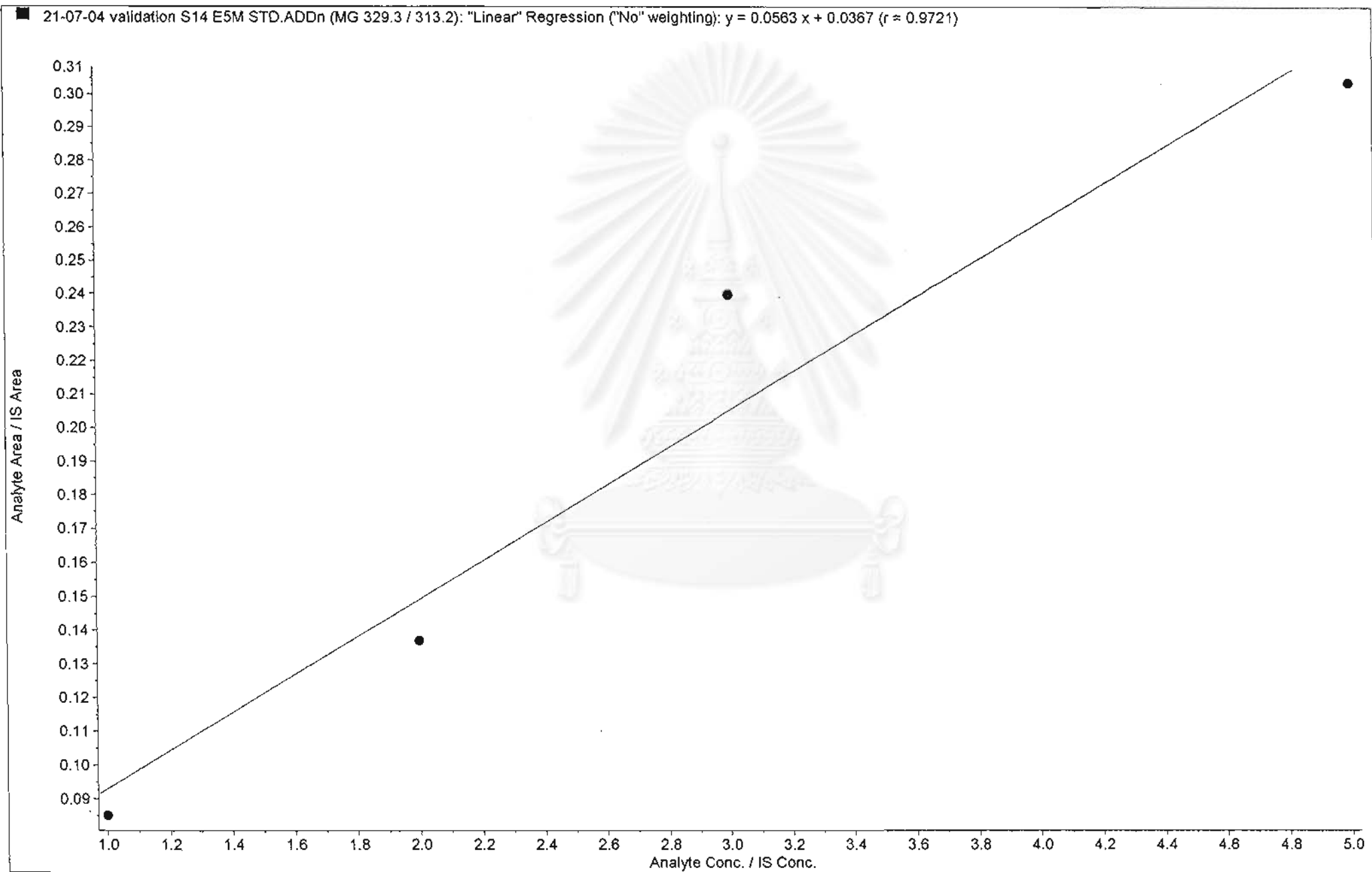
Acq. File: Malachite green-Leucomalachite green .dam, . Sample Name: S14 control E5M

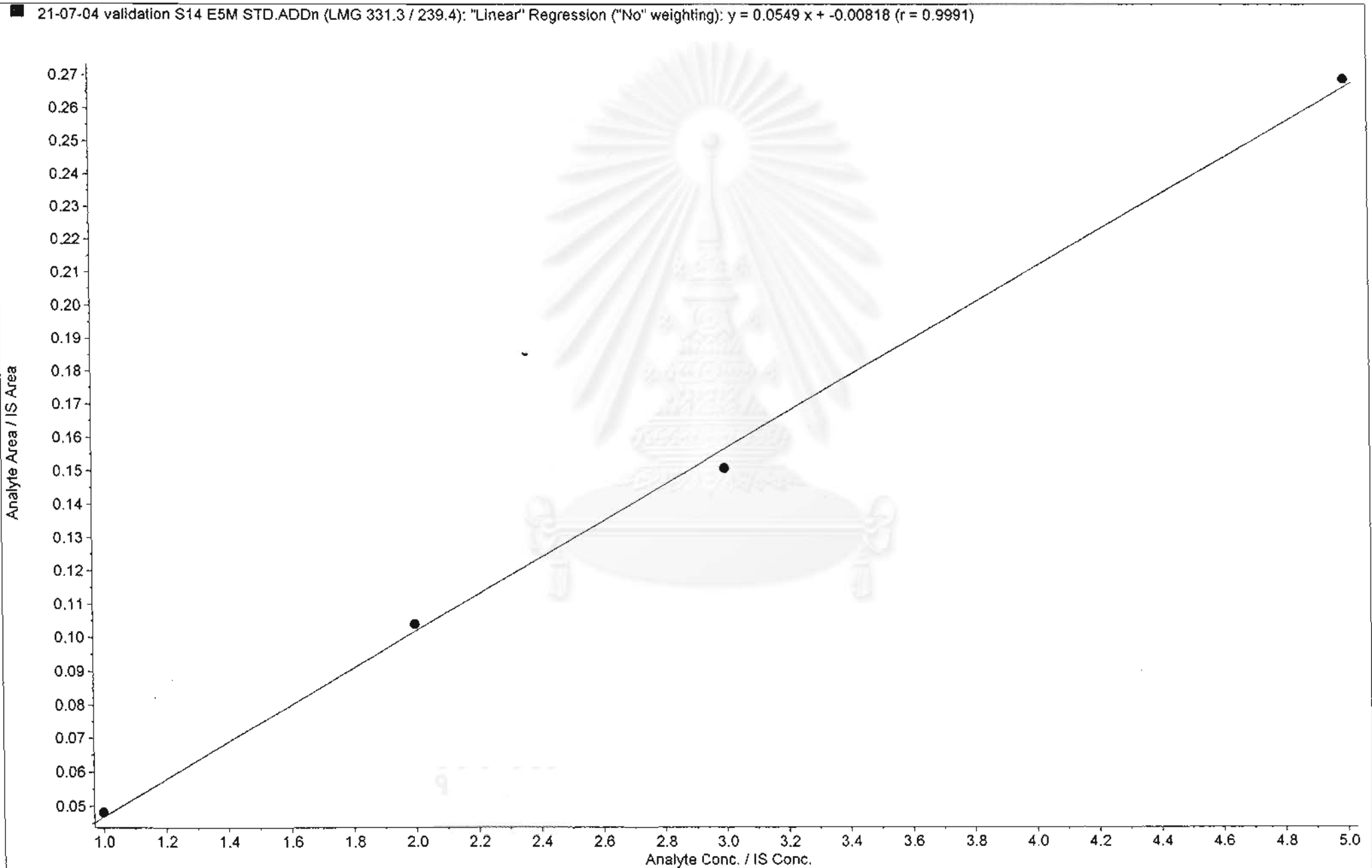
| | Sample Name | Sample Type | File Name | Analyte Peak Area (counts) | Analyte Concentration (ng/mL) | IS Peak Area (counts) | Calculated Concentration (ng/mL) | Accuracy (%) |
|----|-----------------|-------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| | S14 control E5M | Unknown | July\21-07-04.wiff | 0.00e+000 | N/A | 5.01e+004 | No Peak | N/A |
| | S14+1 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 0.00e+000 | 1.00 | 2.24e+004 | No Peak | N/A |
| | S14+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 4.55e+002 | 2.00 | 4.72e+004 | 2.39 | 120. |
| | S14+3 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 4.20e+002 | 3.00 | 3.80e+004 | 2.61 | 86.9 |
| | S14+5 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 1.54e+003 | 5.00 | 5.67e+004 | 5.10 | 102. |
| | S14 control E5M | Unknown | July\21-07-04.wiff | 0.00e+000 | N/A | 5.01e+004 | No Peak | N/A |
| | S14+1 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 1.08e+003 | 1.00 | 2.24e+004 | 1.02 | 102. |
| | S14+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 4.90e+003 | 2.00 | 4.72e+004 | 2.04 | 102. |
| | S14+3 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 5.73e+003 | 3.00 | 3.80e+004 | 2.89 | 96.5 |
| 0 | S14+5 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 1.52e+004 | 5.00 | 5.67e+004 | 5.04 | 101. |
| 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 | 4.52e+002 | 1.00 | 2.24e+004 | 0.790 | 79.0 |
| 3 | S14+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 1.72e+003 | 2.00 | 4.72e+004 | 1.79 | 89.4 |
| 4 | S14+3 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 2.60e+003 | 3.00 | 3.80e+004 | 3.74 | 125. |
| 5 | S14+5 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 4.74e+003 | 5.00 | 5.67e+004 | 4.68 | 93.7 |
| 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 | 1.90e+003 | 1.00 | 2.24e+004 | 0.859 | 85.9 |
| 8 | S14+2 ppb E5M | Standard | July\21-07-04.wiff | 6.46e+003 | 2.00 | 4.72e+004 | 1.78 | 89.0 |
| 9 | 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 |

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

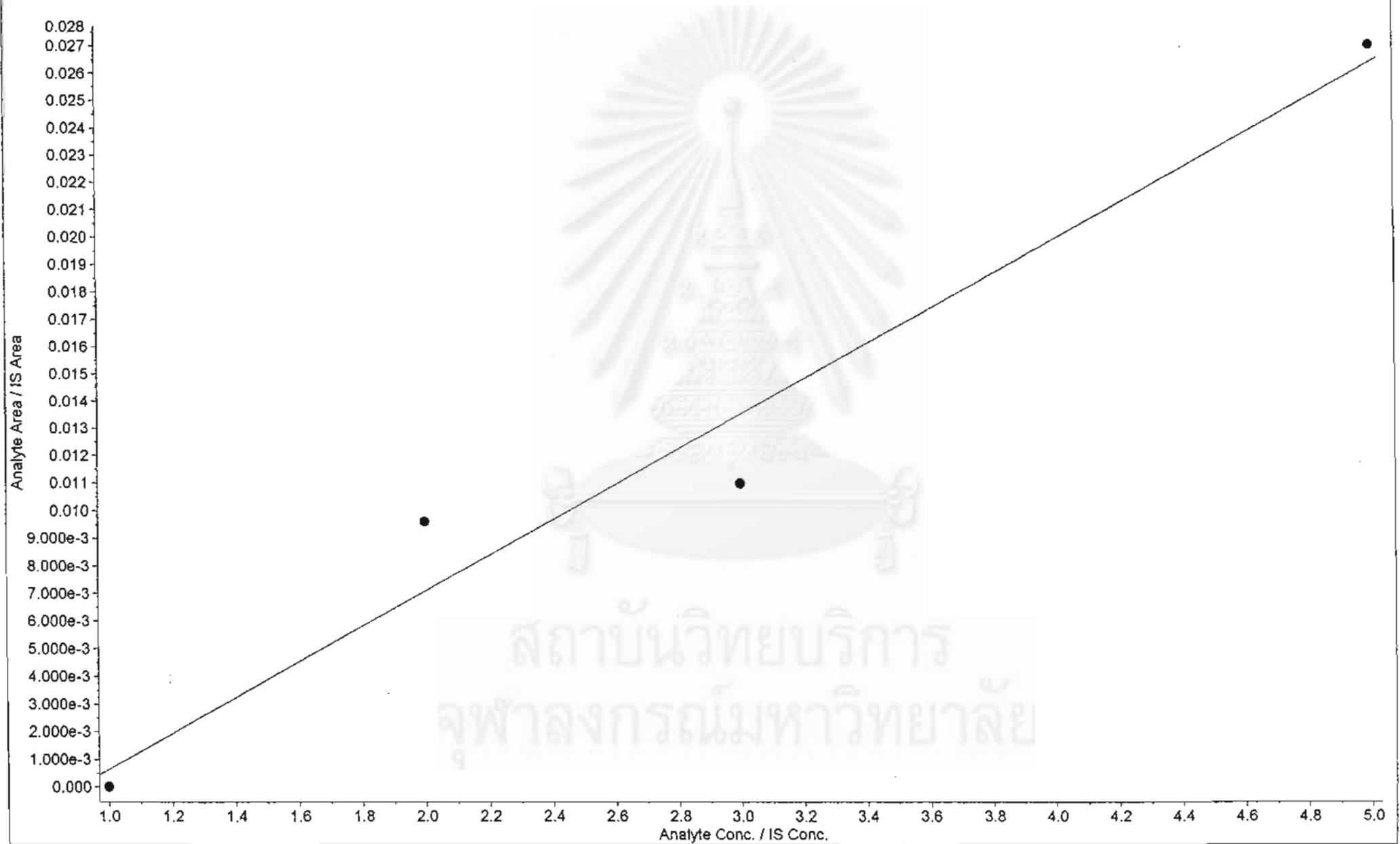
std. addn







21-07-04 validation S14 E5M STD.ADDn (LMG 331.3 / 165.4): "Linear" Regression ("No" weighting): $y = 0.00648x + -0.00585$ ($r = 0.9819$)



> K1. 1610m
 E5M

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 |

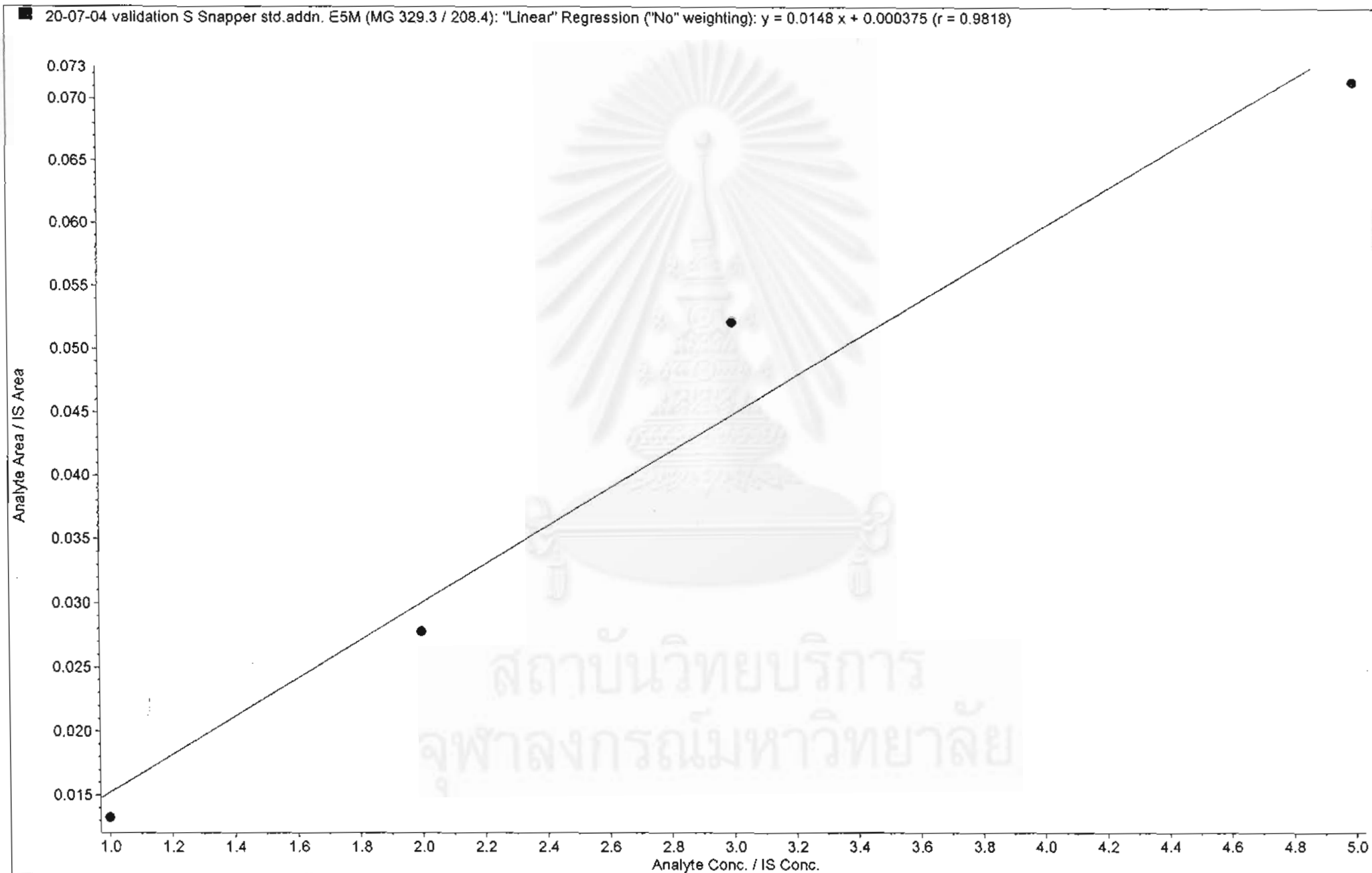
MG 329.3 / 208.4

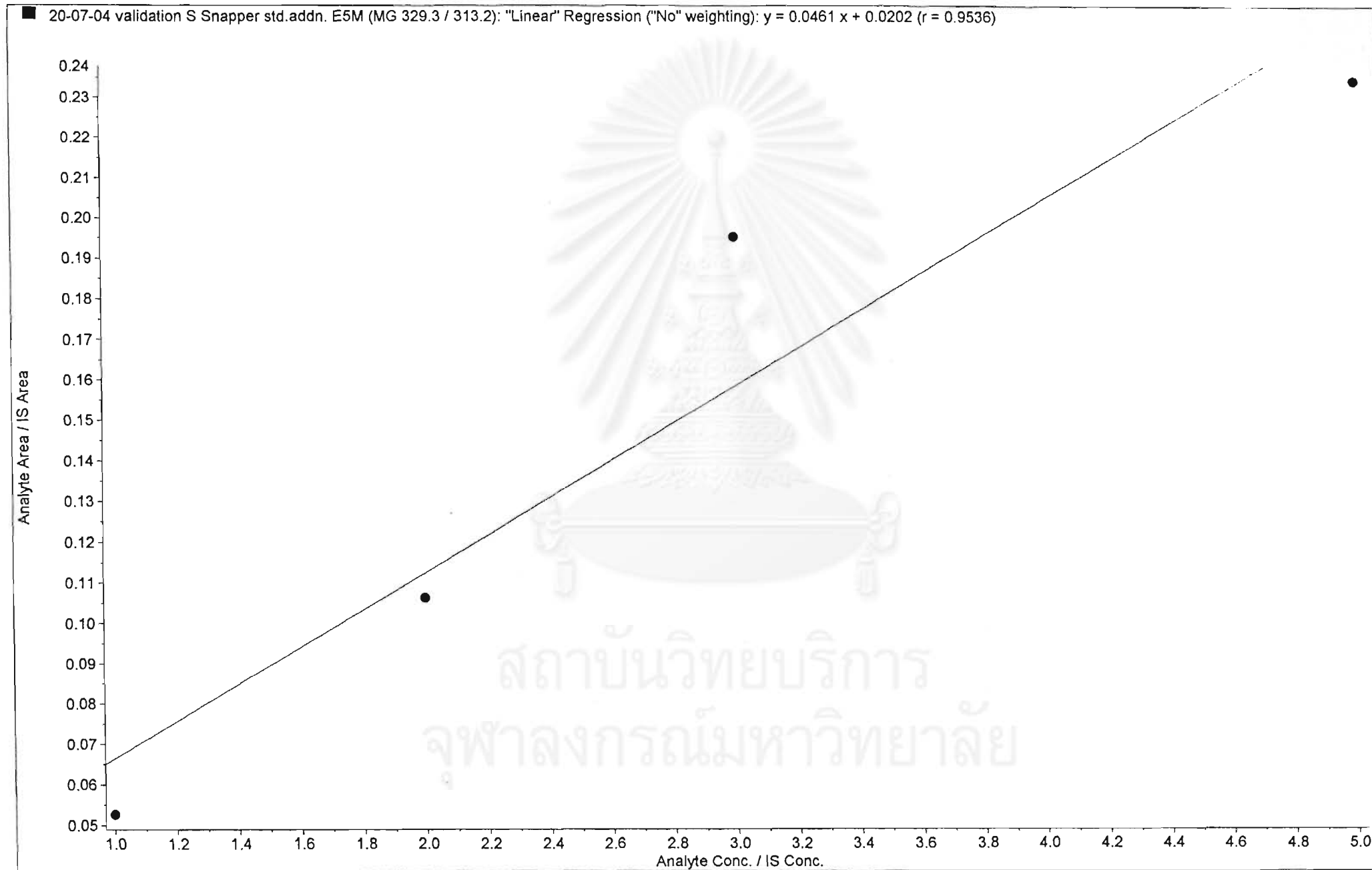
MG 329.3 / 315.2

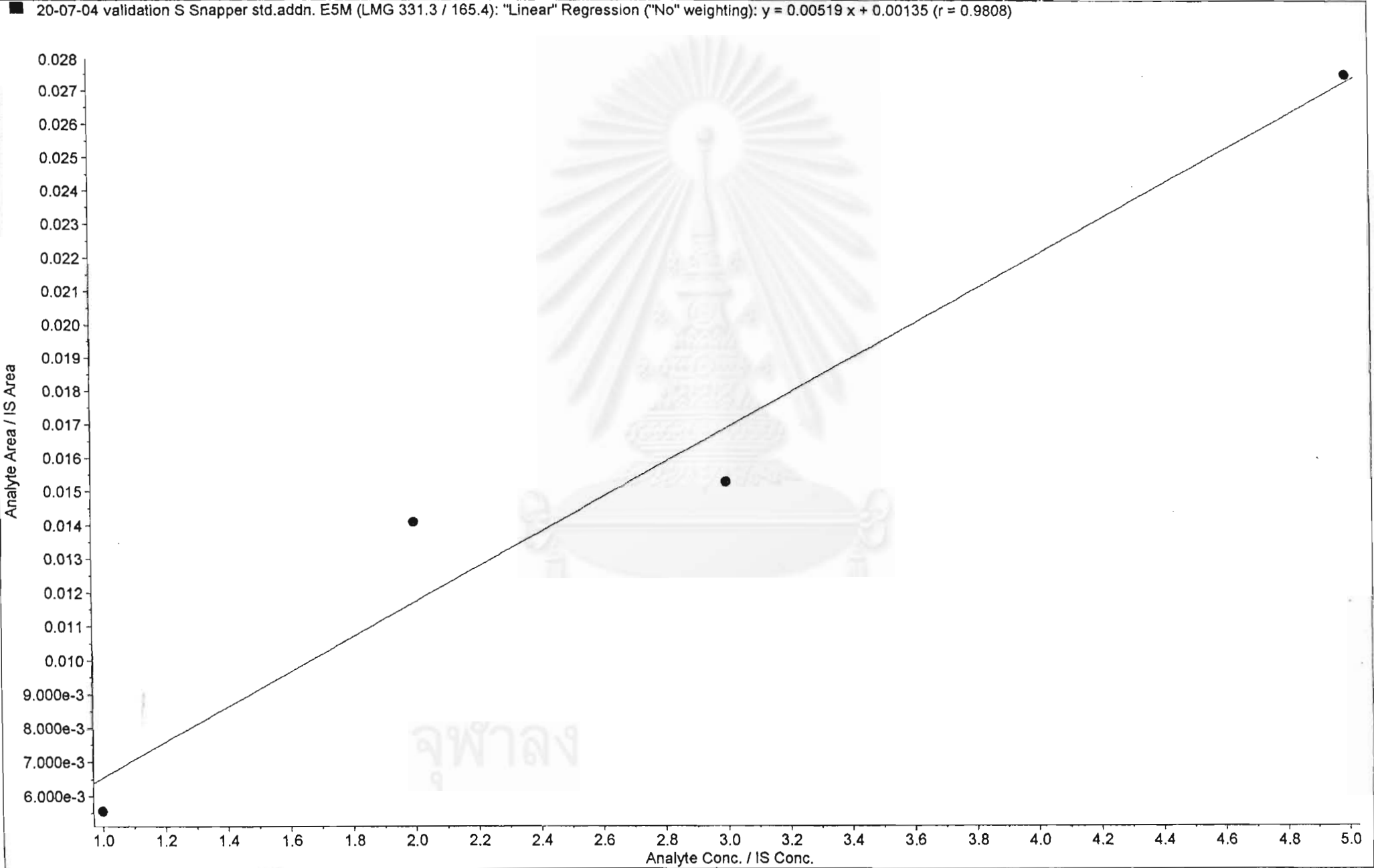
LMG 331.3 / 165.9

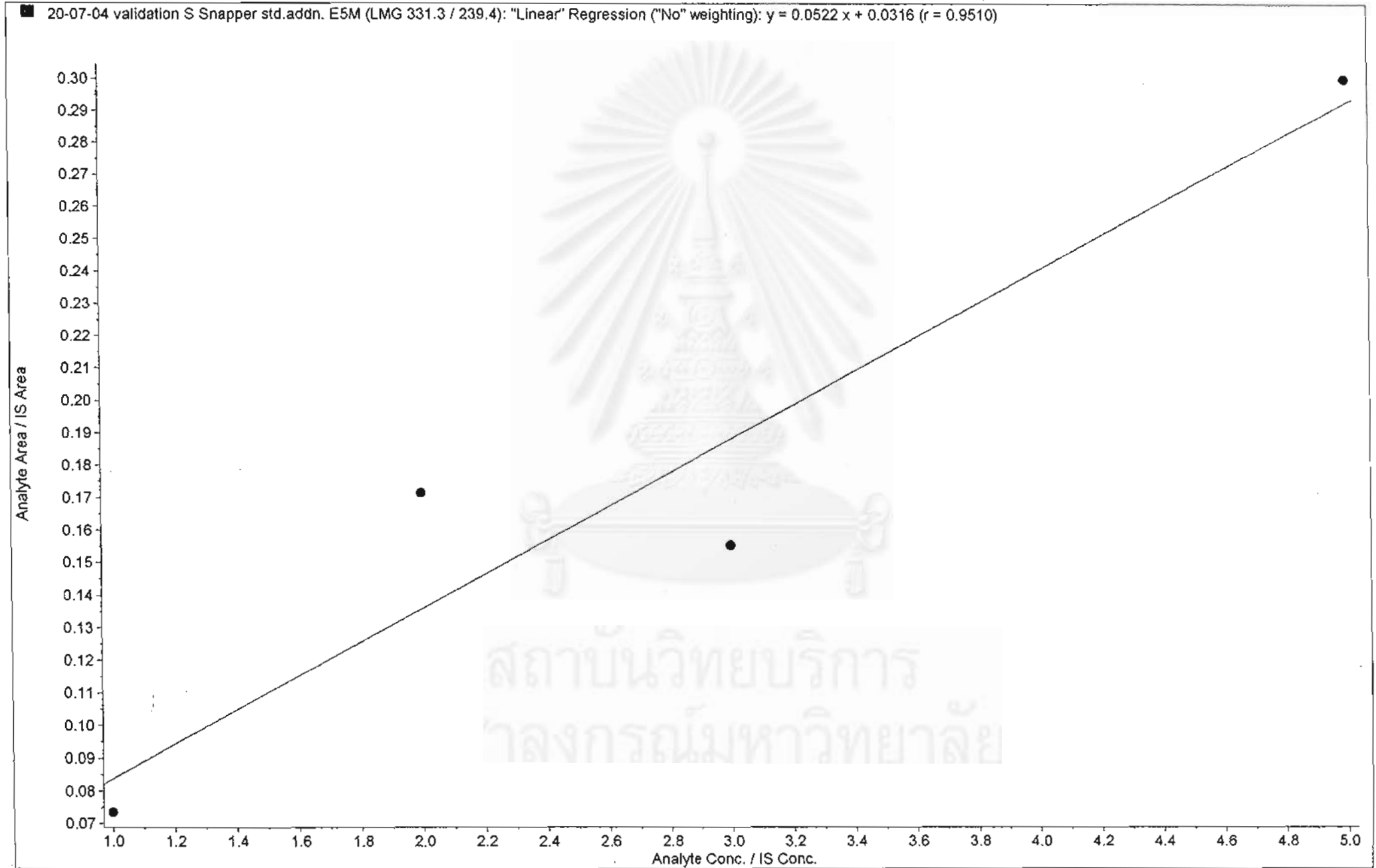
LMG 331.3 / 239.1

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



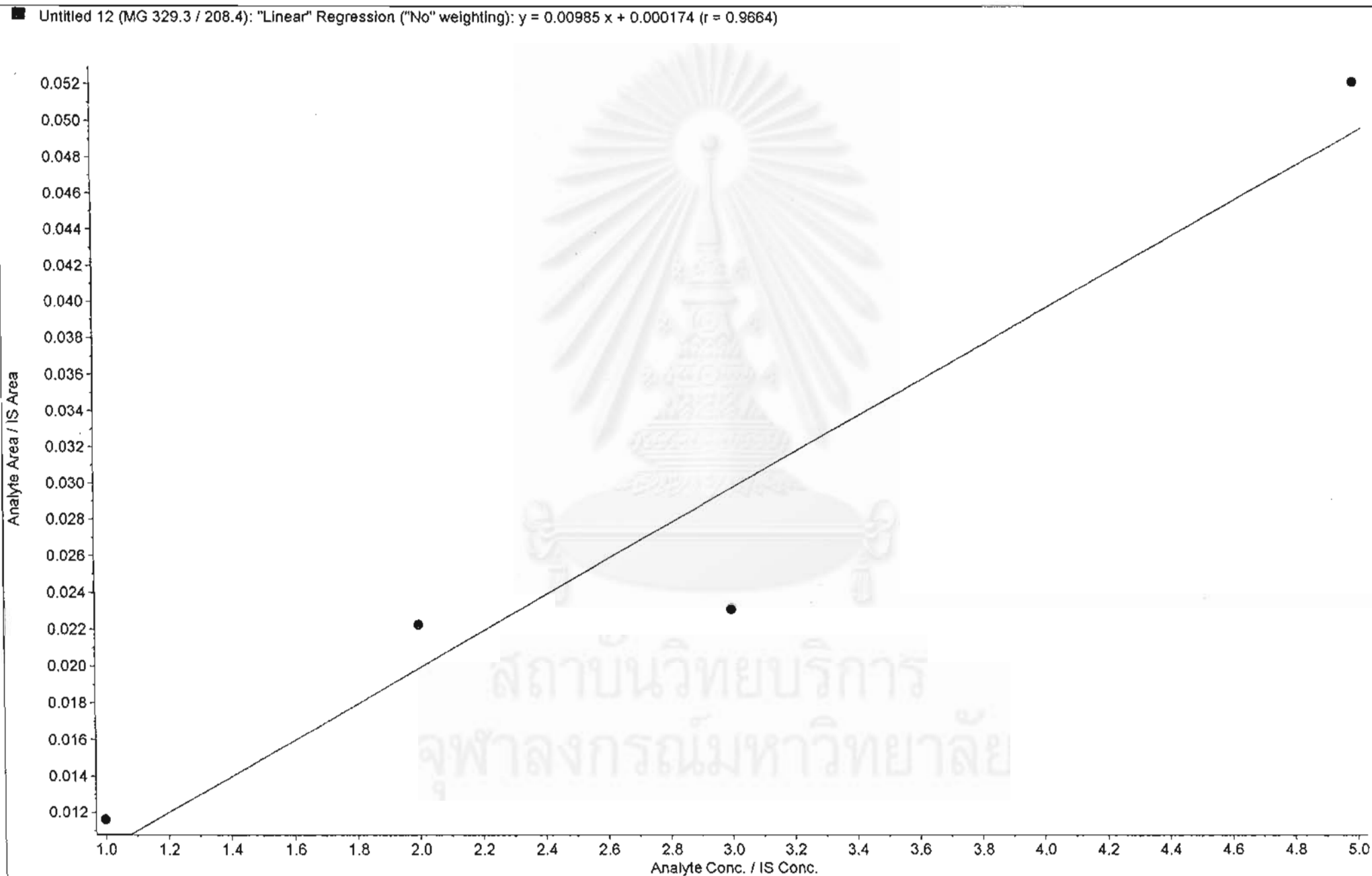


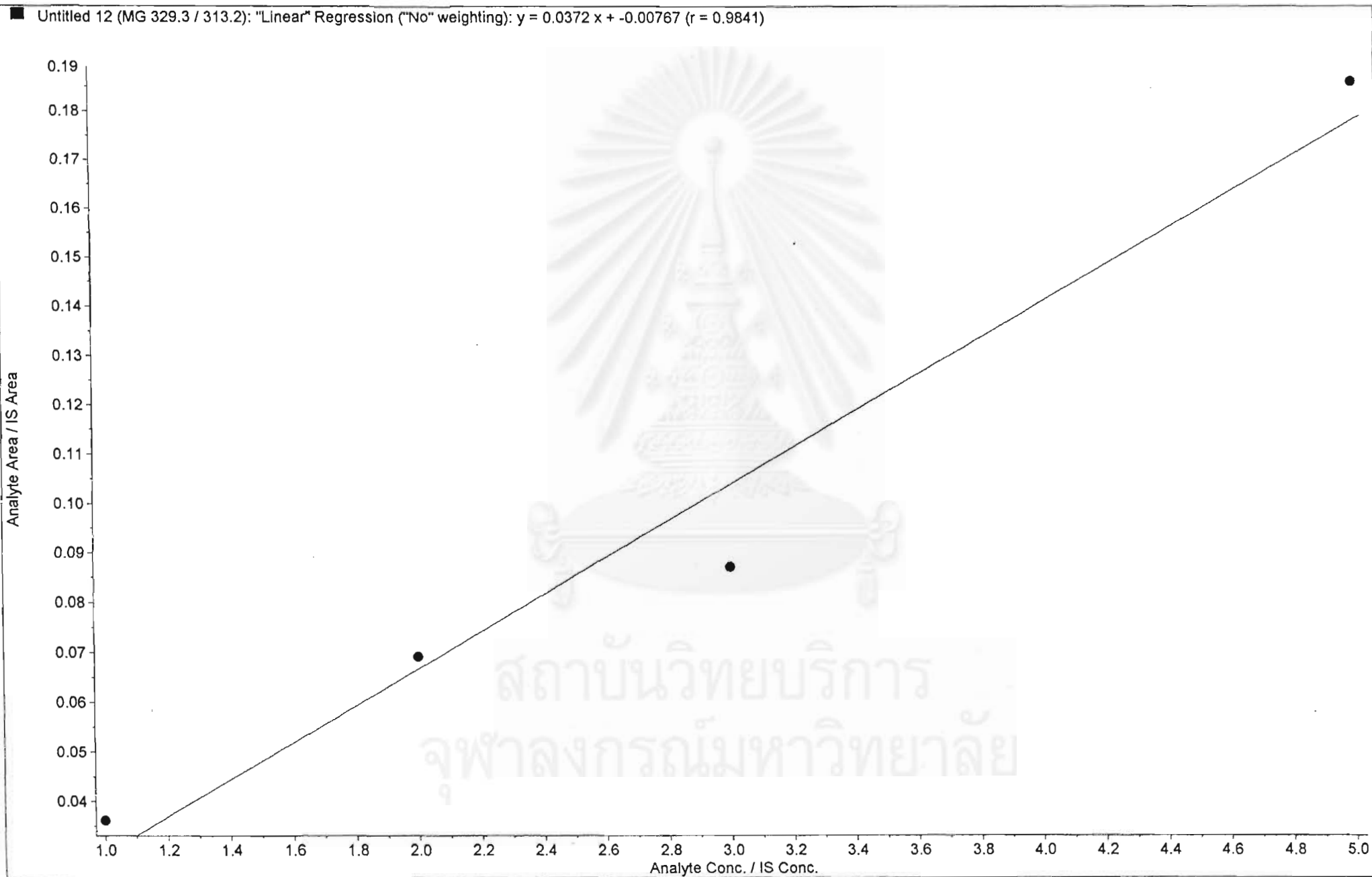


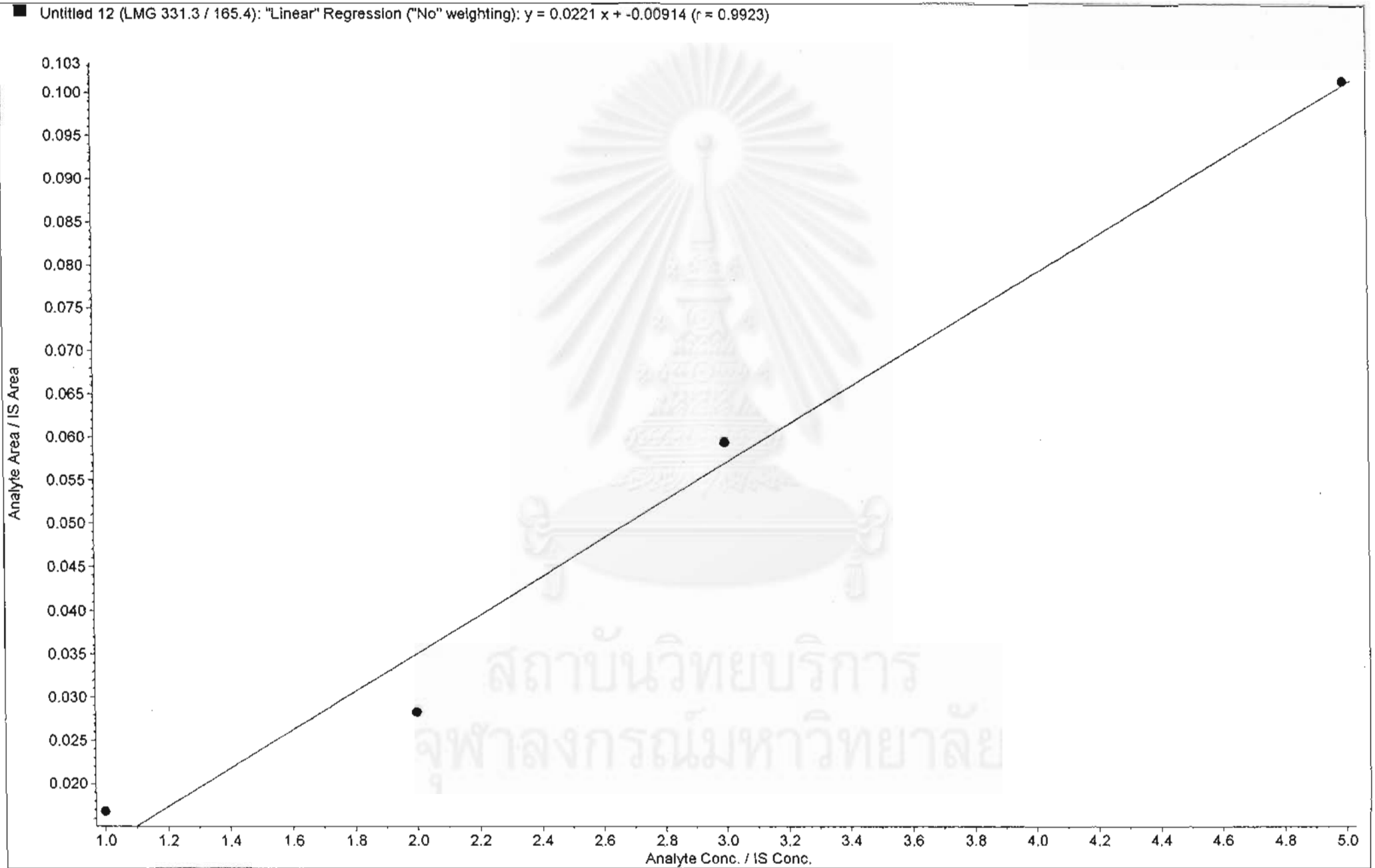


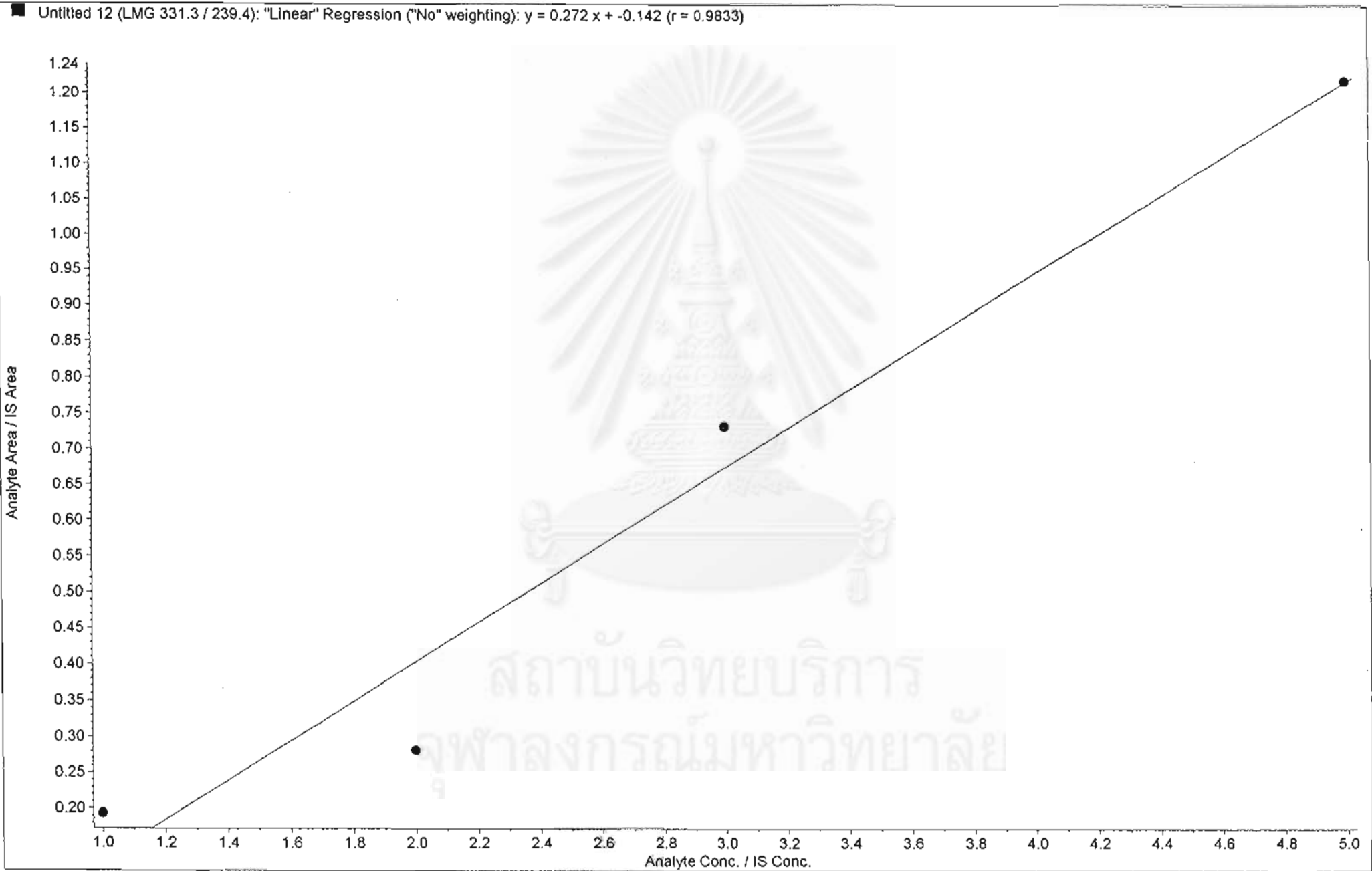
| | Sample Name | Sample Type | File Name | Analyte Peak Area (counts) | Analyte Concentration (ng/mL) | IS Peak Area (counts) | Calculated Concentration (ng/mL) | Accuracy (%) |
|----|----------------|-------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| 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. |

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย









| | 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! |

าลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ESTD

MG ES + EST

| | 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 |

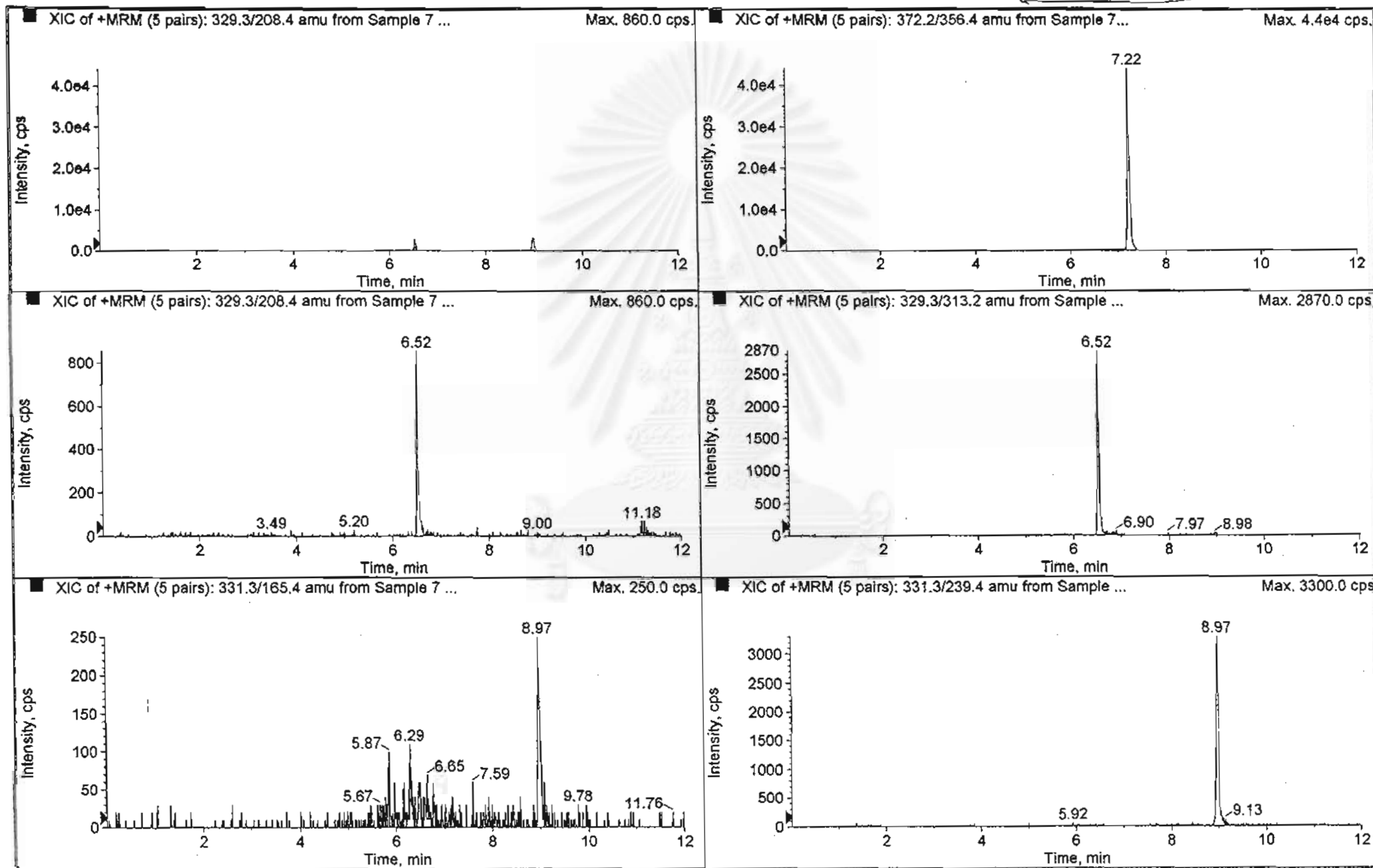
E5

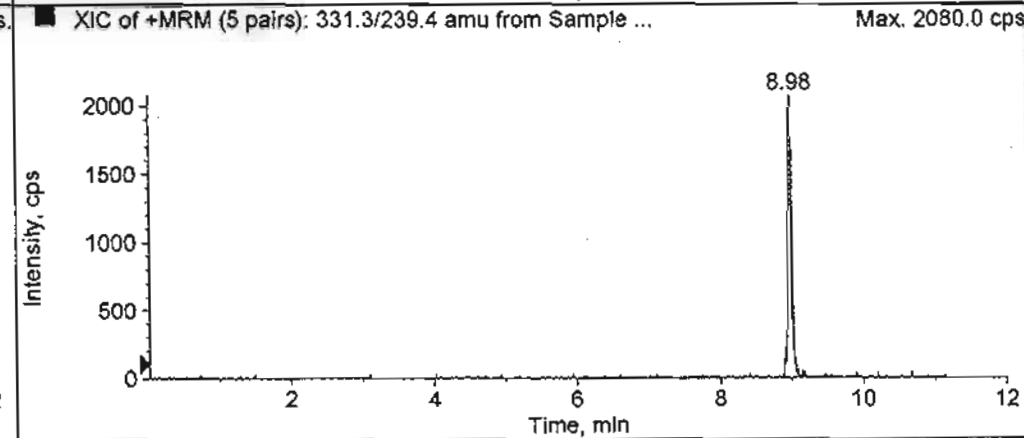
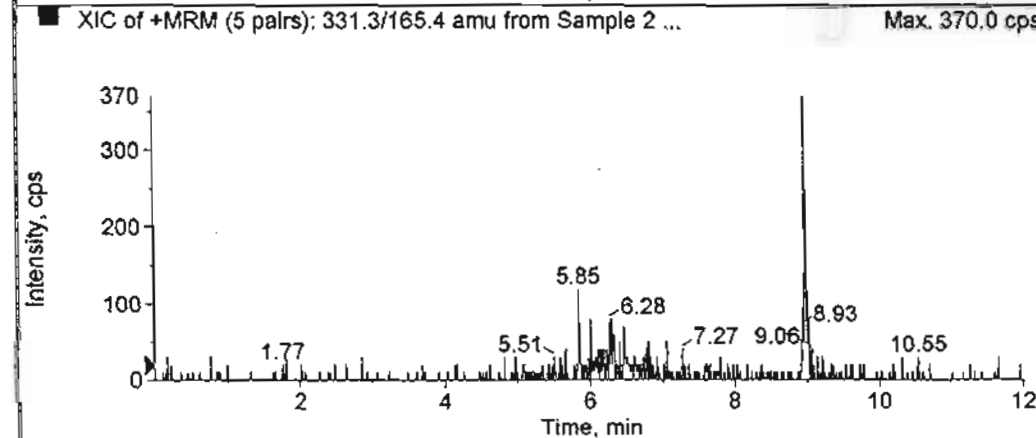
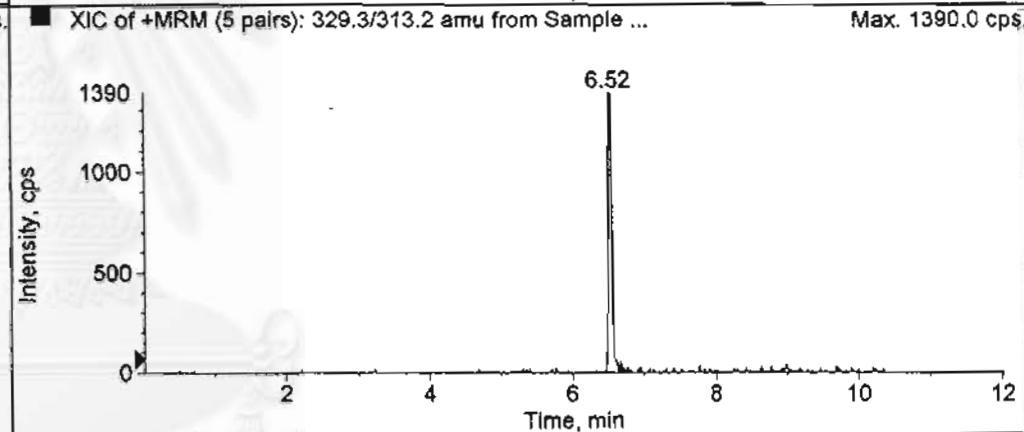
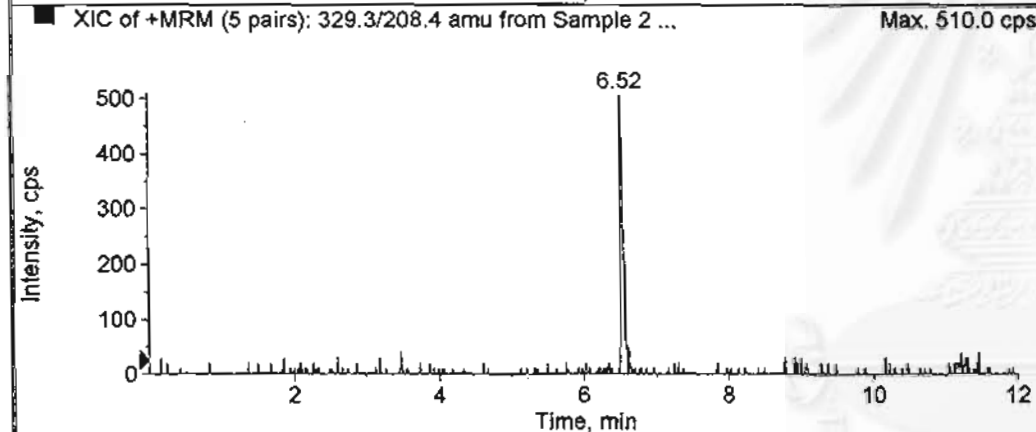
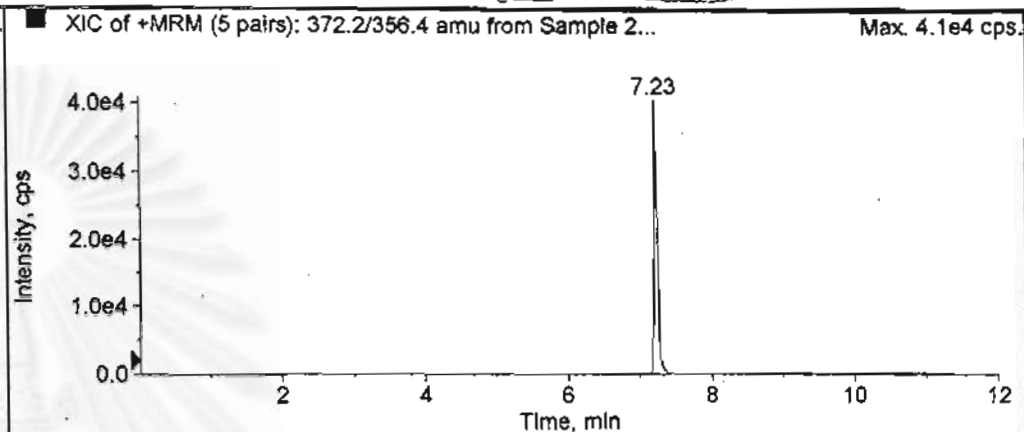
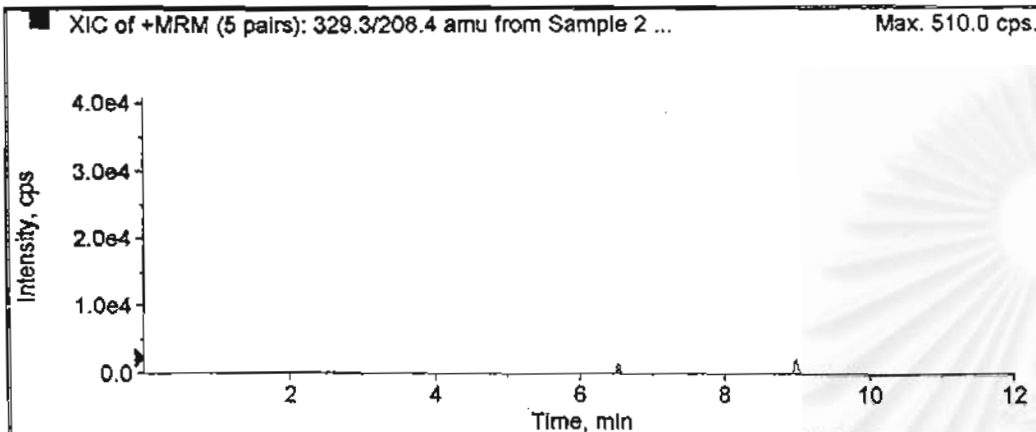
E5M

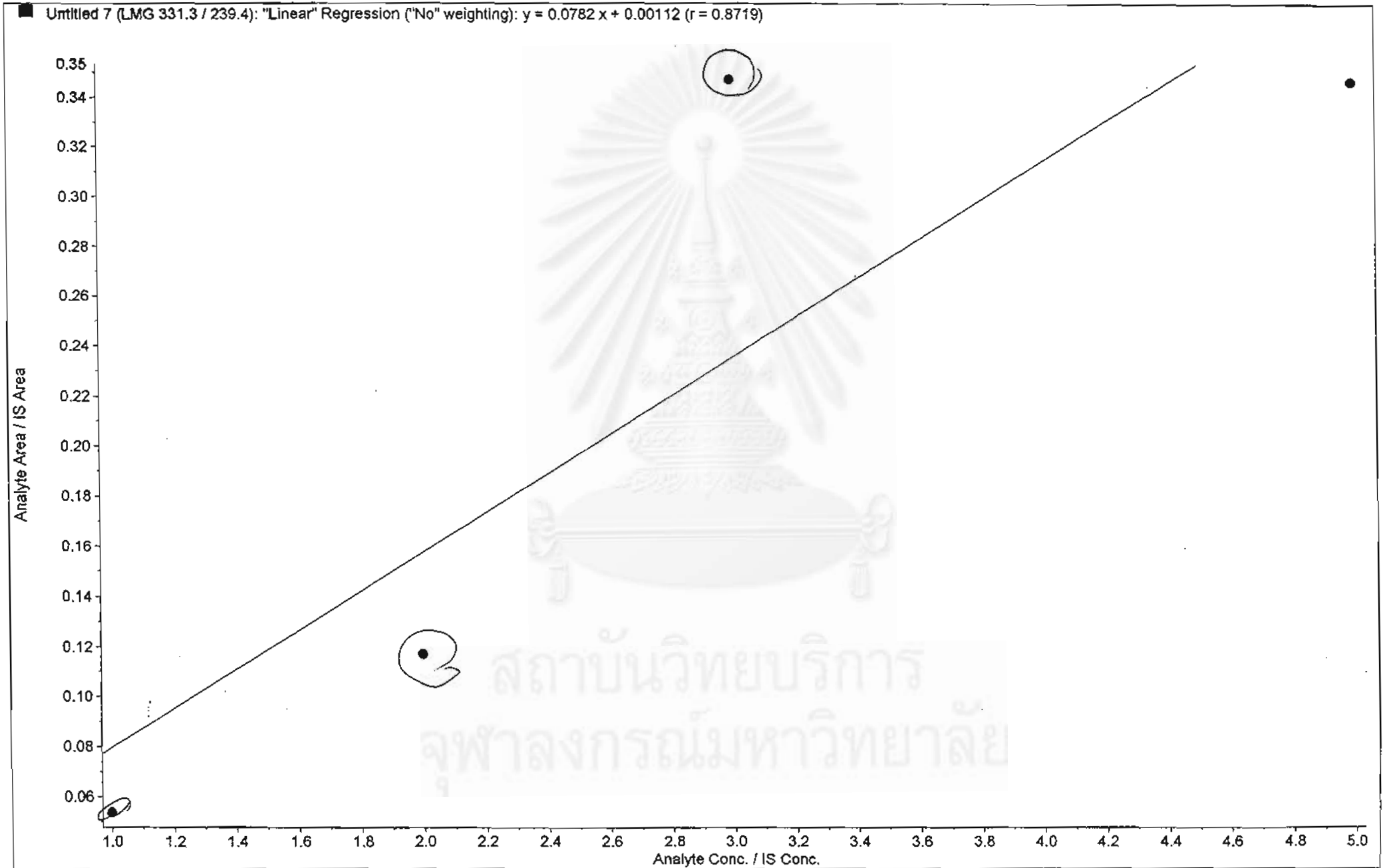
E51D

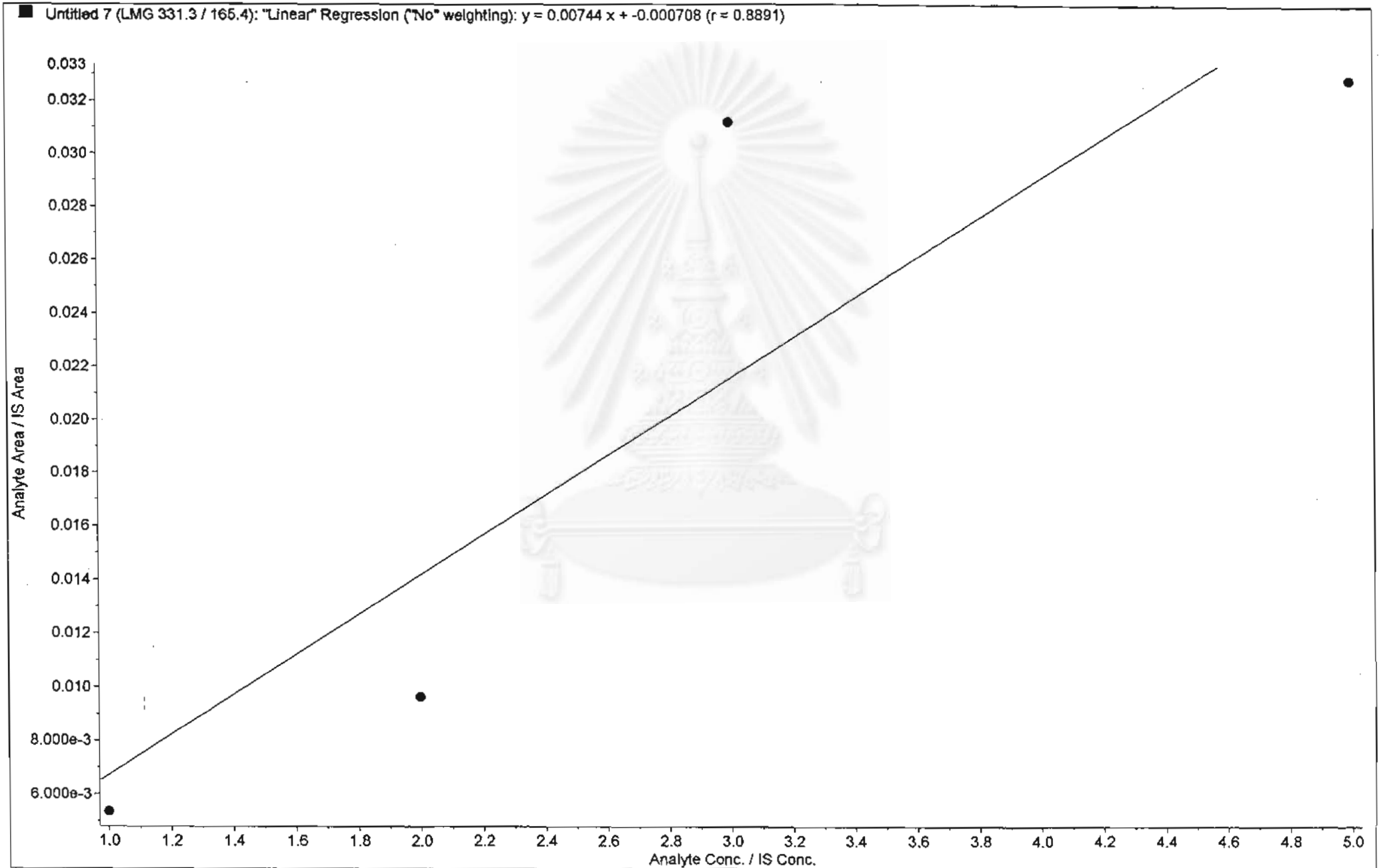
LMG E5 + E5M

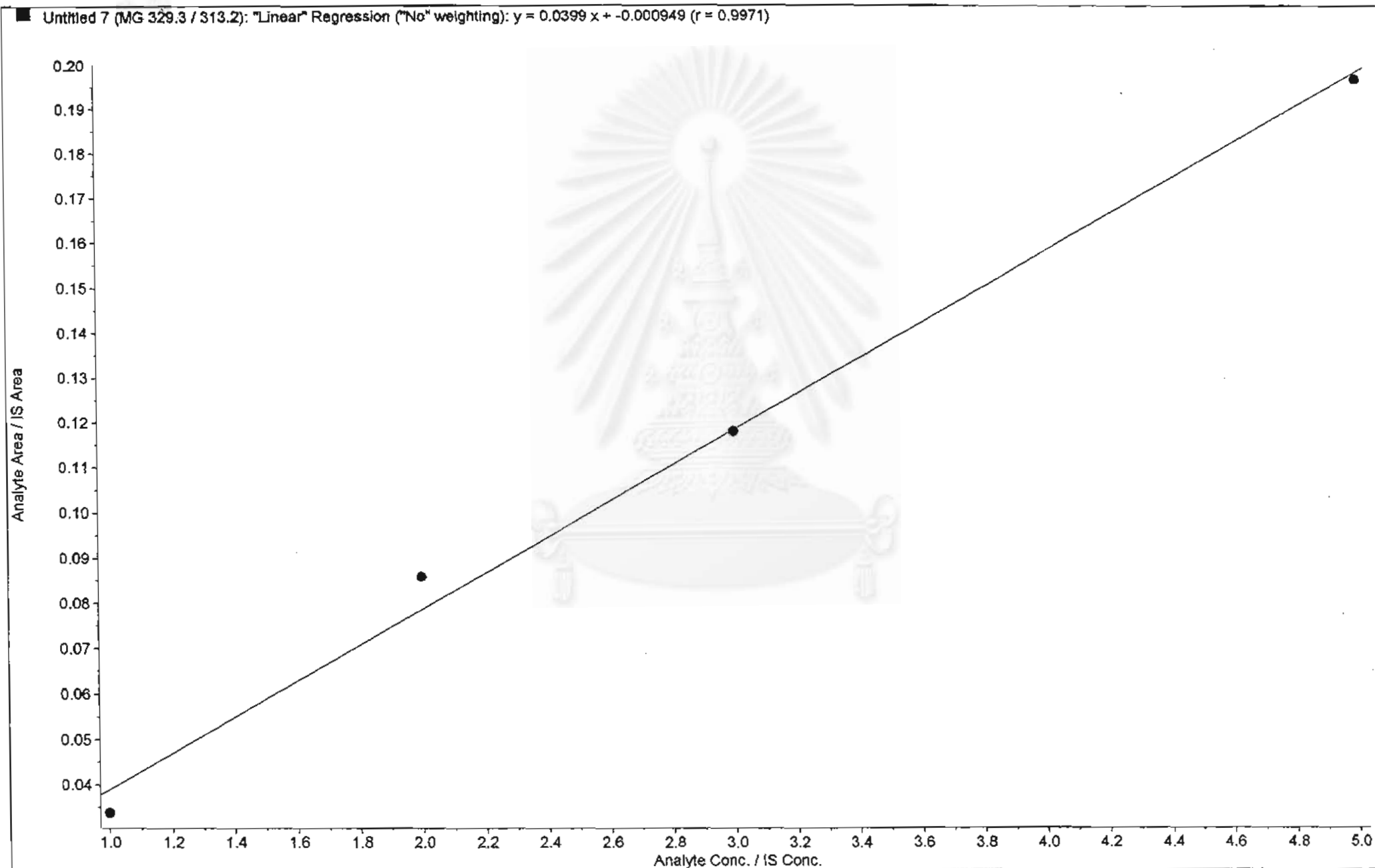
| | Sample Name | Sample Type | File Name | Analyte Peak Area (counts) | Analyte Concentration (ng/mL) | IS Peak Area (counts) | Calculated Concentration (ng/mL) | Accuracy (%) |
|----|-----------------------|----------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| 1 | 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 |

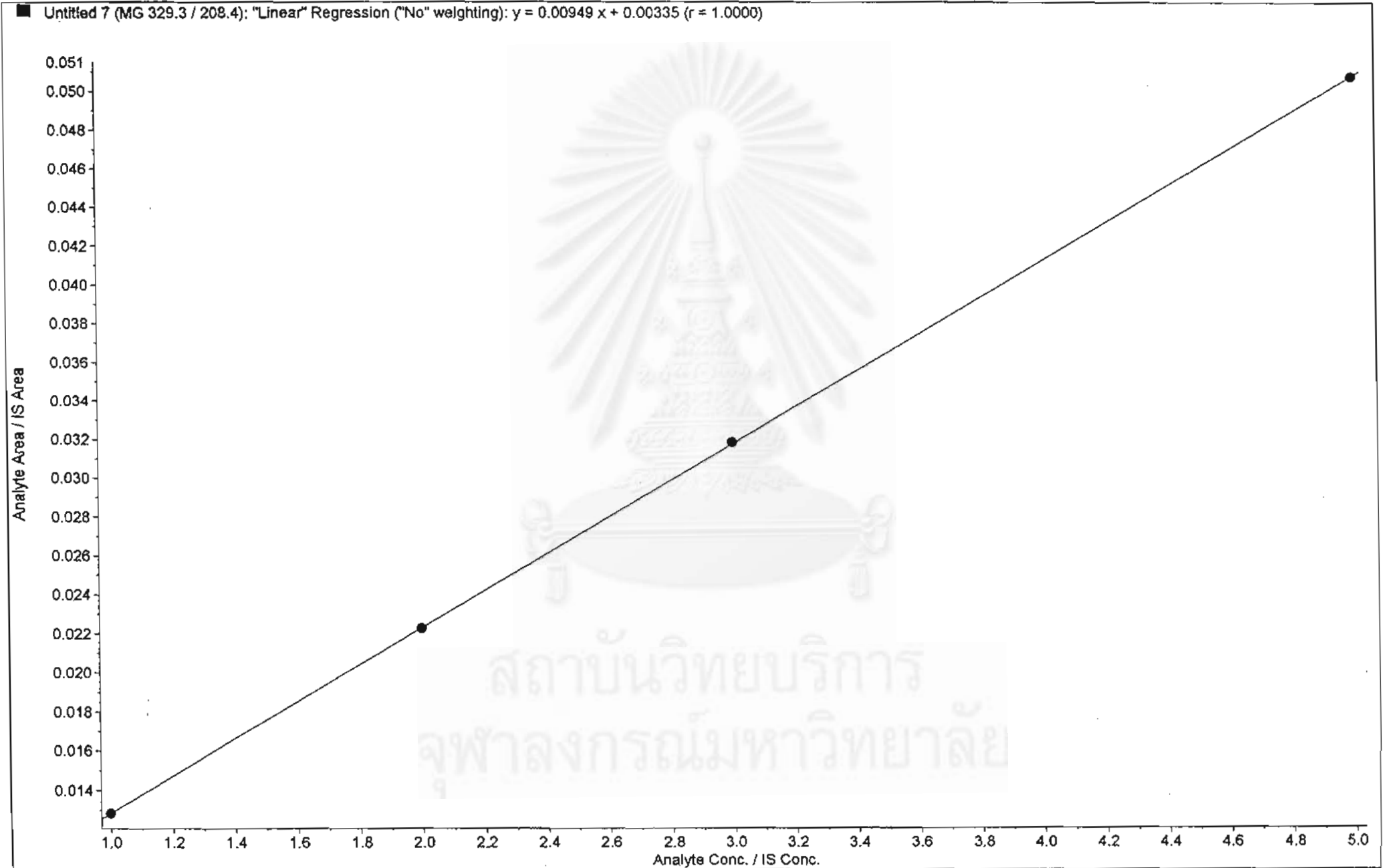












- (3) Development of a Test Kit for Insecticide Residues in Vegetables and Fruits. ทวนการ
เรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2545
- (3) การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชเพื่อหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลล ทวนการเรียน
การสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2546
- (4) การวิเคราะห์และการตัดแปรทางเคมีเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุ
เหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน ทวนอุดหนุนการวิจัยจาก
งบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2548 – 2549

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

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

- (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.*, 24 (2008) *in press*.
- (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.*, 24 (2008) *in press*.
- (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.*, 25 (2008) *in press*.

7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ

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

