

การหาปริมาณสารเมลามีนในวัสดุสัมผัสอาหาร
โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี
Quantitative analysis of melamine in food contact materials
by using high-performance liquid chromatography

จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข^{1*}, สมภพ ลาภวิบูลย์สุข¹
Jutathip Lapviboonsuk^{1*}, Sompop Lapviboonsuk¹

บทคัดย่อ

วัสดุสัมผัสอาหารประเภทเมลามีนผลิตจากเมลามีนเรซินหรือเมลามีนฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันระหว่างเมลามีนและฟอร์มัลดีไฮด์ ทำให้สารเมลามีนอาจเกิดการตกค้างที่วัสดุสัมผัสอาหารและปนเปื้อนสู่อาหารได้ สหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบ Commission Regulation (EU) No 1282/2011 จำกัดปริมาณสารเมลามีนหรือ specific migration limit (SML) คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นงานวิจัยนี้ศึกษาวิธีทดสอบสารเมลามีนที่เคลื่อนย้ายจากวัสดุสัมผัสอาหาร โดยใช้สารละลายตัวแทนอาหารเป็น กรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 3 และตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่าวิธีการทดสอบที่เหมาะสมใช้เวลาการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และจากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นในระดับความเข้มข้น 2 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดการวัดปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยค่าความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยร้อยละการคืนกลับและความเที่ยง (precision) แสดงด้วยร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (relative standard deviation %RSD) รวมทั้งค่าความไม่แน่นอน เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของวิธีทดสอบสำหรับวัสดุสัมผัสอาหาร EUR 24105 EN: 2009 นอกจากนี้ได้สุ่มตัวอย่างภาชนะบรรจุอาหารประเภทชามเมลามีนตามท้องตลาดในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครนำมาทำการทดสอบพบว่าสารเมลามีนมีค่าอยู่ระหว่าง ไม่พบ ถึง 15.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Abstract

Melamine food contact materials are produced from melamine resin or melamine-formaldehyde occurring from the polymerization reaction of melamine and formaldehyde. The residuals of melamine from FCMs can contaminate foods. European Union has issued Commission Regulation (EU) No 1282/2011 about specific migration limit (SML) of melamine (2.5 mg/kg). Therefore, this research studied the migration test method of melamine from food contact materials using 3% acetic acid and high performance - liquid chromatography (HPLC). The suitable extraction method was the use of 70 °C for 2 hours. This migration method was verified and found 2-80 mg/kg linearity range, 0.60 mg/kg limit of detection (LOD) and 2.00 mg/kg limit of quantitation (LOQ). Accuracy expressed as %recovery and precision expressed as %relative standard deviation (RSD) as well as uncertainty value conformed to the acceptable criteria of test method for food contact materials: EUR 24105 EN: 2009. Moreover, the melamine wares were collected from local markets in Bangkok, Thailand; the amounts of melamine in samples were tested and ranged from not detected to 15.3 mg/kg.

คำสำคัญ: เมลามีน, โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง, วัสดุสัมผัสอาหาร

Keywords: Melamine, High-performance liquid chromatography, Food contact materials

¹กรมวิทยาศาสตร์บริการ

*Corresponding author E-mail address : jutathip@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

เมลามีน (melamine) เป็นสารอินทรีย์เคมี CAS No. 108-78-1 มีชื่อทางเคมีว่า 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine โดยเมลามีนเป็น ไทรเมอร์ของไซยานาไมด์ (cyanamide) [1] การนำเมลามีนมาใช้ร่วมกับฟอร์มาลดีไฮด์เพื่อผลิตเมลามีนเรซินซึ่งเป็นพลาสติกชนิดที่ทนทานมากชนิดหนึ่งจึงใช้ในการผลิตเครื่องครัว และเมลามีนยังเป็น ส่วนประกอบหลักของสารสีเหลือง 150 (Pigment Yellow 150) ที่ ใช้ทำหมึกพิมพ์และพลาสติก ซึ่งโดยทั่วไปเมลามีนเป็นสารประกอบ ที่ไม่มีพิษเมื่อพบในปริมาณน้อย แต่เมลามีนจะมีพิษสูงเมื่อจับตัวกับ กรดไซยานูริก (cyanuric acid) เกิดเป็นเมลามีนไซยานูเรต ซึ่งเป็น ผลึกที่ไม่ละลายน้ำ ก้อนผลึกเล็กๆ นี้จะอุดตันท่อในไต ส่งผลให้เกิด นิ่วในไตทำให้ไม่สามารถผลิตปัสสาวะได้ ก่อให้เกิดมะเร็งที่กระเพาะ ปัสสาวะ ทำลายระบบสืบพันธุ์ และทำให้ไตวายเฉียบพลันเป็นผลให้ เกิดการเสียชีวิตได้ [2-6]

องค์การอนามัยโลกได้กำหนดค่า Tolerable Daily Intake (TDI) หรือค่าปนเปื้อนสูงสุดที่ร่างกายได้รับต่อวันโดยไม่ทำให้เกิด อันตรายต่อสุขภาพของเมลามีนที่ 0.20 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน (WHO, 2009) ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนด ค่า TDI ที่ 0.63 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และสหภาพ ยุโรปกำหนดค่า TDI ที่ 0.50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน นอกจากนี้สหภาพยุโรปได้แก้ไขกฎระเบียบเกี่ยวกับการใช้สาร เมลามีนให้สอดคล้องกับค่า TDI ดังกล่าว โดยสหภาพยุโรปได้ออก กฎระเบียบ Commission Regulation (EU) No 1282/2011 ลง วันที่ 28 พฤศจิกายน 2554 แก้ไข Commission Regulation (EU) No. 10/2011 เรื่องกฎระเบียบว่าด้วยวัสดุพลาสติกและบรรจุภัณฑ์ ที่สัมผัสอาหาร ว่าด้วยการลดข้อจำกัดการใช้สารวัสดุสัมผัสอาหาร หมายเลข 239 ชื่อ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (เมลามีน) โดยลด ค่า specific migration limit (SML) หรือค่าสูงสุดที่อนุญาตให้อาหาร สัมผัสเมลามีนได้ จาก 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม (2.5 mg/kg food) โดยมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 30 ธันวาคม 2554 จากการออกกฎระเบียบดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำคัญ ของอันตรายจากสารเมลามีนและส่งผลกระทบต่อผู้ส่งออกภาชนะ บรรจุอาหารชนิดเมลามีนที่จะต้องผลิตสินค้าให้ได้ตามกฎระเบียบ นี้ สำหรับประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนสาร เมลามีนในวัสดุสัมผัสอาหาร โดยมีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อน ของสารเมลามีนและสารในกลุ่มเมลามีน (กรดไซยานูริก) ในอาหาร ของประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 344) พ.ศ. 2555 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย โดย กำหนดให้นมตัดแปลงสำหรับทารก นมตัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับ ทารกและเด็กเล็ก อาหารทารก อาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและ

เด็กเล็ก และอาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม และอาหารอื่นๆ ไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

การตรวจหาปริมาณสารเมลามีนมีหลายเทคนิค เช่น เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [1], [7] เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) [3], [8], [1] เทคนิคแก๊ส โครมาโทกราฟีกับแมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) [3], [1] และเทคนิคลิควิดโครมาโท กราฟีควบคู่ไปกับแมสสเปกโตรเมทรี (liquid chromatography coupled with mass spectrometry, LC-MS/MS) [3], [1], [9] โดย เทคนิค HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป ซึ่งประเทศอังกฤษได้ร่าง มาตรฐานการทดสอบปริมาณเมลามีนคือ DD CEN/TS 13130-27: 2005 ระบุวิธีการเตรียมตัวอย่างตาม EN 13130-1 ที่ให้แนวทางใน การเลือกสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ โดยไม่ได้ระบุเฉพาะเจาะจงสำหรับการทดสอบวัสดุสัมผัสอาหารประเภทเมลามีน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ สารเมลามีนในวัสดุสัมผัสอาหารประเภทเมลามีน

สำหรับในประเทศไทยนั้นมีการใช้ภาชนะเมลามีนเป็นจำนวนมาก เพื่อบรรจุอาหารหลากหลายประเภท อาทิเช่น ก๋วยเตี๋ยว ข้าว แกงต่างๆ ดังนั้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่ต้องดูแลและคุ้มครอง ความปลอดภัยของผู้บริโภค และเพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพของกรม วิทยาศาสตร์บริการในการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของศูนย์ทดสอบ ด้านวัสดุสัมผัสอาหารของอาเซียน รวมถึงการออกไปรับรองสินค้า สำหรับผู้ประกอบการเพื่อการส่งออก โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ จึงศึกษาวิธีการหาปริมาณสารเมลามีน ในวัสดุสัมผัสอาหารโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโท กราฟี

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electronic analytical balance) ชั่ง ได้ละเอียด 0.00001 กรัม ยี่ห้อ Mettler รุ่น XP 205 DR
- 2.1.2 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Waters รุ่น Alliance e2695 และ คอลัมน์ HPLC ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Spherisorb NH₂ ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร
- 2.1.3 ตู้อบ (oven) ยี่ห้อ BINDER รุ่น FED115
- 2.1.4 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (deionizer)
- 2.1.5 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมแผ่นเมมเบรน (membrane filter) ชนิดไนลอน ขนาด 47 มิลลิเมตร 0.20 ไมโครเมตร

- 2.1.6 ตัวกรอง (syringe filter) ชนิด MCM หรือ cellulose acetate ขนาด 13 มิลลิเมตร 0.20 ไมโครเมตร หรือตัวกรองชนิดอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน
- 2.1.7 หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร
- 2.1.8 ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 2.1.9 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีเปตต์ ขวดแก้วปริมาตร ขวดแก้วปริมาตรทรงกรวย หลอดแก้วมีจุกปิด (headspace tube) ปีกเกอร์ และกระบอกตวงขนาดต่างๆ
- 2.1.10 อ่างน้ำอัลตราโซนิก (ultrasonic water-bath)
- 2.1.11 อะลูมิเนียมฟอยล์

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 อะซิโตรไนไตรล์ ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ HPLC
- 2.2.2 ไอโซโพรพานอล
- 2.2.3 น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่าความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ•cm
- 2.2.4 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟสโมโนไฮเดรต
- 2.2.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์
- 2.2.6 สารมาตรฐานเมลามีน ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99.0
- 2.2.7 กรดเกลือเชียวลอะซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 100 ชั้นคุณภาพวิเคราะห์

2.3 วัสดุตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เป็นภาชนะบรรจุอาหารประเภทเมลามีน ที่ปราศจากสารเมลามีน

2.4 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างก่อนทำการทดสอบจะต้องล้างทำความสะอาดตามวิธีการใช้ที่ระบุ แล้วทำการสกัดเมลามีนจากภาชนะตัวอย่างด้วยสารละลายตัวแทนอาหาร โดยเติมกรดอะซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ข้อ 2.2.7) ลงในภาชนะสัมผัสอาหารต่ำกว่าขอบภาชนะ 0.50 เซนติเมตร แล้วปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยสกัดจำนวน 3 ครั้ง และการสกัดครั้งที่ 3 ให้ปีเปตต์สารละลายตัวแทนอาหาร จำนวน 1 มิลลิลิตร กรองผ่านตัวกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (ข้อ 2.1.6) ลงในขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2.5 การเตรียมตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample)

ตัวอย่างภาชนะบรรจุอาหาร เติมสารละลายมาตรฐานเมลามีนที่เตรียมในสารละลายกรดอะซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ข้อ 2.2.7) ที่ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงในตัวอย่าง โดยคำนวณความเข้มข้นตามปริมาตรของสารละลายตัวแทนอาหารที่เติม แล้วนำมาทดสอบตามข้อ 2.4

2.6 การตรวจวัดปริมาณโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ความเข้มข้นของสารเมลามีนคำนวณจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหารที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะเครื่อง HPLC ที่เหมาะสมในการทดสอบตาม DD CEN/TS 13130-27:2005 Materials and articles in contact with foodstuffs: Plastics substances subject to limitation, Part 27: Determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine in food simulants ดังนี้

คอลัมน์: ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตรและการ์ดคอลัมน์ บรรจุด้วย Spherisorb NH₂ ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Waters

อุณหภูมิคอลัมน์: 40 องศาเซลเซียส

วัฏภาคเคลื่อนที่: อะซิโตรไนไตรล์ : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5 (75 : 25)

อัตราการไหล: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรที่ฉีด: 20 ไมโครลิตร

เครื่องตรวจวัด: เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี (UV detector); ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

2.7 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

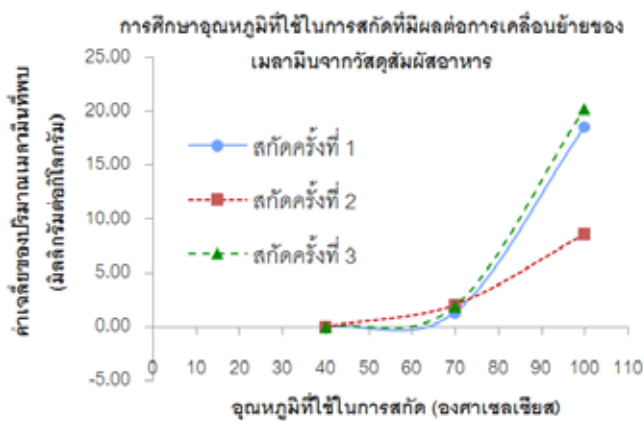
วิธีที่ศึกษาดำเนินการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทาง EUR 24105 EN: 2009 โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ ความเป็นเส้นตรง ชัดจำกัดการตรวจพบและชัดเจนจำกัดการวัดปริมาณ ความแม่นยำและความเที่ยง และประเมินความไม่แน่นอนของการวัด โดยมีรายละเอียดตามที่ระบุในข้อ 3.2

3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 การศึกษาความเหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างที่มีการผลิตคราวเดียวกับภาชนะบรรจุอาหารประเภทชามเมลามีนที่ตรวจพบการเคลื่อนย้ายของสารเมลามีนและทดสอบด้วยสารละลายตัวแทนอาหารคือ สารละลายกรดอะซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากสารเมลามีนมีการเคลื่อนย้ายออกมาสู่สารละลายตัวแทนอาหาร (food simulant) ชนิดนี้ได้มากที่สุดหรือเรียกว่า worst case โดยได้มีงานวิจัยศึกษาเปรียบเทียบกับชนิดของสารละลายตัวแทนอาหารกับการเคลื่อนย้ายของสารเมลามีน เช่น เอทานอลร้อยละ 15 เอทานอลร้อยละ 50 น้ำมันมะกอก น้ำกลั่นและกรดแอสซิดิกร้อยละ 3 พบว่า กรดแอสซิดิกร้อยละ 3 มี

การเคลื่อนย้ายของสารเมลามีนมากที่สุด [10-12] ซึ่งทำการศึกษา แบ่งเป็น 3 ปัจจัย ดังนี้

3.1.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ศึกษาที่อุณหภูมิ 40 70 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัดที่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง พบว่า เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่มีการเคลื่อนย้ายของสารเมลามีนจาก วัสดุสัมผัสอาหารไปสู่กรดแอสติค ร้อยละ 3 (สารละลาย ตัวแทนอาหาร) และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่า การสกัดครั้งที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 1.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าต่ำที่สุด แต่การสกัดครั้งที่ 2 (2.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และ 3 (1.92 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่า ในการสกัด แต่ละครั้งของวัสดุสัมผัสอาหาร มีค่าแตกต่างกัน โดยการ สกัดครั้งที่ 1 พบปริมาณเมลามีนเฉลี่ย 18.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, การสกัดครั้งที่ 2 พบปริมาณเมลามีนเฉลี่ย 8.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการสกัดครั้งที่ 3 พบปริมาณ เมลามีน 20.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



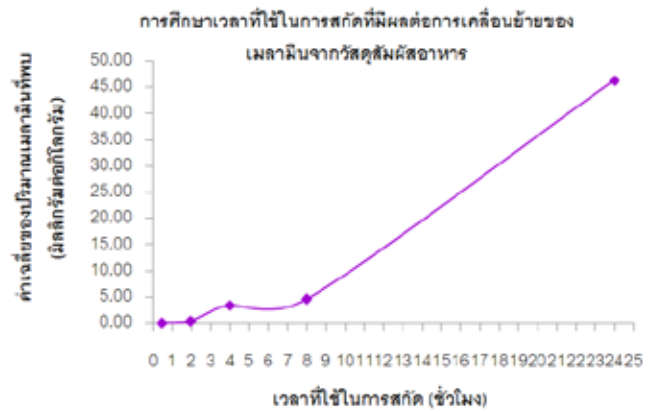
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ 40 70 และ 100 องศาเซลเซียสกับปริมาณ เมลามีนที่เคลื่อนย้ายจากวัสดุสัมผัสอาหาร

จากรูปที่ 1 พบว่า ในการสกัดเมลามีนจากภาชนะสัมผัสอาหาร ทั้ง 3 ครั้ง มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่พบปริมาณของเมลามีนในกรดแอสติค ร้อยละ 3 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายกรดแอสติค ร้อยละ 3 ให้สูงขึ้นเป็น 70 และ 100 องศาเซลเซียส พบปริมาณของเมลามีนในสารละลายกรดแอสติค ร้อยละ 3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบปริมาณเมลามีนในกรดแอสติค ร้อยละ 3 มากที่สุด แสดงว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเคลื่อนย้ายของสารเมลามีน แต่เนื่องจากค่าการทำซ้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีค่าไม่เป็นที่น่าเชื่อถือ จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สำหรับการ

ทดสอบภาชนะ จึงเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับการใช้งานจริงของผู้บริโภคมากกว่าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

3.1.2 เวลาที่ใช้ในการสกัด ศึกษาโดยสกัดเมลามีนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 0.5 2 4 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เวลาที่ใช้ในการสกัดเมลามีนจากวัสดุสัมผัสอาหาร 0.5 ชั่วโมง ไม่พบปริมาณเมลามีน โดยเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็น 2 4 8 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเมลามีนที่ตรวจพบ ดังนี้ เวลาที่ใช้ในการสกัด 2 ชั่วโมง พบปริมาณเมลามีน 0.43 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, เวลา 4 ชั่วโมง พบปริมาณเมลามีน 3.41 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, เวลา 8 ชั่วโมง พบปริมาณเมลามีน 4.54 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณเมลามีน 46.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

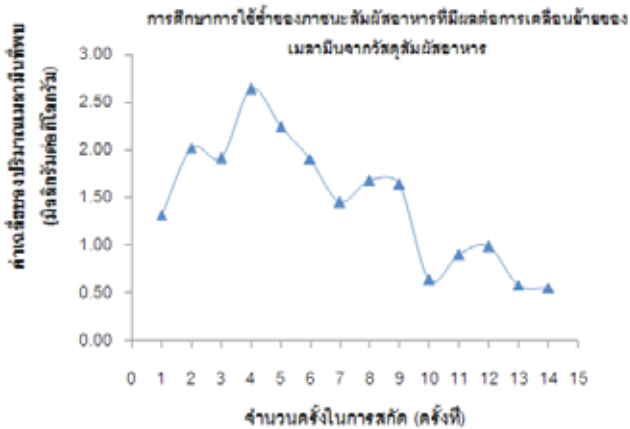


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของเวลาที่ใช้ในการสกัด 0.5 2 4 8 และ 24 ชั่วโมง ส่งผลต่อการเคลื่อนย้ายของเมลามีน จากวัสดุสัมผัสอาหาร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคงที่ที่ 70 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 2 แสดงผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 0.5 2 4 8 และ 24 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อการเคลื่อนย้ายของเมลามีนจากวัสดุสัมผัสอาหาร โดยให้อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคงที่ที่ 70 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อใช้เวลาในการสกัดเมลามีนจากภาชนะสัมผัสอาหารมากขึ้น จะพบปริมาณเมลามีนในกรดแอสติค ร้อยละ 3 เพิ่มขึ้น แสดงว่า เวลาที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อการเคลื่อนย้ายของเมลามีน โดยถ้าอาหารสัมผัสกับวัสดุสัมผัสอาหารประเภทเมลามีนเป็นเวลานาน สารเมลามีนสามารถที่จะเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนกับอาหารได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น แต่โดยปกติระยะเวลาการใช้งานภาชนะประเภทเมลามีนจะสัมผัสอาหารที่ร้อนๆ เพียงช่วงระยะเวลาสั้นๆ ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบควรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.1.3 ศึกษาการใช้ซ้ำของวัสดุสัมผัสอาหาร โดยสกัดตัวอย่างซ้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า เมื่อนำวัสดุสัมผัสอาหารไปสกัดซ้ำๆ เพื่อศึกษาการนำ

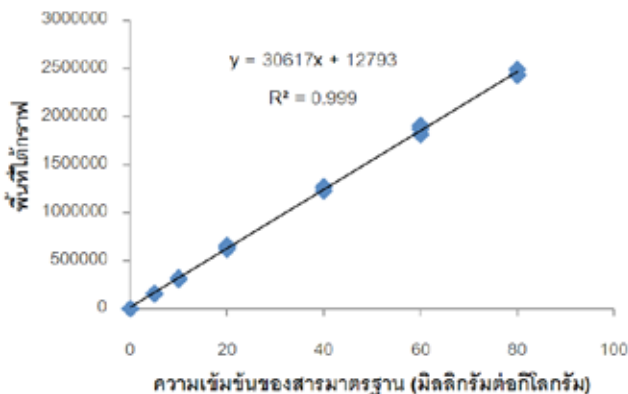
ภาชนะนั้นไปใช้ซ้ำว่าจะมีผลอย่างไรต่อการเคลื่อนย้ายของสารเมลามีนจากวัสดุสัมผัสอาหาร ซึ่งจากการเปรียบเทียบปริมาณการสกัดในช่วงสุดท้าย (ครั้งที่ 13-14) กับการสกัดในช่วงแรก (ครั้งที่ 1-2) ปริมาณเมลามีนในกรดแอสติค ร้อยละ 3 มีแนวโน้มลดลง ดังนั้นการทดสอบจึงใช้การสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยของการเคลื่อนย้ายสารเมลามีนอยู่ในระดับสูง แล้วจึงนำสารละลายตัวแทนอาหารจากการสกัดครั้งที่ 3 มาตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของจำนวนครั้งในการสกัด (14 ครั้ง) ที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายของเมลามีนจากวัสดุสัมผัสอาหาร โดยให้อุณหภูมิ (70 องศาเซลเซียส) และเวลาที่ใช้ในการสกัดคงที่ (2 ชั่วโมง)

3.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

3.2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐาน โดยทำการศึกษาในช่วง 0 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.9992 และการวิเคราะห์ส่วนตกค้าง (residual analysis) ให้กราฟที่มีการกระจายอย่างอิสระ



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารเมลามีนในช่วงความเข้มข้น 0 – 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

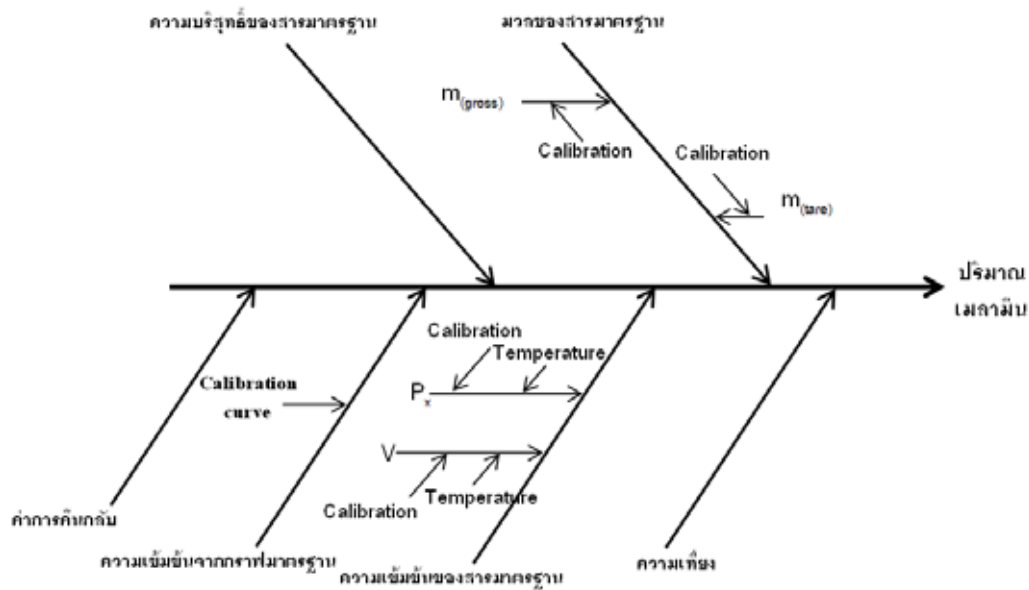


รูปที่ 5 กราฟแสดงส่วนตกค้าง (Residual Plot)

3.2.2 ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวัดปริมาณของวิธีทดสอบ โดยทำการศึกษากับการวัดตัวอย่างแบบลงค์จำนวน 10 ซ้ำ จากการทดลองพบว่า ขีดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดการวัดปริมาณเท่ากับ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.2.3 ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีทดสอบ โดยทำการศึกษากับตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 2.00 33.6 และ 67.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ซึ่งความแม่นยำแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงแสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ จากการทดลองพบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 83.1-107.9 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เท่ากับ 8.68 ค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น 33.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 93.7-108.9 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เท่ากับ 4.85 ค่าร้อยละการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้น 67.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 95.8-107.0 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เท่ากับ 3.64

3.2.3 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดตาม EURACHEM/CITAC Guide: 2012 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นวิธีนี้เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของวิธีตาม EUR 24105 EN: 2009 คือ $LOQ + ULOQ$ เท่ากับ 2.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเกณฑ์กฎหมายกำหนด 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 6 แหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอน

3.3 เข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญหรือเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีทดสอบเมลามีนในวัสดุสัมผัสอาหาร

การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญรายการเมลามีนด้วยเทคนิค HPLC ของตัวอย่าง Melamine in 3% aq. Acetic Acid กับ FAPAS เดือน กรกฎาคม-กันยายน 2557 ซึ่งมีค่า Z-score ต่ำกว่า 2 แสดงว่า การทดสอบเมลามีนมีความถูกต้องสำหรับการทดสอบในกรดอะซิติก ร้อยละ 3 3.4 การนำวิธีทดสอบไปใช้กับตัวอย่างภาชนะบรรจุอาหารประเภทชามเมลามีน ที่สุ่มมาจากท้องตลาดในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร จำนวน 22 ตัวอย่างพบสารเมลามีนใน 5 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 6.00 – 15.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และอีกจำนวน 17 ตัวอย่างตรวจไม่พบสารเมลามีน

4.สรุป (Conclusions)

วิธีการสกัดสารเมลามีนจากวัสดุสัมผัสอาหารที่เหมาะสม คือ การใช้กรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารละลายตัวแทนอาหาร โดยใช้การบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและตรวจวัดด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิด โครมาโทกราฟี จากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่า สารเมลามีนมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 – 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดเท่ากับ 0.9992 ซิดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซิดจำกัดการวัดปริมาณเท่ากับ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 83.1 - 108.9 และความเที่ยงแสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 3.64 - 8.68 ค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นวิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมตามเกณฑ์การยอมรับของวิธีทดสอบวัสดุสัมผัสอาหารตามมาตรฐาน EUR 24105 EN: 2009 และวิธีทดสอบนี้ได้นำไปทดสอบภาชนะบรรจุอาหารประเภทชามเมลามีน โดยสุ่มตัวอย่างในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ซึ่งตรวจพบว่าสารเมลามีนมีค่าอยู่ระหว่าง ไม่พบ ถึง 15.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

5.กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

6.เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] LUTTER, P., et al. Screening and confirmatory methods for the determination of melamine in cow's milk and milk-based powdered infant formula: Validation and proficiency-tests of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS. *Food Control*, 2011, 22, 903-913.
- [2] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid*. Geneva : FAO/WHO, 2009, p.1-74.
- [3] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. Codex Alimentarius Commission. *Agenda Item 5, CX/CF 10/4/5: FAO/WHO*, March 2010, p.1-25.
- [4] LAM, C.W.,et al. Diagnosis and spectrum of melamine-related renal disease: Plausible mechanism of stone formation in humans. *Clin. Chim. Acta.*, 2009, 402, 150-155.
- [5] TOLLESON, W.H., G.W. DIACHENKO, and D. HELLER. *Background paper on the chemistry of melamine alone and in combination with related compounds*. Prepared for the WHO Meeting on Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid, in collaboration with FAO and supported by Health Canada, 1-4 December 2008.
- [6] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food*. 30 October 2008.
- [7] TITTEMIER, S.A. Methods for the analysis of melamine and related compounds in foods: a review. *Food Addit. Contam.*, 2010, 27, 129-145.
- [8] LU, J., et al. Study on Migration of Melamine from Food Packaging Materials on Markets. *Biomed. Environ. Sci.*, 2009, 22, 104-108.
- [9] UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, Office of Public Health Science. *Determination and Confirmation of Melamine by LC/MS/MS*. 12 February 2008. p.1-24.
- [10] BRADLEY, E.L., et al. Comparison of the migration of melamine from melamine-formaldehyde plastics ('melaware') into various food simulants and foods themselves. *Food Addit. Contam.: Part A.*, 2010, 1755-1764.
- [11] CHIK, Z., D.E. MOHAMAD HARON, and E.D. AHMAD. Analysis of melamine migration from melamine food contact articles. *Food Addit. Contam.*, 2011, 28, 967-973.
- [12] JIE, L., J. XIAO., and D.J. YANG. Study on migration of melamine from food packaging materials on markets. *Biomed. Environ. Sci.*, 2009, 22, 104-108.