

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ฟอร์มาลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อ

นายนาถ พรหมรังสรรค์
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ
กองเคมีภัณฑ์และผลิตภัณฑ์บริโภค

ฟอร์มาลดีไฮด์หรืออีกชื่อหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ ฟอร์มาลินเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านปศุสัตว์และประมงเนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และสปอร์ อย่างไรก็ตามฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารพิษและเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์หากได้รับปริมาณเกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ส่วนในล้านส่วน) จะทำให้เกิดการระคายเคือง มีอาการหายใจติดขัด แสบตา แสบจมูก และหากได้รับปริมาณสูงกว่านี้อาจทำให้หมดสติและเสียชีวิตได้



รูปที่ 1 ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในอาหาร [1]

การทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อเพื่อให้ทราบปริมาณที่ถูกต้องนั้นมีความสำคัญทั้งนี้เพื่อให้สามารถใช้สารฆ่าเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจากอาหารที่มีการนำฟอร์มาลดีไฮด์ไปใช้ในกระบวนการผลิต การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบฟอร์มาลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อเป็นการพัฒนาวิธีทดสอบโดยดัดแปลง

มาจากมาตรฐานวิธี ISO 17226-1: 2008 ซึ่งเป็นวิธีทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่างหนึ่งสัปดาห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการทดสอบนี้มีความเหมาะสมกับการนำมาดัดแปลงเพื่อใช้ทดสอบตัวอย่างสารฆ่าเชื้อ จึงจำเป็นต้องตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 จากการเตรียมตัวอย่างสารฆ่าเชื้อโดยการทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenyl hydrazine เพื่อเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน แล้วนำไปทดสอบด้วย HPLC ซึ่งตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ (diode array) ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร พบว่าขีดจำกัดในการตรวจหาของวิธีทดสอบ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.0023 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดในการวัดปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงการทำเส้นโค้งสอบเทียบ (standard curve range) ของฟอร์มาลดีไฮด์ เท่ากับ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถทดสอบตัวอย่างสารฆ่าเชื้อที่มีปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ได้ตั้งแต่ 0.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถึง ร้อยละ 37.29 มีค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับร้อยละ 6.85

วิธีการทดสอบ

1. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1200) ซึ่ง

ทดสอบความมีนัยสำคัญโดยใช้สถิติทดสอบ t (t-test)

$$t_{cal} = |1 - 0.980| / 0.0265 = 0.7547$$

$$t_{crit} = 2.262, a = 0.05, n = 10$$

แสดงว่าการทดสอบไม่มีนัยสำคัญ

จากการทดสอบความมีนัยสำคัญของค่าคืนกลับเฉลี่ยของผลการวัด (RS) ซึ่งเป็นการเติมสารมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ให้ครอบคลุมช่วงการวัด (ตามรูปที่ 2) พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ ดังนั้นวิธีการทดสอบนี้ไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์

3.4 การคำนวณค่าความไม่แน่นอน โดยพิจารณาแหล่งค่าความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานวัสดุอ้างอิงโพแตสเซียมไอโอเดต ค่าความลำเอียง (bias) และความเที่ยง (precision) ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นนำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (u_c) ดังนี้

ตารางที่ 4 แหล่งของค่าความไม่แน่นอนต่างๆ

แหล่งค่าความไม่แน่นอน	ค่าปริมาณ (X)	ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน ($u(x)$)	ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ($u(x)/x$)
purity of potassium iodate	0.9976	0.0144	0.0144
ความโอนเอียง (bias)	0.9797	0.02765	0.02705
ความเที่ยง (precision)	-	-	0.0140

$$\frac{u_c}{C} =$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์, มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

= ค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบความเที่ยง

$u(R) =$ ค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบความลำเอียง

= ค่าความไม่แน่นอนของสารมาตรฐานวัสดุอ้างอิงโพแตสเซียมไอโอเดต

$$= 0.03369$$

$$u_C = 0.03369$$

จากนั้นนำมาคำนวณ ค่าความไม่แน่นอนขยาย (U)

$$U = k \times u_c = 2 \times 0.03369 \text{ ที่ความเชื่อมั่น } 95\% = 0.067$$

หรือความไม่แน่นอนขยาย (ร้อยละ) 6.85

สรุปผล

การศึกษานี้แสดงถึงการพัฒนาวิธีทดสอบฟอร์มัลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อโดยใช้เทคนิค HPLC จากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบฟอร์มัลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อโดยการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ความสัมพันธ์เชิงเส้น ซีดจำกัด การตรวจหา ซีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ ช่วงการใช้งาน ความลำเอียงความเที่ยง และผลกระทบจากองค์ประกอบในเนื้อสาร รวมถึงการประมาณค่าความไม่แน่นอน พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดค่าความไม่แน่นอนไว้ที่ระดับต่ำกว่าร้อยละ 20 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้เหมาะสมกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ โดยมีค่าความไม่แน่นอนขยายอยู่ในเกณฑ์ค่าความไม่แน่นอนเป้าหมาย (ร้อยละ 20) สามารถใช้เป็นข้อมูลยืนยันได้ว่าวิธีทดสอบนี้ผ่านการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี และสามารถนำมาให้บริการลูกค้าที่ต้องการทดสอบปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อได้

เอกสารอ้างอิง

- [1] เข้าถึงจาก <https://kaijeaw.com/> อันตราย-ฟอร์มัลลิน/
- [2] ISO 17226-1:2008 Leather – Chemical determination of formaldehyde content – Part 1: Method using high performance liquid chromatography
- [3] Toy safety standard ST 2002, The Japan Toy Association, 10th edition 2010.

ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

1.2 เครื่องชั่ง (ยี่ห้อ Metler รุ่น AB-204) ชั่งความละเอียดระดับ 0.1 มิลลิกรัม

1.3 เครื่องแก้ว เช่น ขวดแก้ววัดปริมาตรชั้นคุณภาพวิเคราะห์ (volumetric flask class A), บิวเรต และปิเปต

1.4 สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

1.4.1 สารมาตรฐานวัสดุอ้างอิง (reference material, RM) ที่ใช้คือ โพลีแซคคาไรด์ไอโอเดต (ยี่ห้อ Merck ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.76)

1.4.2 สารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ (ยี่ห้อ Loba, ความเข้มข้นร้อยละ 37) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติม acetonitrile 4 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ก่อนนำไปใช้งานต้องหาความเข้มข้นที่แน่นอน (standardization) โดยไทเทรตกับสารมาตรฐานวัสดุอ้างอิงโพลีแซคคาไรด์ไอโอเดต

1.4.3 กรดออร์โทฟอสฟอริก (ยี่ห้อ Merck, ความเข้มข้นร้อยละ 85)

1.4.4 2, 4-ไดไนโตรฟีนีลไฮดราซีน (2,4- dinitrophenylhydrazine) (ยี่ห้อ Loba ความเข้มข้นร้อยละ 99, เกรด AR) เตรียมสารละลายโดยชั่ง 0.3 กรัมละลายในกรดออร์โทฟอสฟอริกเข้มข้น (ในข้อ 4.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.4.5 อะซิโตนไตรัล (ยี่ห้อ Fisher, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.9 เกรด HPLC)

1.4.6 น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

2. วิธีดำเนินการ

2.1 การเตรียมเส้นโค้งสอบเทียบ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 1.4.2 ลงในขวดแก้ววัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอะซิโตนไตรัล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย 2,4-dinitrophenylhydrazine ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ทำการเก็บสารละลายที่เตรียมได้ในที่มืด 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทดสอบด้วยเครื่อง HPLC โดยสภาวะที่ใช้ทดสอบแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ที่ใช้ทดสอบตัวอย่าง

รายการ	สภาวะ
คอลัมน์	รีเวอร์สเฟสชนิดคาร์บอน 18 (C18) : 150 x 4.6 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.5 ไมครอน
อุณหภูมิห้อง	40 องศาเซลเซียส
เฟสเคลื่อนที่	อัตราส่วนอะซิโตนไตรัลต่อน้ำ คือ 60:40 ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรการฉีดสารละลาย	20 ไมโครลิตร
การตรวจวัด	ไดโอดอาร์เรย์ วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

2.2 วิธีทดสอบตัวอย่างสารฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง HPLC ชั่งสารฆ่าเชื้อใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรโดยคำนวณน้ำหนักตัวอย่างให้มีปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อยู่ในช่วงเส้นโค้งสอบเทียบ วิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่างทำเช่นเดียวกันกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ในข้อ 1.4.2

2.3 วิธีคำนวณปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่างสารฆ่าเชื้อ

ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่างสารฆ่าเชื้อคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{C \times D \times V}{W}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

D คือ แฟกเตอร์สำหรับเจือจาง

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

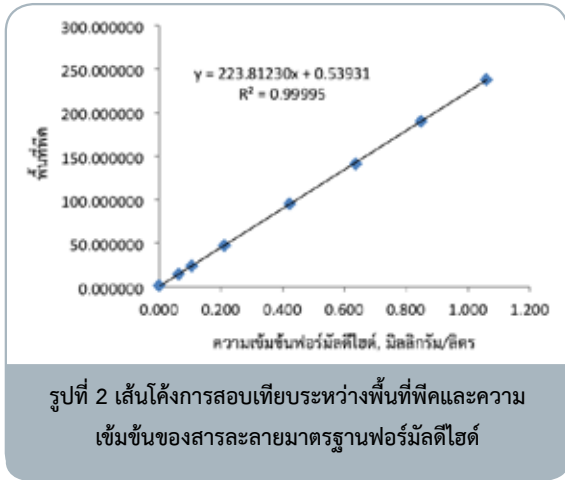
V คือ ปริมาตรเริ่มต้น (มิลลิลิตร) ในการเตรียมตัวอย่าง

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การเตรียมเส้นโค้งสอบเทียบ

ภายหลังการทดสอบสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำพื้นที่พีคไปสร้างเส้นโค้งสอบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่พีค พบว่าช่วงของความเข้มข้นดังกล่าวมีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

(coefficient of determination, R2) เท่ากับ 0.99995 แสดงว่าช่วงความเข้มข้นของวิธีทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ดังรูปที่ 2



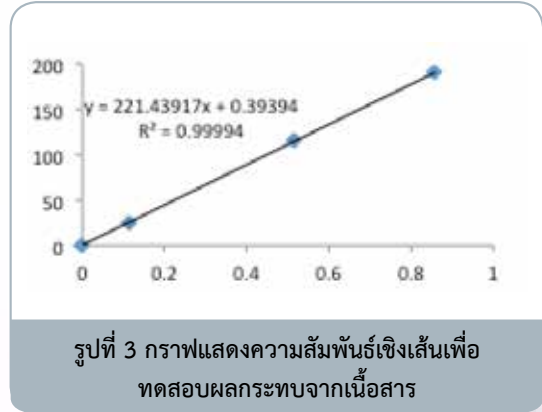
3.2 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในสารฆ่าเชื้อแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบ

พารามิเตอร์	คุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบ
ความสัมพันธ์เชิงเส้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.1 – 1.0
ขีดจำกัดการตรวจหา (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.0023
ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	0.22
ช่วงการใช้งาน	0.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถึง ร้อยละ 37.29
ค่าคืนกลับ (ร้อยละ)	90.0 – 110.0

3.3 การศึกษาผลกระทบจากองค์ประกอบในเนื้อสาร (matrix effect) ทำการเติมฟอร์มาลดีไฮด์ที่ทราบความเข้มข้นลงในสารฆ่าเชื้อที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง จากนั้นทำการทดสอบจำนวน 10 ครั้ง ได้ค่าปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์คืนกลับ ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และเมื่อสร้างเส้นโค้งสอบเทียบเพื่อหาความ

สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ที่ผดดังรูปที่ 3 พบว่าช่วงของความเข้มข้นดังกล่าวมีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R2) เท่ากับ 0.99994 แสดงว่าช่วงความเข้มข้นของวิธีทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้



จากนั้นทำการทดสอบความมีนัยสำคัญโดยใช้สถิติทดสอบ t (t-test) เพื่อพิสูจน์ว่าช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยวิธีนี้ไม่ได้รับผลกระทบจากองค์ประกอบในเนื้อสาร (matrix effect) โดยคำนวณจากข้อมูลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปค่าคืนกลับ (Rs) ของทุกช่วงความเข้มข้น และค่าความไม่แน่นอนของ Rs (u(Rs))

ระดับความเข้มข้น	สารมาตรฐานที่เติม	ความเข้มข้นเจือจาง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าคืนกลับ (Rs)
1	0.0000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	0.0000	-
2	0.1120	0.1120	0.980
3	ร้อยละ 12.91	0.5163	1.006
4	ร้อยละ 37.29	0.8577	0.953
	Rs เฉลี่ย		0.980
	u(Rs)		0.0265