ว กรมวิทย พ 2559; 58 (4) : 229-245

การพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซิน สารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน ในนมผง โดย HRGC/HRMS

สุพัฒน์ แสงสวย ศิริชัย สัญญะ และสิรินทร์นิชา สีมาชัยสิน

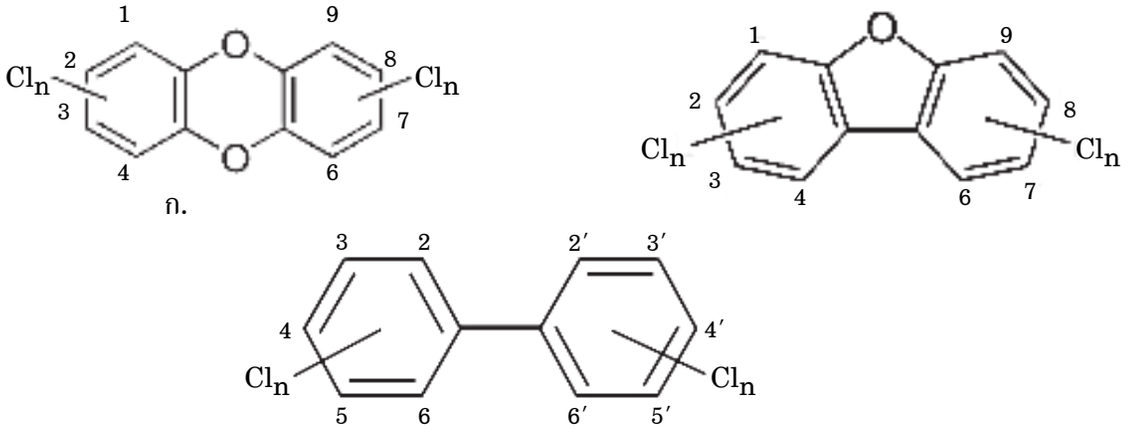
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ความเป็นพิษของสารกลุ่มไดออกซิน พีซีบีคล้ายไดออกซิน และพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน ในสัตว์ทดลองพบว่า ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาการของระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์และระบบภูมิคุ้มกัน มนุษย์ได้รับสารเข้าสู่ร่างกายจากการรับประทานอาหารมากกว่าร้อยละ 90 จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการรายงานการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าวในอาหาร แต่ในต่างประเทศได้ให้ความสำคัญกับสารกลุ่มนี้มาก ซึ่งจัดเป็นสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน โดยเฉพาะอาหารที่ประชากรกลุ่มเสี่ยงบริโภค เช่น ทารกและเด็กซึ่งบริโภคนมในปริมาณสูง การวิเคราะห์สารกลุ่มเหล่านี้ใช้เวลา แรงงานและสารเคมีจำนวนมาก ผู้วิจัยได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ในนมผง โดยเพิ่มปริมาณตัวอย่างนมผงและปรับเปลี่ยนบางขั้นตอนในการสกัด ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ และขั้นตอนการแยกสารแต่ละกลุ่มออกจากกัน ซึ่งทำให้ได้วิธีที่ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อยลงและใช้เวลาน้อยลงด้วย ค่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณของสารจำนวน 35 ตัว ในแต่ละกลุ่มที่กล่าวมาคือ 0.06-0.64, 1.85 และ 3.50 pg/g ไขมัน ตามลำดับ

Accepted for publication, 19 August 2016

บทนำ

สารกลุ่มไดออกซินเป็นชื่อที่นิยมเรียกกัน หมายถึงกลุ่มสาร 2 กลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่มโพลีคลอริเนตเตดไดเบนโซพาราไดออกซิน (polychlorinated dibenzo para dioxins; PCDDs) และสารกลุ่มโพลีคลอริเนตเตดไดเบนโซฟูแรน (polychlorinated dibenzo furans; PCDFs) สารกลุ่มพีซีบีหมายถึงสารกลุ่มโพลีคลอริเนตเตดไบฟีนิล (polychlorinated biphenyls; PCBs) แบ่งออกเป็นสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน (dioxin-like polychlorinated biphenyls; DL-PCBs) และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (non dioxin-like polychlorinated biphenyls; NDL-PCBs) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 1) สารทั้ง 4 กลุ่มมีจำนวน 75, 135, 12 และ 197 ตัว (congeners) ตามลำดับ รวมทั้งหมด 419 ตัว สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในอาหารเพื่อควบคุมให้เป็นไปตามกฎหมายของสหภาพยุโรป จะต้องตรวจในแต่ละกลุ่ม 7, 10, 12 และ 6 ตัว ตามลำดับ รวมจำนวน 35 ตัว[1]



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมี ก. สารกลุ่มโพลีคลอริเนตเตดไดเบนโซพาราไดออกซิน ข. สารกลุ่มโพลีคลอริเนตเตดไดเบนโซฟูแรน และ ค. สารกลุ่มโพลีคลอริเนตเตดไบฟีนิล (พีซีบี)

สารกลุ่มไดออกซิน (PCDDs/Fs) เกิดขึ้นจากการกระทำที่ไม่ได้ตั้งใจของมนุษย์ ตรงกันข้ามกับสารกลุ่มพีซีบี (PCBs = DL/NDL-PCBs) ซึ่งก่อนปี ค.ศ. 1985 ตั้งใจผลิตขึ้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม สารทั้งสองกลุ่มมีคุณสมบัติที่คงทน มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันเกิดขึ้นจากการกระทำที่ไม่ได้ตั้งใจของมนุษย์และปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ เช่น ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกำจัดแมลงและศัตรูพืช โรงงานผลิตเหล็กกล้า โรงงานปิโตรเคมี การสันดาปของเครื่องยนต์ ภูเขาไฟระเบิด ไฟป่า และการเผาขยะที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น สารเหล่านี้เมื่อเกิดขึ้นมาจะตกค้างและสะสมในสิ่งแวดล้อม ท้ายสุดก็เข้าสู่สิ่งมีชีวิตและส่งผลต่อสุขภาพ จากการศึกษาทางพิษวิทยาในสัตว์ทดลองพบว่า สารกลุ่มไดออกซินทำให้เกิดภาวะเยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดที่ (endometriosis) เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ พัฒนาการและสติปัญญา ในหญิงตั้งครรภ์ทำให้มีความผิดปกติของทารก[2] แต่ยังไม่มีข้อยุติว่าสารกลุ่มไดออกซินทุกตัวก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคน แต่มีหลักฐานที่เชื่อถือได้ว่า สาร 2, 3, 7, 8 - TCDD เป็นสารที่ก่อมะเร็งในมนุษย์ ปี ค.ศ. 1997 หน่วยงานวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) จัดให้ 2, 3, 7, 8 - TCDD เป็นสารที่รู้ว่าก่อให้เกิดมะเร็ง คลาส 1 (known human carcinogen) และเนื่องจากความเป็นพิษของสารกลุ่มไดออกซินและพีซีบีคล้ายไดออกซินแตกต่างกัน องค์การอนามัยโลก (WHO) ให้การยอมรับการเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารตัวอื่น ๆ ในกลุ่มที่กล่าวมากับ 2, 3, 7, 8 - TCDD โดยเรียกว่า แฟกเตอร์สมมูลความเป็นพิษ (Toxic Equivalency Factor, TEF)[1]

ซึ่งสารแต่ละตัวมีค่า (ตารางที่ 1) ในส่วนความเป็นพิษของสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินมีลักษณะเฉพาะที่ต่างออกไป เช่น ในสัตว์ทดลองทำให้ตับขยายตัวผิดปกติและส่งเสริมให้เกิดเนื้องอกที่ตับ ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของต่อมไร้ท่อ ยิ่งไปกว่านั้นบางตัวยังจัดว่าเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันและระบบประสาท (immunotoxin and neurotoxin) ส่วนในมนุษย์เป็นการยากที่จะระบุว่าอาการที่เกิดขึ้นจากการได้รับสารกลุ่มพีซีบีมาจากสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินหรือสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน เนื่องจากโดยปกติสารกลุ่มเหล่านี้ผสมอยู่ด้วยกัน[3]

ตารางที่ 1 ค่า WHO-TEF 2005 ของสารกลุ่มไดออกซินและพีซีบีคล้ายไดออกซิน

ชื่อสารกลุ่มไดออกซิน	TEF value	ชื่อสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน	TEF value
2, 3, 7, 8 - TCDD	1		
1, 2, 3, 7, 8 - PeCDD	1	*non-ortho PCBs*	
1, 2, 3, 4, 7, 8 - HxCDD	0.1	PCB 77	0.0001
1, 2, 3, 6, 7, 8 - HxCDD	0.1	PCB 81	0.0003
1, 2, 3, 7, 8, 9 - HxCDD	0.1	PCB 126	0.1
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - HpCDD	0.01	PCB 169	0.03
OCDD	0.0003	*mono-ortho PCBs*	
2, 3, 7, 8 - TCDF	0.1	PCB 105	0.00003
1, 2, 3, 7, 8 - PeCDF	0.03	PCB 114	0.00003
2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF	0.3	PCB 118	0.00003
1, 2, 3, 4, 7, 8 - HxCDF	0.1	PCB 123	0.00003
1, 2, 3, 6, 7, 8 - HxCDF	0.1	PCB 156	0.00003
1, 2, 3, 7, 8, 9 - HxCDF	0.1	PCB 157	0.00003
2, 3, 4, 6, 7, 8 - HxCDF	0.1	PCB 167	0.00003
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - HpCDF	0.01	PCB 189	0.00003
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 - HpCDF	0.01		
OCDF	0.0003		

มนุษย์ได้รับสัมผัสสารกลุ่มนี้มากกว่า 90% จากการรับประทานอาหาร[4] ในอดีตมีอุบัติการณ์การปนเปื้อนในอาหาร เช่น ปี ค.ศ. 1998 ประเทศเยอรมนีตรวจพบนมปนเปื้อนซึ่งมีสาเหตุจากอาหารสัตว์ปนเปื้อน[5] ปี ค.ศ. 1999 ประเทศเบลเยียมเกิดวิกฤตการณ์ไดออกซินปนเปื้อนอาหารสัตว์ที่ส่งขายในทวีปยุโรปซึ่งส่งผลเสียหายมหาศาลต่อเศรษฐกิจ[6] และปี ค.ศ. 2011 จากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำพบว่าในไข่มีการปนเปื้อนสารกลุ่มไดออกซินสูงกว่ากฎหมายกำหนด ซึ่งทำให้ฟาร์มเลี้ยงไก่ไข่จำนวน 4,700 ฟาร์ม ถูกปิด ไก่ถูกฆ่าหลายพันตัวและไข่ถูกทำลายหลายแสนฟอง[7] เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์การปนเปื้อนสารกลุ่มไดออกซินและสารกลุ่มพีซีบีแบ่งเป็น 2 วิธี[8] คือ 1) วิธีตรวจคัดกรอง (screening method) เป็นวิธีตรวจสอบเบื้องต้นที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อคัดกรองตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเกินระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ ซึ่งอาจเป็นวิธี bioassay หรือ GC/MS ข้อมูลที่ได้จากวิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและการประเมินการได้รับสารกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกาย และ 2) วิธีตรวจยืนยัน (confirmatory method) เป็นวิธีที่สามารถตรวจเชิงคุณภาพและปริมาณได้ ข้อมูลที่ได้จะทำให้รู้ว่าตัวอย่างปนเปื้อนสารแต่ละตัวในปริมาณเท่าไหร่และผลรวมของสารทุกตัวมีค่าเท่าไหร่ ผลที่ได้สามารถนำไปยืนยันหรือมีผลทางกฎหมาย รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลเพื่อประเมินการได้รับสารกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับการกำหนดหรือ

ปรับค่าสูงสุดที่ยอมให้ปนเปื้อนได้ (maximum level, ML) ปัจจุบันสหภาพยุโรปกำหนดให้วิธีตรวจแบบยืนยันสารกลุ่มไดออกซินและสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินต้องใช้เครื่อง HRGC/HRMS หรือ GC-MS/MS และสารกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินใช้เครื่อง GC-MS ที่สามารถตรวจเชิงปริมาณได้ถึงในระดับเฟมโตกรัม (upper femtogram, 10^{-15}g) ระดับพิโกกรัม (low picogram, 10^{-12}g) ระดับนาโนกรัม (nanogram, 10^{-9}g) มีความจำเพาะเจาะจงสูงและมีความถูกต้องสูง เป็นต้น ข้อด้อยของวิธีตรวจแบบยืนยันคือมีค่าใช้จ่ายสูงด้านเครื่องมือ สารเคมี แรงงานและความยุ่งยาก ทั้งสองวิธีประกอบด้วย 5 ขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่ 1) การชักตัวอย่างและการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน 2) การสกัด การระเหยและการหาปริมาณไขมัน 3) การกำจัดสารรบกวนหรือการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นและการระเหยรวมถึงการแยกสารออกเป็นกลุ่ม 4) การวัดด้วยเครื่องมือ และ 5) การคำนวณและรายงานผล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดตั้งห้องปฏิบัติการไดออกซินเป็นแห่งแรกของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 โดยมีภารกิจหลักด้านการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในอาหารเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคของคนไทย ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในนมและผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมและทดสอบความใช้ได้ก่อนจึงจะนำไปสู่การสำรวจการปนเปื้อนสารกลุ่มนี้ในระดับชาติต่อไป จากที่กล่าวมานำเข้าสู่เป้าหมายของงานวิจัยนี้คือ เพื่อการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซินจำนวน 17 ตัว พีซีบีคล้ายไดออกซินจำนวน 12 ตัว และพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินจำนวน 6 ตัว (พีซีบีชี้บ่ง, marker PCBs หรือ indicator PCBs) ในอาหารนมผงด้วย HRGC/HRMS

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐาน และการเตรียม

- สารมาตรฐานกลุ่มไดออกซินเข้มข้น (EPA-1613CVS, US. EPA Method 1613 Calibration and Verification Solution, Wellington laboratories) ก่อนใช้เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 40 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานกลุ่มไดออกซินเจือจาง 5 ระดับ (Working Standard Calibration Solution; CS1dil-CS5dil) ซึ่งช่วงปริมาณของสารแต่ละตัวในสารละลายมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครลิตร แสดงไว้ในหัวข้อการทดสอบความเป็นเส้นตรงในผลการทดลอง

- สารมาตรฐานกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินเข้มข้น (WP-CVS, WHO/EPA PCB Calibration Solutions for HRGC/HRMS, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินเจือจางขั้นกลาง 5 ระดับ (Intermediate Standard Calibration Solution, WPCS4I-WPCS5I)

- สารละลายมาตรฐานกลุมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินเข้มข้น (P48-M-CVS BS EN 1948-4:2010, HRGC/HRMS Calibration Solutions for the marker PCBs, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินเจือจางขั้นกลาง 5 ระดับ (Intermediate Standard Calibration Solution, MCS1I-MCS5I)

- การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มพีซีบีคล้ายและไม่คล้ายไดออกซินเจือจาง 5 ระดับ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Working Standard Calibration Solution, DL/NDL-PCBdil1-5) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกลุ่ม DL-PCBs เจือจางขั้นกลาง DL-PCBs CS1I, CS2I, CS3I, CS4I, CS5I ผสมกับสารละลายมาตรฐานกลุ่ม NDL-PCBs เจือจางขั้นกลาง NDL-PCBs CS1I, CS2I, CS3I, CS4I, CS5I ตามลำดับในอัตราส่วน 1:1 และเติมโนเนนอีก 1 ส่วน ซึ่งช่วงปริมาณของสารแต่ละตัวในสารละลายมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครลิตร แสดงไว้ในหัวข้อการทดสอบความเป็นเส้นตรงในผลการทดลอง

- สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native PCDDs/Fs เข้มข้น (EPA-1613PAR, US EPA Method 1613B Native PCDD/PCDF Solution/Mixture, Wellington laboratories) ก่อนใช้เจือจางด้วยอะซิโตน เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native PCDDs/Fs เจือจาง ซึ่งประกอบด้วยสาร native TCDD/F, native OCDD/F และอีก 13 ตัวที่เหลือมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.008, 0.08 และ 0.04 pg/µl ตามลำดับ

- สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native DL-PCBs เข้มข้น (WP-STK, Native PCB Solution WHO/EPA PCBs, Stock Standard, Wellington laboratories) ก่อนใช้เจือจางด้วยอะซิโตน เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานกลุ่ม native DL-PCBs เจือจาง ซึ่งสารแต่ละตัวของ native DL-PCBs (12 ตัว) มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.448 pg/µl

- สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/Fs เข้มข้น (EPA-1613ISS, Internal Standard Spiking Solution, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 40 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานไอโซโทป $^{13}C_{12}$-PCDDs/Fs เจือจาง ซึ่งประกอบด้วย $^{13}C_{12}$- 1, 2, 3, 4-TCDD และ $^{13}C_{12}$-1, 2, 3, 7, 8, 9 - HxCDD ทั้งสองตัวมีความเข้มข้นตัวละ 2.5 pg/µl

- ละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCBs เข้มข้น (WP-ISS, $^{13}C_{12}$-PCB internal Standard Solution WHO/EPA PCBs, Stock Syringe Standard, Wellington laboratories) เจือจางด้วยโนเนนให้ความเข้มข้นลดลง 200 เท่า จะได้สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCBs เจือจางซึ่งประกอบด้วย PCB 70L, PCB 111L, PCB 138L และ PCB 170L ทั้งสี่ตัวมีความเข้มข้นตัวละ 5 pg/µl

- สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/DFs เข้มข้น (EPA-1613LCS, Labeled compound Stock solution, Wellington laboratories), สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-DL-PCBs เข้มข้น (WP-LCS, "Dioxin-Like" PCBs $^{13}C_{12}$-Surrogate Spiking Solution, Wellington laboratories) และสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-NDL-PCBs เข้มข้น (P48-M-ES, BS EN 1948-4:2010, Mass-labeled Marker PCB extraction standard, Wellington laboratories) เจือจางและผสมให้เป็นเนื้อเดียวแล้วแบ่งเก็บใส่ GC vial สำหรับทำเป็น Clean-up Standard หรือ Extraction Standard ซึ่งแต่ละขวดจะมีสารจำนวน 35 ตัว ประกอบด้วยสารไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/Fs ทุกตัวจะมีเนื้อสารปริมาณ 50 พิโกกรัม/ขวด ยกเว้น $^{13}C_{12}$-OCDD จะมี 100 พิโกกรัม/ขวด และสารไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-DL-PCBs/NDL-PCBs ทุกตัวมีเนื้อสารปริมาณ 100 พิโกกรัม/ขวด

สารเคมี ได้แก่ เมทานอล ไดคลอโรมีเทนและอะซิโตน (Pesticide grade, Labscan) เฮกเซน (n-Hexane 95%, Residue & Pesticide grade, Fisher Scientific) ไดเอทิลอีเทอร์ (Pesticide grade, Fisher Scientific) เอทานอล (Absolute AR grade, Merck) โนเนน (nonane, GC grade, Sigma) โปแตสเซียมออกซาเลต (ACS, Merck) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (AR grade, J.T.Baker) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (AR grade, Merck) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Ultra-resi analyses, J.T.Baker) ซิลิกาเจล (Silica gel 60 for column chromatography, Merck) ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก (30% H_2SO_4 - SiO_2) ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก (40% H_2SO_4- SiO_2) โพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์-ซิลิกา (KOH-SiO_2) และเบสิก-อะลูมิเนียมออกไซด์ (Alumina B-Super I for Dioxin Analysis, MP Biomedical) สารเคมีทุกชนิดที่กล่าวมาก่อนใช้ต้องเตรียมตามคำแนะนำของเอกสารอ้างอิง[9, 10, 11]

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง High Resolution Gas Chromatograph/High Resolution Mass Spectrometer, (HRGC/HRMS, Agilent, GC7890A/Waters, Auto Spec Premier) GC capillary Columns (BPX-DXN 60 m × ID

0.25 mm, SGE และ HT8 60 m × ID 0.25 mm, SGE) เครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum rotary evaporator, Buchi, R-215) เครื่องเขย่าแบบหมุนส่าย (Shaker orbital, IKA, KS 501 digital) และเครื่องระเหยแบบหลายหลอดแก้ว (Multiple tube evaporator, Zymark, Turbo Vap LV)

เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดวัดปริมาตรความจุ 2, 25, 50 มิลลิลิตร ขวดแก้วรูปชมพู่ความจุ 250 มิลลิลิตร กรวยแยกความจุ 500 และ 1,000 มิลลิลิตร คอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตร หลอดแก้วก้นแคบความจุ 30 มิลลิลิตร ใยแก้ว GC vials ความจุ 1.2 มิลลิลิตร Glass insert with spring ความจุ 300 ไมโครลิตร

ตัวอย่าง

ใช้นมผงดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็กอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 3 ปี เป็นตัวอย่างสำหรับการพัฒนาวิธี

การพัฒนาวิธี

ในการตรวจวัดสารเคมีเชิงปริมาณด้วยเครื่องมือ (instrumental chemical analysis) หลังจากจัดหา ติดตั้ง ปรับเครื่องมือให้พร้อมสำหรับใช้งาน และสร้างโปรแกรมสำหรับตรวจติดตามสารที่สนใจ จะต้องทดลองฉีดสารมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เครื่องสามารถวัดปริมาณได้ถูกต้อง หรือถ้าสารที่สนใจมีข้อกำหนดในกฎหมายให้วิธีวิเคราะห์ต้องสามารถหาปริมาณน้อยที่สุดตามที่กำหนด ก็สามารถเริ่มจากจุดนี้ได้

สารกลุ่มไดออกซิน กลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซิน และกลุ่มพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินเป็นสารที่ไม่มีขั้วและละลายได้ดีในไขมัน ระดับปนเปื้อนสูงสุดในนมและผลิตภัณฑ์ของสหภาพยุโรป (EU commission regulation No 1259/2011)[1] กำหนดไว้ต่ำมากและคำนวณต่อปริมาณไขมัน 1 กรัม นั่นคือ 2.5 pg TEQ/g fat, 5.5 pg TEQ/g fat และ 40 ng/g fat ตามลำดับ และกำหนดให้ใช้เทคนิค Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) ในการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งปัจจัยที่สำคัญของเทคนิคนี้คือต้องหาปริมาณสารไอโซโทปที่เหมาะสมที่ต้องเติมในตัวอย่างและปริมาณตัวอย่าง

การสกัด

ชั่งตัวอย่างนมผงปริมาณ 35.0 กรัม และโปแตสเซียมออกซาเลตปริมาณ 1.5 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานไอโซโทปผสมของสารกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/DFs, กลุ่ม $^{13}C_{12}$-DL-PCBs และกลุ่ม $^{13}C_{12}$-NDL-PCBs เจือจาง 1 ขวด เติมน้ำอุ่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทใส่กรวยแยกขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมเอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายผสมเฮกเซน/ไดเอทิลอีเทอร์ (3:1) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น (เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาทีไม่แยกชั้น ให้เติมเอทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ และปล่อยให้แยกชั้น) เทสารละลายชั้นบนลงในขวดก้นกลมขนาด 1,000 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยสารละลายผสมเฮกเซน/ไดเอทิลอีเทอร์ (3:1) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บสารละลายชั้นบนรวมกันไว้ กำจัดน้ำออกจากสารสกัดด้วยการกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้เหลือปริมาตรประมาณ 35 - 40 มิลลิลิตร เทใส่กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

การหาปริมาณไขมัน

ปิเปตสารสกัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วสะอาดและแห้งที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว ระเหยตัวทำละลายให้หมดไปและชั่งน้ำหนักหาปริมาณไขมัน

การกำจัดไขมันด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

เทสารสกัดที่ได้ทั้งหมดใส่ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเฮกเซนปริมาตร 160 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เปิดฝากรวยแยกและเขย่าด้วยการหมุนด้วยมือจนไม่เกิดปฏิกิริยา ปล่อยให้แยกชั้น ทิ้งชั้นกรด (ชั้นล่าง) และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือก่อนนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 15 นาที ปล่อยให้แยกชั้น ทิ้งชั้นกรด (ชั้นล่าง) ชั้นบนเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 (m/v) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่า ปล่อยให้แยกชั้นและทิ้งชั้นล่าง ชั้นบนเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปล่อยให้แยกชั้นและทิ้งชั้นล่าง สารสกัดชั้นบนปล่อยให้ไหลผ่านโซเดียมซัลเฟตและนำไประเหยให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร

การทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย Multi-layer silica column

ชั่งซิลิกา โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์-ซิลิกา ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 30 ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 40 ซิลิกาและโซเดียมซัลเฟต ปริมาณ 1.0, 3.0, 0.5, 4.0, 2.0, 0.5 และ 3.0 กรัม ตามลำดับ ใส่ลงในคอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 มิลลิเมตร ที่อุดปลายด้วยใยแก้วเคาะให้ของแข็งดูดซับเรียงตัวเป็นระเบียบ ผ่านเฮกเซนปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง) เมื่อระดับเฮกเซนอยู่ที่ชั้นโซเดียมซัลเฟตใส่สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา ชะด้วยเฮกเซนปริมาตร 60 มิลลิลิตร รองรับสารสกัดด้วยขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ในสารสกัดนี้ประกอบด้วย สารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ปล่อยให้เฮกเซนไหลจนหยดสุดท้ายแล้วนำไประเหยให้เหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร

การแยกสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs (Fractionation)

ชั่งซิลิกา เบสิก-อะลูมิเนียมออกไซด์-ซิลิกา ซิลิกาเคลือบด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 40 ซิลิกา และโซเดียมซัลเฟต ปริมาณ 0.3, 1.8, 0.2, 0.6, 0.2 และ 1.0 กรัมตามลำดับ ใส่ลงในคอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 10 มิลลิเมตร ที่อุดปลายด้วยใยแก้วเคาะให้ของแข็งดูดซับเรียงตัวเป็นระเบียบ ผ่านเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง) ใส่สารสกัดที่ได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา ชะด้วยเฮกเซนปริมาตร 5 มิลลิลิตร รองรับสารด้วยหลอดแก้วความจุ 30 มิลลิลิตร ระบุเป็นหลอดที่ 1 (fraction 1) ชะต่อด้วยเฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน (49:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รองรับสารด้วยหลอดแก้วความจุ 30 มิลลิลิตร ระบุเป็นหลอดที่ 2 (fraction 2) และสุดท้ายชะด้วยเฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน (1:1) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร รองรับสารด้วยหลอดแก้วความจุ 30 มิลลิลิตร ระบุเป็นหลอดที่ 3 (fraction 3) ระเหยตัวทำละลายทั้งสามหลอดด้วยเครื่องระเหยแบบหลายหลอดให้เหลือประมาณ 100 ไมโครลิตร และปิเปตแต่ละหลอดใส่ใน Glass insert with spring ความจุ 300 ไมโครลิตร ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด เติมโนเนนสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCBs เจือจาง และสารละลายมาตรฐานไอโซโทป $^{13}C_{12}$-PCDDs/Fs เจือจาง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Glass insert with spring ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 วินาที ท้ายสุดของขั้นตอนนี้ปิเปตทั้ง 3 ส่วน ส่วนละ 5 ไมโครลิตร ผสมกันใส่ Glass insert with spring ใหม่ระบุเป็น vial ที่ 4 และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 วินาที (สรุปตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง ต้องได้สารสกัดใน Glass insert with spring จำนวน 4 vial)

การวัดปริมาณสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ด้วยเครื่อง HRGC/HRMS

ก่อนการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องต้องปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ (instrument tuning) ในส่วนของ HRMS ให้มีค่าการแยก (resolution at 10% valley) ให้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารในแต่ละกลุ่ม นั่นคือค่าการแยกของการวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs ต้องไม่น้อยกว่า 10,000[9] และค่าการแยกของการวิเคราะห์สารกลุ่ม DL-PCBs

และ NDL-PCBs ต้องไม่น้อยกว่า 8,000[10] ตลอดระยะเวลาในการฉีดตัวอย่าง หลังการปรับแล้วต้องสอบเทียบเครื่อง (instrument calibration) ด้วยสารมาตรฐาน เปอร์ฟลูออโรคีโรซีน (perfluorokerosene, PFK) ให้ผ่านโดยค่าการแยกต้องได้ตามที่กล่าวมา

ตั้งสภาวะของเครื่อง HRGC/HRMS เพื่อการวิเคราะห์สารทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 2) และการวัดเริ่มต้นด้วยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำสุด แล้วตรวจดูพีคที่ได้ต้องครบทุกพีคและค่า signal/noise ของแต่ละพีคต้องไม่น้อย 2.5 เมื่อผ่านตามเงื่อนไขนี้จึงเริ่มฉีดสารมาตรฐานและสารสกัดตัวอย่าง กรณีวัดสารกลุ่มไดออกซินใช้สารสกัดตัวอย่างคือส่วนที่อยู่ใน Glass insert with spring ที่ 3 และกรณีวัดสารกลุ่มพีซีบีใช้สารสกัดที่ได้จากการผสมกันจากทั้งสามส่วนคือ Glass insert with spring ที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะของเครื่อง HRGC/HRMS ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs และสารกลุ่ม DL/NDL-PCBs

หัวข้อ (subjects)	สภาวะ (conditions)	
	สารกลุ่ม PCDDs/Fs	สารกลุ่ม DL/NDL-PCBs
HRGC:		
Column	BPX-DXN, 60 m	HT8, 60 m
Injection mode	splitless	splitless
Injector temp (°C)	280	280
Oven temp program (°C)	initial temp. 150°C (hold 1 min), ramp 15°C/min to 210°C, ramp 3°C/min to 310°C, ramp 5°C/min to 320°C, ramp 10°C/min to 330°C (hold 7 min)	initial temp. 150°C (hold 1 min), ramp 20°C/min to 210°C, ramp 2°C/min to 250°C, ramp 10°C/min to 330°C, hold 22 10°C/min to 330°C (hold 7 min)
He flow (constant flow)(ml/min)	1.0	1.0
Injection volume (µl)	2	2
HRMS:		
Transfer line temp (°C)	250	250
Ion source temp (°C)	280	280
Ionization mode	EI+	EI+
Electron Energy (eV)	634	634
Trap (µA)	4.20	4.20
Scanning technique	VSIR (voltage single ion recording)	VSIR (voltage single ion recording)
Dwell time (ms)	Native compounds 100 ms, labeled	Native compounds 100 ms, labeled compounds 25 ms
VSIR1 (M, M+2 and *lock mass)* (RT range, min)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-TCDD/F and *330.9792* (18.00-22.50)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-PCB28, 52 and *292.9824* (14.00-19.00)
VSIR2 (M+2, M+4 and *lock mass*) (RT range, min)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-PeCDD/Fs and *342.9792* (22.50-26.50)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-PCB77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156 and 318.9792 (19.00-30.80)
VSIR3 (M, M+2, M+4 and *lock mass*) (RT range, min)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-HxCDDs/Fs and 380.9760 (26.50-31.00)	$^{2}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-PCB157, 167, 169, 180, 189 and 380.9760 (30.80-40.00)
VSIR4 (M, M+2, M+4 and *lock mass*) (RT range, min)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-HpCDDs/Fs and 416.9760 (31.00-35.50)	-
VSIR5 (M+2, M+4 and *lock mass*) (RT range, min)	$^{12}C_{12}$, $^{13}C_{12}$-OCDDs/Fs and 454.9728 (35.50-42.50)	-

การคำนวณ

การคำนวณแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็นการจัดการกับพีค สร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณปริมาณสารในตัวอย่างของเหลวสกัดด้วยโปรแกรม Masslynx™ v 4.1 และขั้นตอนที่สองเป็นการคำนวณหาปริมาณและสมมูลความเป็นพิษของสารแต่ละตัวในไขมันที่ได้จากตัวอย่าง รวมถึงคำนวณปริมาณผลรวมสมมูลความเป็นพิษของสารแต่ละกลุ่มโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2007

ผล

การพัฒนาวิธี

ผู้วิจัยและคณะลดปริมาณของสารมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/DFs สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-DL-PCBs และ สารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-NDL-PCBs สำหรับทำเป็น Extraction Standard ที่เติมลงในตัวอย่างก่อนการสกัด ซึ่งจะทำให้ในสารสกัดบริสุทธิ์ของตัวอย่างก่อนการฉีดเข้าเครื่อง HRGC/HRMS มีความเข้มข้นสารมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/Fs ทุกตัวเท่ากับ 2.5 พิโกกรัม/ไมโครลิตร ยกเว้น $^{13}C_{12}$-OCDD จะมี 5.0 พิโกกรัม/ไมโครลิตร และสารมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-DL-PCBs/NDL-PCBs ทุกตัวมีความเข้มข้นเท่ากับ 5.0 พิโกกรัม/ไมโครลิตร ดังนั้นจึงต้องเจือจางสารมาตรฐานสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานทั้ง 5 ระดับ เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่มดังกล่าวเท่ากับในสารละลายตัวอย่างสกัดบริสุทธิ์ และได้ทดสอบความเป็นเส้นตรง (ตารางที่ 3)

ต่อมาได้ปรับขั้นตอนการสกัด ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น และขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs (Fractionation) ซึ่งได้วิธีดังที่อธิบายไว้ในตอนต้น เพื่อยืนยันความถูกต้องและน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนานี้ ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

ในงานวิจัยนี้การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารกลุ่มดังกล่าวใช้เทคนิคการเจือจางไอโซโทป (isotope dilution) ซึ่งสร้างกราฟมาตรฐานแบบ isotope dilution calibration (ยกเว้น 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, OCDF และ PCB 138) โดยหา Relative response factor (RRF) จากการทดสอบฉีดสารมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทั้ง 5 ระดับตามที่กล่าวหัวข้อสารมาตรฐานและการเตรียม พบว่าสารทุกตัวที่ต้องการวิเคราะห์มีค่า %CV อยู่ระหว่าง 2.04 – 12.32% และการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณสาร 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, OCDF และ PCB 138 ใช้วิธี internal standard ซึ่งสร้างกราฟมาตรฐานแบบ internal standard calibration พบว่าสารทั้ง 3 ตัว ได้ค่า %CV อยู่ระหว่าง 4.34 – 7.71% ดังมีรายละเอียด (ตารางที่ 3)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างนมผงสำหรับทารก 7 ซ้ำ และใช้โปรแกรม Masslynx™ v 4.1 (TargetLynx) โดยตั้งค่าอัตโนมัติในการหา LOD และ LOQ แล้วนำมาคำนวณต่อโดยเพิ่มปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดตัวอย่างและปริมาณไขมันในตัวอย่าง (ตารางที่ 4) ซึ่งค่า LOQ ที่ได้มีความสำคัญมากและนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าปริมาณรวมความเป็นพิษของกลุ่มสาร สรุปค่า LOQ สำหรับสารกลุ่มไดออกซินมีค่า 0.06 – 0.32 pg/g fat ยกเว้น OCDD/F ยังต้องพิสูจน์อีกครั้ง และค่า LOQ สำหรับสารกลุ่มพีซีบีคล้ายไดออกซินและพีซีบีชี้บ่งมีค่า 1.85 และ 3.50 pg/g fat ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของสารแต่ละตัวในสารกลุ่ม PCDDs/Fs และสารกลุ่ม DL/NDL-PCBs

ปริมาณสารมาตรฐานและความเป็นเส้นตรง					
ชื่อสาร	ปริมาณ ต่ำสุด-สูงสุด (pg)	%CV or %RSD	ชื่อสาร	ปริมาณ ต่ำสุด-สูงสุด (pg)	%CV or %RSD
2, 3, 7, 8-TCDD	0.10 - 10.0	8.85	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.50- 25.0	5.04
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.50 - 25.0	6.14	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.50- 25.0	2.76
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.50 - 25.0	3.61	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.50- 25.0	5.06
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.50 - 25.0	3.03	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.50- 25.0	4.72
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.50 - 25.0	4.34	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.50- 25.0	7.21
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.50 - 25.0	2.04	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.50- 25.0	7.69
OCDD	1.00 - 100.0	9.18	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.50- 25.0	9.52
2, 3, 7, 8-TCDF	0.10 - 0.0	11.45	OCDF	1.00- 100.0	7.71
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.50 - 25.0	7.88			
PCB 77	0.67 - 53.33	5.89	PCB 157	0.67- 53.33	12.32
PCB 81	0.67 - 53.33	6.49	PCB 167	0.67- 53.33	6.95
PCB 126	0.67 - 53.33	4.37	PCB 189	0.67- 53.33	7.01
PCB 169	0.67 - 53.33	6.73	PCB 28	0.33- 166.67	7.30
PCB 105	0.67 - 53.33	6.78	PCB 52	0.33- 166.67	7.88
PCB 114	0.67 - 53.33	7.18	PCB 101	0.33- 166.67	7.15
PCB 118	0.67 - 53.33	4.94	PCB 138	0.33- 166.67	5.14
PCB 123	0.67 - 53.33	6.30	PCB 153	0.33- 166.67	3.79
PCB 156	0.67 - 53.33	7.41	PCB 180	0.33 - 166.67	3.34

ตารางที่ 4 ค่า LOD และ LOQ ของสารแต่ละตัวในสารกลุ่ม PCCDs/Fs และสารกลุ่ม DL/NDL-PCBs

ชื่อสาร	LOD	LOQ			ชื่อสาร	LOD	LOQ		
	(pg/g)	(pg/g)	SD	%R*		(pg/g)	(pg/g)	SD	%R*
2, 3, 7, 8-TCDD	0.05	0.06	0.02	121.4	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.05	0.32	0.06	108.9
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.05	0.32	0.06	94.4	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.05	0.32	0.08	106.4
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.07	0.32	0.06	89.4	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.05	0.32	0.06	102.3
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.07	0.32	0.10	104.7	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.08	0.32	0.05	94.9
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.07	0.32	0.17	74.7	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.07	0.32	0.11	83.6
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.06	0.32	0.08	127.7	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.06	0.32	0.08	113.6
OCDD	1.33	0.64	0.65	211.1	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.08	0.32	0.09	131.1
2, 3, 7, 8-TCDF	0.04	0.06	0.02	75.7	OCDF	1.47	0.64	0.70	271.6
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.05	0.32	0.05	132.0					
LOQ มีผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat) : lower bound							***0.732***	***0.14***	***100.3***
LOQ มีผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat) : medium bound							***0.732***	***0.14***	***100.3***
LOQ มีผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat) : upper bound							***0.732***	***0.14***	***100.3***
PCB 77	*0.35*	*1.85*	*0.48*	*103.2*	*PCB 118*	*0.28*	*1.85*	*1.29*	*105.4*
PCB 81	*0.38*	*1.85*	*0.38*	*89.3*	*PCB 123*	*0.32*	*1.85*	*0.68*	*88.9*
PCB 126	*0.56*	*1.85*	*0.85*	*98.2*	*PCB 156*	*0.72*	*1.85*	*1.16*	*104.6*
PCB 169	*0.34*	*1.85*	*0.94*	*99.4*	*PCB 157*	*0.26*	*1.85*	*2.99*	*397.4*
PCB 105	*0.35*	*1.85*	*0.80*	*116.1*	*PCB 167*	*0.22*	*1.85*	*1.04*	*98.1*
PCB 114	*0.30*	*1.85*	*0.45*	*90.4*	*PCB 189*	*1.66*	*1.85*	*0.71*	*111.2*
LOQ มีผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat) : lower bound							*0.671*	*0.10*	*98.5*
LOQ มีผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat) : medium bound							*0.671*	*0.10*	*98.5*
LOQ มีผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat) : upper bound							*0.671*	*0.10*	*98.5*
LOQ มีผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat : lower bound							***1.396***	***0.21***	***99.2***
LOQ มีผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat : medium bound							***1.396***	***0.21***	***99.2***
LOQ มีผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat : upper bound							***1.396***	***0.21***	***99.2***
PCB 28	*0.96*	*3.50*	*0.14*	*73.4*	*PCB 138*	*0.33*	*3.50*	*0.13*	*121.1*
PCB 52	*0.83*	*3.50*	*0.14*	*116.6*	*PCB 153*	*0.30*	*3.50*	*0.11*	*100.1*
PCB 101	*0.61*	*3.50*	*0.10*	*95.1*	*PCB 180*	*0.86*	*3.50*	*0.16*	*114.8*
LOQ มีผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat) : lower bound							***24.5***	***0.70***	***115.2***
LOQ มีผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat) : medium bound							***24.5***	***0.70***	***115.2***
LOQ มีผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat) : upper bound							***24.5***	***0.70***	***115.2***

* %R: ร้อยละการกลับคืน (%recovery)

ความแม่นและความเที่ยง

จากการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานกลุ่มดังกล่าวลงในตัวอย่างนมผงที่ระดับ LOQ (ตารางที่ 4) ระดับสูงสุดที่ยอมให้ตรวจพบได้ (ตารางที่ 5) การวิเคราะห์ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงนมผงของสารกลุ่มไดออกซินทุกตัวที่มีค่ามากกว่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณได้ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 87.9 – 120.6 (ตารางที่ 6) และได้เข้ารวมทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการกับ Bipea ประเทศฝรั่งเศสในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NDL-PCBs ในตัวอย่างนมผง พบว่าความเที่ยงแสดงในค่า Z-score อยู่ในช่วง -1.60 ถึง +1.35 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 5 ความแม่นและความเที่ยงของการเติมสารมาตรฐานกลุ่ม PCDDs/Fs และ PCBs ที่ระดับ ML

ชื่อสาร	spiked level (pg/g)	n = 6 %R mean ± SD	%RSD	ชื่อสาร	spiked level (pg/g)	n = 6 %R mean ± SD	%RSD
2, 3, 7, 8-TCDD	0.20	121.4 ± 8.7	8.37	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.98	104.3 ± 8.4	5.48
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.98	108.4 ± 6.3	7.06	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.98	104.6 ± 3.6	6.27
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.98	108.6 ± 5.8	6.67	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.98	102.1 ± 5.3	4.90
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.98	109.3 ± 7.2	8.54	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.98	104.1 ± 6.1	6.43
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.98	101.3 ± 11.4	13.35	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.98	103.6 ± 4.6	5.29
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - HpCDD	0.98	107.9 ± 7.3	6.95	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.98	109.3 ± 4.7	6.43
OCDD	1.96	200.2 ± 16.3	9.97	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.98	101.8 ± 3.0	5.29
2, 3, 7, 8-TCDF	0.20	112.1 ± 10.9	8.57	OCDF	1.96	228.8 ± 56.4	24.41
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.98	108.6 ± 4.2	4.53				
ผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat): lower bound					**2.420**	**108.0 ± 5.2**	**6.77**
ผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat): medium bound					**2.420**	**108.0 ± 5.2**	**6.77**
ผลรวมไดออกซิน (WHO-PCDDs/Fs, pg TEQ/g fat): upper bound					**2.420**	**108.0 ± 5.2**	**6.77**
PCB 77	22.03	104.9 ± 5.3	5.96	PCB 118	22.03	124.1 ± 5.2	6.20
PCB 81	22.03	104.6 ± 4.9	5.63	PCB 123	22.03	112.3 ± 2.5	3.33
PCB 126	22.03	114.0 ± 8.2	7.08	PCB 156	22.03	114.5 ± 4.5	3.82
PCB 169	22.03	98.3 ± 6.0	5.28	PCB 157	22.03	154.9 ± 4.6	4.34
PCB 105	22.03	132.8 ± 3.5	5.10	PCB 167	22.03	109.1 ± 3.4	3.37
PCB 114	22.03	117.5 ± 4.3	5.14	PCB 189	22.03	107.4 ± 3.0	4.14
ผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat): lower bound					3.175	110.4 ± 6.5	5.60
ผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat): medium bound					3.175	110.4 ± 6.5	5.60
ผลรวมพีซีบีคล้ายไดออกซิน (WHO-DL-PCBs, pg TEQ/g fat): upper bound					3.175	110.4 ± 6.5	5.60
ผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat: lower bound					**5.595**	**109.3 ± 4.9**	**5.02**
ผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat: medium bound					**5.595**	**109.3 ± 4.9**	**5.02**
ผลรวม WHO-PCDDs/Fs-DL-PCBs, pg TEQ/g fat: upper bound					**5.595**	**109.3 ± 4.9**	**5.02**
PCB 28	0.61	101.11± 0.7	10.58	PCB 138	0.61	100.5 ± 5.1	6.54
PCB 52	0.61	119.6± 10.0	9.00	PCB 153	0.61	103.6 ± 4.8	4.89
PCB 101	0.61	119.9± 6.0	6.06	PCB 180	0.61	161.3 ± 26.0	17.98
ผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat): lower bound					**42.30**	**115.2 ± 3.7**	**3.54**
ผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat): medium bound					**42.30**	**115.2 ± 3.7**	**3.54**
ผลรวมพีซีบีไม่คล้ายไดออกซิน (NDL-PCBs, pg/g fat): upper bound					**42.30**	**115.2 ± 3.7**	**3.54**

* %R: ร้อยละการกลับคืน (%recovery)

ตารางที่ 6 ความเที่ยงของสารแต่ละตัวในสารกลุ่ม PCDDs/Fs ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างวัสดุ อ้างอิงนมผง (Reference material No 607 Natural spray-dried milk powder)

ชื่อสาร	certified value (pg/g fat)	ปริมาณจากการวิเคราะห์ (pg/g fat)		
		ครั้งที่ 1 (%Recovery)	ครั้งที่ 2 (%Recovery)	ครั้งที่ 3 (%Recovery)
2,3,7,8-TCDD	0.25	0.24 (96.0)	0.26 (104.0)	0.26 (104.0)
2,3,7,8-TCDF	0.05	0.035 (70.0)	0.045 (90.0)	0.045 (90.0)
1,2,3,7,8-PeCDD	0.79	0.91 (115.2)	0.80 (101.3)	0.84 (106.3)
1,2,3,7,8-PeCDF	0.054	0.06 (111.1)	0.04 (74.1)	0.04 (74.1)
2,3,4,7,8-PeCDF	1.81	1.77 (97.8)	1.79 (98.9)	1.83 (101.1)
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.42	0.39 (92.9)	0.38 (90.5)	0.39 (92.9)
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.98	0.97 (99.0)	0.97 (99.0)	0.88 (89.8)
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.34	0.39 (114.7)	0.37 (108.8)	0.41 (120.6)
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.94	0.98 (104.3)	0.90 (95.7)	1.01 (107.4)
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.01	1.07 (109.9)	1.15 (113.9)	0.98 (97.0)
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.07	1.12 (104.7)	1.07 (100.0)	0.94 (87.9)

ตารางที่ 7 ความเที่ยงของสารกลุ่ม NDL-PCBs ในตัวอย่างนมผง จากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการกับ Bipea ประเทศฝรั่งเศส

ชื่อสารกลุ่ม NDL-PCBs	Assigned value (pg/g fat)	ปริมาณจากการวิเคราะห์ (pg/g fat)	ค่า Z-score	เกณฑ์การยอมรับ Z-score ± 2
PCB 28	0.80	0.40	-1.60	satisfied
PCB 52	0.80	0.60	-0.80	satisfied
PCB 101	3.5	3.0	-0.48	satisfied
PCB 138	1.6	2.1	1.00	satisfied
PCB 153	4.1	2.7	-1.12	satisfied
PCB 180	5.7	8.0	1.35	satisfied
sum of the NDL-PCBs	16.2	16.9	0.14	satisfied

วิจารณ์

ดังที่กล่าวมาแล้วการวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซินและกลุ่มพีซีบีประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ผู้วิจัยและคณะได้พัฒนาและปรับขั้นตอนต่าง ๆ คือ

1) ลดความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-PCDDs/Fs ซึ่งเป็น Extraction Standard และ Internal Standard Spiking Solution เป็น 2.5 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิธีของ US-EPA 1613 revision B[9] และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยอูเมียว (Umeå university) ประเทศสวีเดนเมื่อปี พ.ศ. 2553 และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการบริษัท IDEA Consultants, Inc. จังหวัดชิซุโอะกะ (Shizuoka) ประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2554 และงานวิจัยของ Joseph Ferrario และคณะ[12] ซึ่งใช้ในช่วง 5-100 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อให้เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในนมผงซึ่งต้องวิเคราะห์ในระดับส่วนในล้านล้านส่วน (part per trillion, ppt)

2) ลดความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานไอโซโทปกลุ่ม $^{13}C_{12}$-DL-PCBs และกลุ่ม $^{13}C_{12}$-NDL-PCBs เป็น 5 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิธีของ US-EPA 1668 revision B[10] และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยอูเมียว (Umeå university) ประเทศสวีเดนเมื่อปี พ.ศ. 2553 และวิธีที่ได้จากการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการบริษัท IDEA Consultants, Inc. จังหวัดชิซุโอะกะ (Shizuoka) ประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2554 ซึ่งใช้ในช่วง 5-500 พิโกกรัมต่อไมโครลิตร เหตุผลในการกระทำนี้เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อที่ผ่านมา

3) เพิ่มปริมาณตัวอย่างนมผงในการสกัดสารกลุ่มไดออกซินและพีซีบีเพื่อให้วิธีนี้มี LOQ เป็นไปตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป ซึ่งส่งผลให้มีสารรบกวนมากขึ้นโดยเห็นได้ชัดเจนจากการหาร้อยละการกลับคืนของ OCDD, OCDF และ PCB 157 ที่คำนวณได้ในช่วงร้อยละ 211.1-397.4 (ตารางที่ 4) ซึ่งสารทั้ง 3 ตัวนี้มีค่าสมมูลความเป็นพิษต่ำมากจึงไม่ส่งผลต่อการคำนวณร้อยละการกลับคืนของผลรวมค่าสมมูลความเป็นพิษของสารทั้งหมด

4) ลดขั้นตอนการทำให้สารสกัดตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น ปกติสารกลุ่มดังกล่าวจะถูกสกัดออกมาพร้อมกับไขมันและสารรบกวนอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณมากมายมหาศาลเมื่อเทียบกับสารที่สนใจ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นและใช้ multilayer silica column เพื่อกำจัดไขมันที่สกัดได้ประมาณ 15 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับห้องปฏิบัติการเคมีสิ่งแวดล้อม คณะเคมี มหาวิทยาลัยอูเมียว ประเทศสวีเดน[12] ที่ใช้หลักการแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (dialysis) เพื่อกำจัดไขมันที่ไม่เกิน 20 กรัม ซึ่งมีข้อเสียหลักคือต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน และต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะเจาะจง หรือ ใช้ multilayer silica column หลายคอลัมน์ ซึ่งจะต้องใช้ซิลิกาและตัวทำละลายปริมาตรมาก และฝ่ายความปลอดภัยของอาหาร สำนักยาและอาหารปลอดภัย กระทรวงสาธารณสุข ประเทศญี่ปุ่น[13] เลือกใช้ 3 วิธี เพื่อกำจัดไขมัน ได้แก่ การใช้ Acetonitrile partition การใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น และการใช้ multilayer silica column ซึ่งจะต้องใช้เวลาและตัวทำละลายมากขึ้นเมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้

5) ปรับขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม PCDDs/Fs, DL-PCBs และ NDL-PCBs ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยและคณะเลือกใช้เพียง mixed mode solid phase extraction กล่าวคือบรรจุ multilayer silica อยู่บนชั้น basic alumina ซึ่งจะช่วยลดเวลาและปริมาณสารละลายอินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอนที่ใช้คอลัมน์บรรจุของแข็งดูดซับ (solid phase extraction) ชนิด basic alumina[12] หรือ activated carbon[12, 13] และหลังจากแยกสารทั้งสามกลุ่มออกจากกันแล้ว ต้องนำทั้งสามส่วน (3 fractions) ไประเหยและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย multilayer silica column หรือ activated carbon ผสมซิลิกาอีกครั้ง ซึ่งหมายถึงต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง และยังต้องใช้สารละลายเพิ่มขึ้นด้วย หรือไม่เช่นนั้นก็ต้องใช้โทลูอีนเกรดพิเศษสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซินเท่านั้น ซึ่งล้วนเป็นข้อด้อยเมื่อเทียบกับวิธีที่ทดลองในงานวิจัยนี้

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีในแต่ละหัวข้อ ค่าที่ได้เทียบกับการประกันคุณภาพที่ยอมรับในวิธี US-EPA 1613 revision B[9] และ US-EPA 1668 revision B[10] พบว่า ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของเทคนิค isotope dilution ต้องพิจารณาจากค่า %CV ของค่า relative response ของสารมาตรฐาน 5 ระดับ ต้องไม่เกิน 20% ซึ่งเมื่อเทียบกับที่ได้ในงานวิจัยนี้มีค่าระหว่าง 2.04-12.32% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้งานและมีสารบางตัวที่ใช้เทคนิค internal standard ได้แก่ 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD, OCDF และ PCB 138 การพิจารณาความเป็นเส้นตรงต้องพิจารณาจากค่า %CV ของค่า response factor ของสารมาตรฐาน 5 ระดับ ต้องไม่เกิน 35% ซึ่งเมื่อเทียบกับที่ได้ในงานวิจัยนี้สารทั้ง 3 ตัว มีค่าระหว่าง 4.34-7.71% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้งาน

ต่อมาพิจารณาผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีในหัวข้อขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ ในวิธี US-EPA 1613 revision B[9] และ US-EPA 1668 revision B[10] ไม่มีข้อมูลสำหรับค่า LOQ ในตัวอย่างนมแต่สำหรับ

สหภาพยุโรป[14] ระบุว่า ค่า LOQ ของวิธีควรมีค่าเท่ากับเศษหนึ่งส่วนห้าของค่า ML ซึ่งในตัวอย่างนมกำหนดค่า ML ของสารกลุ่ม PCDDs/Fs เท่ากับ 2.5 pg TEQ/g fat ผลรวมของสารกลุ่ม PCDDs/Fs กับสารกลุ่ม DL-PCBs เท่ากับ 5.5 pg TEQ/g fat และสารกลุ่ม NDL-PCBs เท่ากับ 40 ng/g fat ดังนั้นค่า LOQ ของสารแต่ละกลุ่มควรมีค่าประมาณ 0.50 pg TEQ/g fat, 1.1 pg TEQ/g fat และ 8 ng/g fat ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่หาได้จากงานวิจัยนี้เท่ากับ 0.732 pg TEQ/g fat, 1.396 pg TEQ/g fat และ 0.0245 ng/g fat ตามลำดับ ถ้าพิจารณาจากค่านี้สรุปว่าวิธีวิเคราะห์นี้ต้องเพิ่มปริมาณตัวอย่างมากขึ้น เพื่อให้ได้ไขมันเพิ่มขึ้นหรือลดปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดบริสุทธิ์ลงประมาณร้อยละ 25 เพื่อให้ค่า LOQ ของสารกลุ่ม PCDDs/Fs และ LOQ ผลรวมของสารกลุ่ม PCDDs/Fs กับสารกลุ่ม DL-PCBs มีค่าไม่เกินที่สหภาพยุโรปให้การยอมรับ

ความแม่นและความเที่ยงของวิธีจากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs และ DL-PCBs ซึ่งสหภาพยุโรป[14] กำหนดไว้ที่หัวข้อจุดวิกฤติ (Analytical criteria) ของวิธีวิเคราะห์กล่าวว่า ผลรวมปริมาณความเป็นพิษสมมูลของสารกลุ่ม PCDDs/Fs สารกลุ่ม DL-PCBs และผลรวมของสารทั้งสองกลุ่ม ที่ระดับ ML หรือระดับ action level ค่าความแม่น (trueness) ของวิธีควรมีค่าอยู่ในช่วง -20% ถึง +20% พบว่างานวิจัยนี้มีค่า ± 5.2 ± 6.5 และ ± 4.9 ตามลำดับ และความเที่ยงของ within-laboratory reproducibility (RSDR) ของวิธีควรมีค่าน้อยกว่า 15% ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่า 6.77, 5.60 และ 5.02 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าเหล่านี้ กล่าวได้ว่าเหมาะสำหรับนำไปใช้งาน

ความแม่นและความเที่ยงของวิธีจากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NDL-PCBs ซึ่งสหภาพยุโรป[14] กำหนดไว้ที่หัวข้อจุดวิกฤติของวิธีวิเคราะห์ (analytical criteria) ที่ระดับ ML หรือระดับ action level ค่าความแม่น (trueness) ของวิธีควรมีค่าอยู่ในช่วง -30% ถึง +30% พบว่างานวิจัยนี้มีค่า ± 3.7 และความเที่ยงของ intermediate precision (RSD) ของวิธีควรมีค่า ≤ 20% ซึ่งงานวิจัยนี้มีค่า 3.54 เมื่อพิจารณาจากค่าเหล่านี้ กล่าวได้ว่าเหมาะสำหรับนำไปใช้งาน

นอกเหนือจากการเติมสารมาตรฐานที่สนใจลงในตัวอย่างก่อนสกัด ผู้วิจัยและคณะยังได้ประเมินความแม่นของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม PCDDs/Fs ในนมผงอ้างอิง (reference material No 607 Natural spray-dried milk powder) ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ certified value พบว่าใกล้เคียงหรือเมื่อคำนวณเป็นร้อยละการกลับคืนได้ค่าในช่วง 70.0-120.6 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารในระดับ ppt และยังได้ประเมินความแม่นของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม NDL-PCBs ในนมผงโดยเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญการกับองค์กรในประเทศฝรั่งเศส ผลการประเมินได้ค่า Z-score อยู่ระหว่าง ±2 ซึ่งถือว่าพึงพอใจ

สรุป

ผลการศึกษาได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้คือ ได้วิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไดออกซิน พีซีบี-คล้ายไดออกซิน และพีซีบีไม่คล้ายไดออกซินในตัวอย่างนมผงด้วย HRGC/HRMS ซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและต้นทุนต่อหน่วย และได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าเหมาะสมสำหรับนำไปใช้งาน สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอรับรองระบบมาตรฐานสากล ISO/IEC17025:2005 และใช้ในงานให้บริการหรืองานวิจัยเชิงสำรวจการปนเปื้อนของสารทั้งสามกลุ่มในนม และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศหรือนำเข้าจากต่างประเทศต่อไป แต่มีข้อควรระวังคือเมื่อมีการตรวจพบสาร OCDD, OCDF และ PCB 157 ปนเปื้อนในตัวอย่างนมผงปริมาณสูงที่ส่งผลกระทบต่อค่าผลรวมสมมูลความเป็นพิษมากกว่าร้อยละ 10 ควรทดลองหาวิธีอื่นเพิ่มเติมเพื่อกำจัดสารรบกวนและเมื่อได้ค่าที่พอใจจึงรายงานผล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวจารุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร นางลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์ อดีตผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารให้การสนับสนุนการทำงานและข้อเสนอแนะ นางพลอยแก้ว เอี่ยมศิริ ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาตัวอย่างและแจกแจงรายละเอียดตัวอย่าง ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Official Journal of the European Union. Commission regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs [online]. 2011; [cited 2015 Sep 14]; [8 screens]. Available from: URL: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32011R1259
2. Reports on tasks for scientific cooperation: assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU Member States. 7 June 2000. Brussels: European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General; 2000.
3. European Food Safety Authority. Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. EFSA Journal 2010; 8(3): 1385. [36 p.]
4. Schrenk D, Chopra M. Dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in foods [online]. 2013; [cited 2016 April 1]. Available from: URL: https://books.google.co.th/books?id=-4JwAgAAQBAJ&pg=PA191&lpg=PA191&dq=Dioxins+and+polychlorinated+biphenyls+(PCBs)+in+foods+D.+Schrenk+and+M.+Chopra.
5. Lake IR, Foxall CD, Fernandes A, Lewis M, Rose M, White O, et al. The effects of flooding on dioxin and PCB levels in food produced on industrial river catchments. Environ Int 2015; 77: 106-15.
6. Malisch R, Kotz A. Dioxins and PCBs in feed and food--review from European perspective. Sci Total Environ 2014; 491-492: 2-10.
7. Debacker N, Sasse A, van Wouwe N, Goeyens L, Sartor F, van Oyen H. PCDD/F levels in plasma of a Belgian population before and after the 1999 Belgian PCB/DIOXIN incident. Chemosphere 2007; 67(9): S217-23.
8. Ghimpeteanu OM, Militaru M, Scippo ML. Dioxins and polychlorinated biphenyls contamination in poultry liver related to food safety – a review. Food Control 2014; 38: 47-53.
9. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division Method 1613 tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS [online]. 1994; [cited 2015 Sep 14]; [89 screens]. Available from: URL: http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_1613b_1994.pdf
10. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division Method 1668B Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS [online]. 2008; [cited 2015 Sep 14]; [128 screens]. Available from: URL: http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1005EUE.PDF?Dockey=P1005EUE.PDF
11. Environmental chemistry laboratory, Department of Chemistry, Umeå University, Analysis of chlorinated aromatic compounds in environmental samples, 10-12-2009. Sweden.
12. Ferrario J, Byrne C, McDaniel D, Dupuy A, Harless R. Determination of 2, 3, 7, 8-chlorine-substituted dibenzo-p-dioxins and –furans at the part per trillion level in United States beef fat using high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry. Anal Chem 1996; 68: 647-52.

13. Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare. Guideline for determination of dioxins in food (interim, tentative translation). Feb 2007. Japan
14. Official Journal of the European Union. Commission regulation (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012 [online]. 2014; [cited 2015 Sep 14]; [26 screens]. Available from: URL: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32014R0589

Method Development and Validation for analysis of Dioxins, Dioxin-like PCBs and Non Dioxin-like PCBs in Milk Powder by HRGC/HRMS

Supat Sangsuay Sirichai Sunya and Sirinnicha Seemachaisin
Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Broad toxic and biochemical effects for PCDDs/Fs, DL-PCBs, and NDL-PCBs have been reported in laboratory animals. The most sensitive endpoints are developmental neurobehavioral effects, developmental reproductive effects and immunotoxic effects. More than 90% of human exposure is through food, mainly meat, fish and shellfish, milk and dairy products. It is widely known that the determination of PCDDs/Fs and DL/NDL-PCBs requires special expertise, sophisticated instrumentation as well as a lot of time, manpower and chemical substances. The objective of this study is to develop and to validate a method of analysis of PCDDs/Fs and DL/NDL-PCBs in milk powder. Based on EPA 1613B and 1668B method, the method had been modified by increasing sample weight, changing and adjusting some chemical substances in extraction, cleaning-up procedures and separation of PCDDs/Fs, DL-PCBs and NDL-PCBs in which the limits of quantitation correspond to 0.06 – 0.64, 1.85 and 3.50 pg/g fat, respectively.

Key words: Dioxins, Dioxin-like PCBs, indicator PCBs, milk powder, extraction, HRGC/HRMS