

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และการลดปริมาณสารรม เมทิลโบรไมด์ในรูปของโบรไมด์อนินทรีย์ทั้งหมด ในข้าวสารโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

วีรุณี วิทยานันท์ และวิชาดา จงมีวาสนา

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

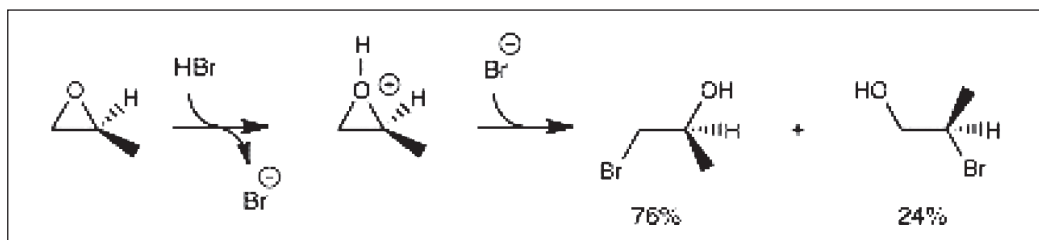
บทคัดย่อ เมทิลโบรไมด์เป็นสารรม (Fumigant) ตัวหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการเก็บรักษาข้าวสารทั้งก่อนและหลังบรรจุลงก่อนนำออกจำหน่ายเพื่อกำจัดแมลงและศัตรูพืช เมื่อมีการรมซ้ำหลายครั้งจะทำให้เกิดการตกค้างของสารดังกล่าวในรูปของโบรไมด์อนินทรีย์ (inorganic bromide) จึงได้พัฒนาวิธีที่ปรับปรุงจาก Stijve method ให้ใช้วิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของโบรไมด์อนินทรีย์ในข้าวสารเพื่อตรวจสอบคุณภาพข้าวสารที่ผ่านการรมสารดังกล่าว โบรไมด์อนินทรีย์ในตัวอย่างข้าวสารที่บดแล้วจะสามารถละลายออกมาในน้ำที่มีสภาวะเป็นกรด และทำปฏิกิริยากับ propylene oxide ทำให้เป็นอนุพันธ์ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol แล้วสกัดให้อยู่ในส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อตรวจปริมาณด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดไมโครอีซีดี (GC- μ ECD) สามารถตรวจวัดสารโบรไมด์อนินทรีย์โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ที่ 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ %recovery ที่ระดับ 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อวิเคราะห์แบบใช้สารมาตรฐานภายนอก (external standard calibration) เท่ากับ 96.9, 93.4 และ 94.3% ตามลำดับ และเมื่อใช้ 3-bromopropane-1-ol ในการวิเคราะห์แบบใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard calibration) เท่ากับ 94.5, 89.2 และ 86.9% ตามลำดับ มีความเที่ยงแสดงด้วยค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ผลการวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ ทั้งสองกรณีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) มีความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range) ในช่วง 5-75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) เท่ากับ 0.999 วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และสามารถรองรับค่ามาตรฐานตามข้อกำหนดของคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (CODEX) และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 361) พ.ศ. 2556 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้างที่ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

บทนำ

เมทิลโบรไมด์เป็นสารรม (fumigant) ชนิดหนึ่งที่มีรายงานการใช้งานครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2475 ที่ประเทศฝรั่งเศส⁽¹⁾ เนื่องจากมีสถานะเป็นก๊าซที่อุณหภูมิปกติ ไม่มีสีและกลิ่น ไม่ติดไฟ ไม่ระเบิด มีความสามารถแทรกซึมสูง รวดเร็วและทั่วถึง จึงนิยมใช้ป้องกันและกำจัดแมลงและสัตว์ใต้ในทุกระยะการเติบโตใช้ฉีดพ่นดินในขั้นตอนการเพาะปลูกและใช้รมผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในขั้นตอนการเก็บรักษา ก่อนการขนส่งและการจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์ เช่น อาหารและเฟอร์นิเจอร์ และใช้รมโครงสร้างไม้ก่อนการปลูกสร้างอาคารเพื่อป้องกันแมลงกัดกินเนื้อไม้^(2, 3) อันตรายต่อคนจะเกิดจากการหายใจทำความระคายเคืองต่อปอดและเป็นพิษต่อระบบประสาท ในระยะสั้นจะมีอาการ ได้แก่ ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน การเป็นพิษอย่างเฉียบพลันทำให้เป็นอัมพาต ชัก หากอาการรุนแรงอาจถึงแก่ชีวิต^(4, 5, 6, 7)

ประเทศไทยนำเข้าเมทิลโบรไมด์ (สารเดี่ยว) และในรูปสารผสมของเมทิลโบรไมด์กับคลอโรพิกรีน (methyl bromide+chloropicrin) ในช่วง พ.ศ. 2550-2555 ปริมาณเฉลี่ย 357.69 และ 103.85 ตันต่อปีตามลำดับ ซึ่งสารดังกล่าวถูกจัดให้เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายควบคุมโดยกรมวิชาการเกษตร⁽⁸⁾ และเป็นสารพิษตกค้างจากวัตถุอันตรายทางการเกษตรในอาหารที่ระบุในบัญชีหมายเลข 1 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 361) พ.ศ. 2556 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 2)⁽⁹⁾ แต่เนื่องจากประเทศไทยได้ให้สัตยาบันเข้าร่วมเป็นภาคีสมาชิกพิธีสารมอนทรีออล (Montreal Protocol) ว่าด้วยการปกป้องชั้นบรรยากาศโอโซนเมื่อปี พ.ศ. 2532 ทำให้ต้องปฏิบัติตามพันธกรณี คือ ควบคุมปริมาณการนำเข้าสารเมทิลโบรไมด์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ไม่ให้เกินระดับค่าเฉลี่ยของปริมาณการใช้ของปี พ.ศ. 2538-2541 และในปี พ.ศ. 2548 ให้ลดลงร้อยละ 20 และยกเลิกการใช้ภายในสิ้นปี พ.ศ. 2558⁽¹⁰⁾

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ของโลก เพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องใช้สารเมทิลโบรไมด์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการขนส่งและจัดจำหน่ายข้าว การใช้สารดังกล่าวซ้ำหลายครั้งจะทำให้เกิดการสะสมและตกค้างอยู่ในรูปของสารโบรไมด์อนินทรีย์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์โดยการย่อยและเผาแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-ray fluorescence⁽¹¹⁾ โดยวิธี neutron activation analysis⁽¹²⁾ โดยวิธี selective ion electrode⁽¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีการตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เช่น วิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Mitsuhashi^(14, 15) เมื่อ พ.ศ. 2530 โดยย่อยตัวอย่างด้วยต่างแล้วนำไปเผาให้เป็นแก๊สก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) วิธีเหล่านี้มีขั้นตอนที่ซับซ้อน อุปกรณ์ตรวจวัดบางชนิดมีราคาสูง ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน และมีข้อจำกัดเรื่องความจำเพาะเจาะจง (specificity) จึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของข้าวสารที่จำหน่ายในประเทศไทยและติดตามสถานการณ์การตกค้างของโบรไมด์อนินทรีย์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงสารตกค้างจากสารกำจัดศัตรูพืชของสหภาพยุโรป⁽¹⁶⁾ (European Reference Laboratories, EURL for Residues of Pesticides) และวิธีนี้กำลังถูกเสนอให้ Codex Alimentarius Commission รับเป็นวิธีแนะนำตาม CL 2005/52-PR, December 2005, CX 4/40.2 เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่อ้างอิงวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Stijve⁽¹⁷⁾ เมื่อ พ.ศ. 2524 โดยการทำให้โบรไมด์อนินทรีย์ที่ตกค้างในเมล็ดข้าวสารเป็นอนุพันธ์ในรูปของ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol ก่อนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง GC-μECD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูงเนื่องจากอนุพันธ์ที่ได้จะมีสองชนิด คือ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol และมีอัตราส่วนเป็น 3 ต่อ 1 เสมอ (ภาพที่ 1) ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือในการตรวจยืนยันที่ซับซ้อนและมีราคาแพง



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยา nucleophilic addition ชนิด SN2 ของสาร propylene oxide ที่เป็น enantiomers (R, S) กับโบรไมด์นิตริในสภาวะกรดให้ไอโซเมอร์ 2 ชนิดที่มีสัดส่วน 3 ต่อ 1

วิธีที่อ้างอิง⁽¹⁶⁾ ต้องใช้ 3-bromopropane-1-ol เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) สำหรับการคำนวณผล การวิเคราะห์ต้องใช้เวลานานเนื่องจากพีคของ internal standard จะมีโอกาสซ้อนทับกับพีคของสารที่สนใจ การวิเคราะห์แบบ external standard calibration สามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ ประหยัดสารเคมีและค่าใช้จ่าย จึงทำการทดสอบความแม่นยำสำคัญทางสถิติระหว่างการคำนวณผลแบบ internal standard calibration (ISTD) กับ external standard calibration (ESTD) ที่ระดับ limit of quantitation (LOQ=5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เมื่อการคำนวณทั้งสองแบบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็สามารถงดเว้นการใช้ internal standard นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวสารทั้งเมล็ดกับชนิดที่บดละเอียด ศึกษาการลดปริมาณโบรไมด์นิตริที่ตกค้างในเมล็ดข้าวสารที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ การล้างน้ำด้วยปริมาณและจำนวนครั้งที่ต่างกัน การเก็บที่อุณหภูมิที่ต่างกัน การเปิดภาชนะทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ กัน เพื่อศึกษาการคงตัว และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในการทำให้ปริมาณการตกค้างของโบรไมด์นิตริลดลงก่อนการหุงต้มและปลอดภัยต่อการบริโภค

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : potassium bromide (purity 99.999%) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมนี

สารเคมี : ethyl acetate HPLC grade, 3M sulfuric acid, 3-bromopropane-1-ol (for synthesis), ammonium sulfate (for analysis) และ sodium sulfate anhydrous (AR) granular ขนาด 12-60 mesh (เผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง), 1, 2-propylene oxide (for synthesis) เก็บที่ต่ำกว่า 11 องศาเซลเซียส ใช้เตรียม propylene oxide solution โดยละลาย 1, 2-propylene oxide 4 กรัม หรือปริมาตร 4.8 มิลลิลิตรในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะต้องทำการเตรียมใหม่ก่อนการใช้งานทุกครั้ง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. potassium bromide stock solution: เตรียมสารละลายคิดเป็นความเข้มข้นของ bromide ion 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสาร potassium bromide 149 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. potassium bromide working solution: เตรียมสารละลายคิดเป็นความเข้มข้นของ bromide ion 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจาง stock solution 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. internal standard solution: เจือจาง 3-bromopropane-1-ol ปริมาณ 0.637 มิลลิลิตร (เท่ากับ 1 กรัม, density=1.57 กรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วย ethyl acetate จนครบ 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม stock solution

หลังจากนั้นนำ stock solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย ethyl acetate จนครบ 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม working solution (เท่ากับ 3-bromopropane-1-ol เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดป่นอาหาร (Waring Commercial, Model: HGTWT), เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง และ 5 ตำแหน่งสำหรับชั่งสารมาตรฐาน, micropipette, liquid dispenser, screw cap glass vial ที่มี PTFE/Silicone Septa ขนาด 60 ml, ตู้แช่แข็ง -15 องศาเซลเซียส, certified volumetric flask, shaker, GC- μ ECD; Agilent Technology 6890N โดยใช้ analytical column: DB-Wax, 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างข้าวสารจากบรรจุภัณฑ์ขนาด 5 กิโลกรัม มาคลุกผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งเป็นสี่ส่วนเท่า ๆ กัน สุ่มตัวอย่างสองส่วนนำมาคลุกผสมกันอีกครั้ง แล้วชั่งแบ่งตัวอย่างประมาณ 500 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปิดสนิทไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง มาบดละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดป่นอาหาร ให้มีขนาดเล็กกว่า 20 mesh ชั่งแบ่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กรัม เพื่อเป็น analytical portions และตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

การสกัดและการทำให้เป็นอนุพันธ์ (Extraction and Derivatization)

การเตรียม calibration solutions

เติม potassium bromide working solution ปริมาณ 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิลิตร หรือเท่ากับ bromide ion ปริมาณ 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม ลงในน้ำกลั่น 7.9, 7.5, 7.0, 6.0 และ 5.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อให้ได้ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงใน screw cap glass vials ขนาด 60 มิลลิลิตร และเตรียม method blank โดยการเติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว

การทำให้เป็นอนุพันธ์ (Derivatization)

นำตัวอย่างข้าว 2 กรัม (analytical portions) มาใส่ลงใน screw cap glass vials ขนาด 60 ml เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วแช่ตัวอย่างไว้ 20 นาที นำหลอดที่บรรจุตัวอย่างและหลอดที่บรรจุสารมาตรฐาน ที่เตรียมทำ calibration curve มาเติม propylene oxide solution 5 มิลลิลิตร และสารละลาย 3M sulfuric acid 1 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าเร็ว ๆ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การสกัด (Extraction)

เติม ethyl acetate 40 มิลลิลิตร และ ammonium sulfate 4 กรัม ลงใน screw cap glass vials จากการเตรียม calibration solutions และการทำให้เป็นอนุพันธ์ (derivatization) เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที หรือจน ammonium sulfate ละลายหมด และตามด้วย shaker ความเร็ว 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นสารละลายอินทรีย์ (organic phase) ด้านบน จากนั้นนำสารสกัดของตัวอย่างและ calibration solutions 1 มิลลิลิตร ใส่ใน GC-vials ดึงน้ำออกด้วยการเติม sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) ประมาณ 0.1 กรัม ลงใน GC-vials เติม internal standard working solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน GC-vials ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC- μ ECD โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (clean up)

การตรวจวัดปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ด้วยเครื่อง GC-μECD

ใช้เครื่องมือ GC-μECD โดยมีสภาวะเครื่องมือ ดังนี้

column: DB-Wax, 30 m, ID 0.25 mm, 0.25 μm film thickness

temperature: injector: 220 °C, pulsed splitless mode,

oven: initial 50 °C, hold 1 min, rate 5 °C/min to 140 °C, rate 30 °C/min to 180 °C

detector: μECD with nitrogen make up 60 ml/min, 200 °C

flow rate: helium (constant flow): 1.5 ml/min

injection volume: 1 μl

การคำนวณปริมาณ

ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ คำนวณโดยใช้เทคนิค internal และ/หรือ external calibration เปรียบเทียบกับ calibration curve (ความเข้มข้น 5 ระดับ) จากสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ ปริมาณสารที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือไมโครกรัมต่อกรัม) เท่ากับ $(Y-b)/2a$ เมื่อ X คือ ปริมาณสารมาตรฐาน (ไมโครกรัม) Y คือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน a คือความชันของกราฟมาตรฐาน 2 คือ ปริมาณข้าวสารที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม) และ b คือ จุดตัดแกน Y

การทดสอบความถูกต้องของวิธี⁽¹⁸⁾

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

นำสารละลายที่ได้จากการเตรียม calibration solution สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค โดยปริมาณของโบรไมด์นินทรีย์คือผลรวมของพีคทั้งสองอนุพันธ์ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r)

การวิเคราะห์ Method blank และ Matrix blank

ทำ method blank โดยดำเนินการตามวิธีทำให้เป็นอนุพันธ์และวิธีสกัดโดยใช้สารเคมีทั้งหมดโดยปราศจากตัวอย่างและทำ matrix blank โดยดำเนินการตามวิธีทำให้เป็นอนุพันธ์และวิธีสกัด (8 ขั้ว) โดยใช้ตัวอย่างเป็นข้าวสารที่ไม่มีการตกค้างของโบรไมด์นินทรีย์ ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์ method blank และ matrix blank เพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากการปนเปื้อนของสารเคมีและจากอุปกรณ์ที่ใช้ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลการวิเคราะห์

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

หาค่า LOD จากสองวิธีดังต่อไปนี้ วิธีแรกกำหนดค่า LOD โดยคำนวณจากสัญญาณของ spiked sample blank โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 8 ขั้ว คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการ $LOD=3SD$

วิธีที่สองคำนวณค่า LOD จากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้วิธี simple least squares method ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวัด โดยใช้ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ขั้ว คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $y_{intercept}$ ($SD_{intercept}$) จากสมการที่ 1 แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการที่ 2 โดยที่ $y_{intercept}$ คือสัญญาณที่อ่านได้บนแกน y เมื่อ $x=0$ นำผลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบและพิจารณากำหนดค่า LOD ตามความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

$$SD_{\text{intercept}} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y^{\wedge})^2}{(n-2)}}$$

.....สมการที่ 1

y_i คือ ค่าสัญญาณที่อ่านจากเครื่อง GC- μ ECD คำนวณให้เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

$y^{\wedge}$ คือ ค่าสัญญาณที่ควรจะเป็นบนกราฟมาตรฐาน

n คือ จำนวนจุดระดับความเข้มข้นบนกราฟมาตรฐาน

$$LOD = y_{\text{intercept}} + 3SD_{\text{intercept}}$$

.....สมการที่ 2

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

กำหนดค่า LOQ จากเกณฑ์ LOQ น้อยกว่าหนึ่งในสิบส่วน ($LOQ < 1/10$) ของค่าอ้างอิง (target value) โดยค่า MRL ที่กำหนดโดย CODEX ของโบรไมไดไนทรีนในข้าวคือ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวสาร (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 80-110 และ HORRAT (Horwitz ratio) กำหนดเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, CODEX และ EU มีค่าน้อยกว่า 2 จากสมการที่ 3

$$HORRAT = \frac{RSD_{\text{observed}}}{RSD_{\text{expected}}}$$

.....สมการที่ 3

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

ศึกษา linearity ของ calibration curve โดยการเตรียมสารมาตรฐานสารโบรไมไดไนทรีนปริมาณต่าง ๆ 5 ระดับ ได้แก่ 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม ผ่านการทำให้กลายเป็นอนุพันธ์ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol นิดสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC- μ ECD ตามสภาวะเครื่องมือที่ระบุความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ศึกษา linearity ของ working range โดยการเติมสารมาตรฐานโบรไมไดไนทรีนในตัวอย่างข้าวสาร (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวสาร (sample blank) ที่ระดับ LOQ, $5 \times LOQ$ และ $10 \times LOQ$ ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 8 ซ้ำ แล้วคำนวณ % recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 80-110 % และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): HORRAT มีค่าน้อยกว่า 2

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement of uncertainty)⁽¹⁹⁾

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งปริมาณสารที่พบคำนวณจากการวิเคราะห์โดย GC- μ ECD และคำนวณผลโดยเทคนิค calibration curve

การทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ระหว่างการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ESTD กับวิธี ISTD⁽²⁰⁾

คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์หาได้โดยการนำผลที่ได้จากการคำนวณที่ระดับ LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ของการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี ESTD และ ISTD ในการวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน ทำการประเมินค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความแปรปรวน (standard deviation) ด้วยสถิติ โดยข้อมูลทั้งสองชุดจะถูกนำมาทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบค่าความแปรปรวนด้วย F-test และทดสอบค่าเฉลี่ยด้วย t-test

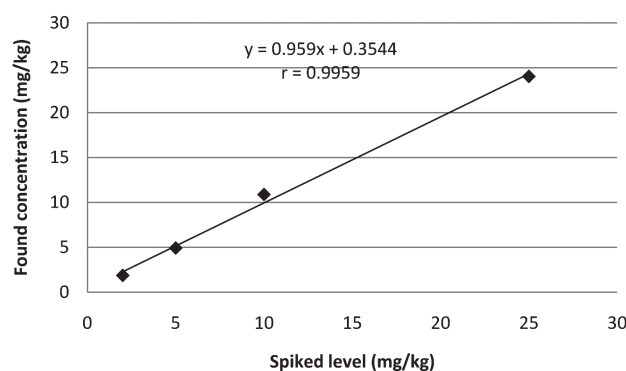
การศึกษาการลดลงของปริมาณโบรไมไดโนนทรีนในเมล็ดข้าวสารที่สภาวะต่าง ๆ

วิเคราะห์ปริมาณโบรไมไดโนนทรีนที่ตกค้างในเมล็ดข้าวสารชนิดทั้งเมล็ดเปรียบเทียบกับชนิดบดละเอียด เปรียบเทียบปริมาณการลดลงของปริมาณโบรไมไดโนนทรีนในข้าวสารปริมาณ 2 กรัม ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น แบบที่ 1 ล้างตัวอย่าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร แบบที่ 2 ล้างตัวอย่าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร และแบบที่ 3 ล้างตัวอย่าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เปรียบเทียบปริมาณโบรไมไดโนนทรีนในข้าวสารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส กับข้าวสารที่เปิดไว้ทั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7, 14, 30 และ 120 วัน ตามลำดับ

ผล

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์โบรไมไดโนนทรีนด้วย GC- μ ECD ภายใต้สภาวะที่กำหนด สามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารดังกล่าวได้ในช่วง 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม โดยมีค่า r เท่ากับ 0.999 และตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน เมื่อทำการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

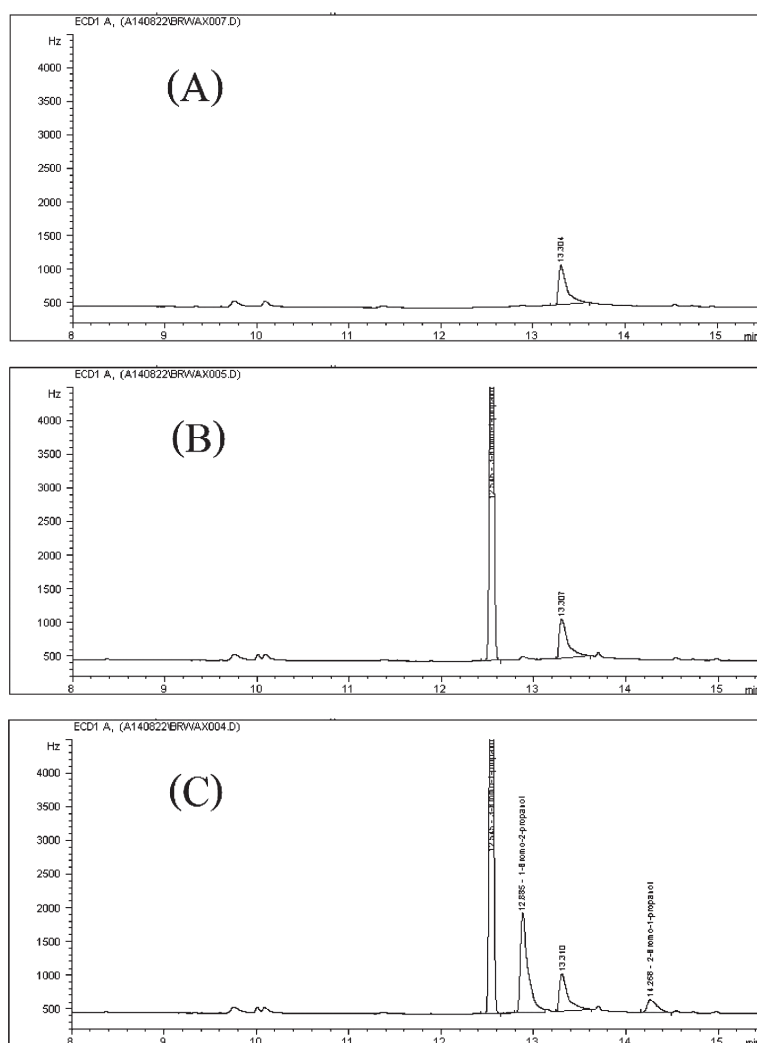
ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ที่ได้จากการคำนวณจากสามเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3SD) ของการวัดที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ เมื่อ SD=0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นคำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank โดยสร้างกราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวัดที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ซ้ำ ได้ $y_{\text{intercept}} = 0.3544$ และ $r = 0.9959$ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟ spiked sample blank ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีสมการเส้นตรงคือ $y = 959x + 0.3544$ โดยมีค่า $r = 0.9959$ ใช้คำนวณ LOD

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $y_{\text{intercept}}$ จากสมการที่ 1 จะได้ $SD_{\text{intercept}} = 0.771$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการ $LOD = y_{\text{intercept}} + 3SD_{\text{intercept}}$ ได้ $LOD = 2.67$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการคำนวณค่า LOD จากทั้งสองกรณีพบว่า มีค่า 0.20 และ 2.67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากความเหมาะสมสอดคล้องกับการใช้งานจึงกำหนดค่า LOD เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วทำการยืนยันค่า LOD โดยการวิเคราะห์ที่ระดับ LOD จำนวน 8 ซ้ำ ได้ %recovery และ HORRAT เป็น 93% และ 0.4 ตามลำดับ ($\text{mean} \pm SD = 1.86 \pm 0.07 \text{ mg/kg}$) โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำ (%recovery) จากการวิเคราะห์ซ้ำสารที่เติมสารมาตรฐาน จำนวน 8 ซ้ำ ที่ระดับ LOQ เท่ากับ 96.9% (external standard calibration, ESTD) และ 94.5% (internal standard calibration, ISTD) และความเที่ยงจาก HORRAT เท่ากับ 0.4 (ESTD) และ 0.5 (ISTD)

จาก chromatogram (ภาพที่ 3) อนุพันธ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโบรไมด์อินทรีย์กับ propylene oxide คือ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol โดยมี retention time (RT)=12.89 นาที และ 14.27 นาทีตามลำดับ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 20 นาที (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์โบรไมด์อินทรีย์ด้วยเครื่อง GC- μ ECD (a) ข้าวสารที่เป็น blank (b) พีคของ internal standard (3-bromopropane-1-ol) มี RT=12.55 นาที และ (c) Blank ที่เติม bromide ion เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงพีคอนุพันธ์ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol ที่ RT=12.89 นาที และ 14.27 นาทีตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่า Retention time (RT) ของ internal standard และสารอนุพันธ์ของโบรไมด์นินทรีย์

Compound	Retention time (RT) (min)
3-bromopropane-1-ol (internal standard, IS)	12.55
1-bromopropane-2-ol	12.89
2-bromopropane-1-ol	14.27

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range) พบว่าการวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า r เท่ากับ 0.999 (ESTD และ ISTD) มีความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีที่ระดับ LOQ, $5 \times \text{LOQ}$ และ $10 \times \text{LOQ}$ ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบความแม่นยำ (accuracy) ที่ประเมินจาก % recovery ที่ทั้ง 3 ระดับเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ESTD เท่ากับ 96.9, 93.4 และ 94.3% ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ISTD เท่ากับ 94.5, 89.2 และ 86.9% ตามลำดับ ความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย HORRAT เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ESTD เท่ากับ 0.4, 0.4 และ 0.4 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ISTD เท่ากับ 0.5, 0.4 และ 0.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารที่ระดับความเข้มข้น 5 (LOQ), 25 ($5 \times \text{LOQ}$) และ 50 ($10 \times \text{LOQ}$) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์โดยใช้ ESTD และ ISTD

Calibration	Spike level method	mean $\pm$ SD (mg/kg)	% Recovery	%RSD (n=8)	HORRAT
External standard	5	4.8 ± 0.2	96.9	3.29	0.4
	25	23.3 ± 0.9	93.4	3.64	0.4
	50	47.1 ± 1.6	94.3	3.35	0.4
Internal standard	5	4.7 ± 0.2	94.5	4.48	0.5
	25	22.3 ± 0.8	89.2	3.53	0.4
	50	43.4 ± 1.2	86.9	2.83	0.4

การทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ระหว่างการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ESTD กับวิธี ISTD นั้นทำได้โดยการทดสอบค่าความแปรปรวน (SD) และค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูลทั้งสองชุด เมื่อค่า mean $\pm$ SD ของการวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารที่ระดับความเข้มข้น LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ของการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ESTD และวิธี ISTD เท่ากับ 4.8 ± 0.7 และ 4.7 ± 0.2 ตามลำดับ ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าความแปรปรวน (variance) ของข้อมูล 2 ชุดโดยใช้ F-test คำนวณค่า $F_{\text{calculated}}$ จากสมการที่ 4 จะได้ค่า $F_{\text{calculated}} = 1.760$ เมื่อ $n_1 = n_2 = 8$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 95% ($\alpha = 0.05$) ได้ค่า $F_{\text{critical}} = 5.119$ จะได้ $F_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า F_{critical} หรือข้อมูล 2 ชุดที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ ESTD และ ISTD ไม่มีความแตกต่างของค่าความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$$F_{\text{calculated}} = \frac{(SD_{\text{ISTD}})^2}{(SD_{\text{ESTD}})^2}$$

.....สมการที่ 4

ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญโดยใช้ t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูล 2 ชุด โดยคำนวณค่า $t_{\text{calculated}}$ จากสมการ 5 และ SD_{pool} จากสมการ 6 เมื่อ SD_{pool} ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.187 จะได้ค่า $t_{\text{calculated}} = 0.32$ เมื่อ degrees of freedom = $n_1 + n_2 - 2 = 14$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) ได้ค่า $t_{\text{critical}} = 2.14$ ได้ $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า t_{critical} หรือข้อมูล 2 ชุดที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี ESTD และวิธี ISTD ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$$t_{\text{calculated}} = \frac{(\text{mean}_1 - \text{mean}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) SD_{\text{pooled}}^2}}$$

.....สมการที่ 5

$$SD_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times SD_1^2 + (n_2 - 1) \times SD_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}}$$

.....สมการที่ 6

ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ที่ตรวจพบในตัวอย่างข้าวสารที่เป็น incurred sample ระหว่างข้าวสารทั้งเมล็ด (whole grain) และข้าวบดละเอียด (ground sample) โดยนำตัวอย่างข้าวที่ตรวจพบ bromide ion ทำการวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นแบบใช้ internal standard calibration โดยใช้ข้าวสารทั้งเมล็ดที่ยังไม่บดเปรียบเทียบกับตัวอย่างเดียวกันที่บดละเอียด จำนวน 3 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยของการตรวจพบโบรมไดอนินทรีย์ในข้าวสารทั้งเมล็ดเท่ากับ 24.4 ± 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ในข้าวสารที่บดละเอียดเท่ากับ 37.6 ± 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ที่ตรวจพบในข้าวสารชนิดบดละเอียดมีค่ามากกว่าข้าวทั้งเมล็ด

รายงานของ Nakamura และคณะ⁽²¹⁾ ได้ระบุถึงผลการลดปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ในข้าวจากการทดลองแบบต่างๆ แต่ยังไม่มียางานออกมามาก หลังจากนั้นจึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ระหว่างตัวอย่างข้าวบดละเอียดที่ผ่านกระบวนการวิเคราะห์ตามปกติ ตัวอย่างข้าวที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 ครั้ง, 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และ 8 มิลลิลิตร 1 ครั้ง อย่างละ 3 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยของการตรวจพบโบรมไดอนินทรีย์ในข้าวสารคือ 37.6 ± 2.5 , 19.7 ± 0.2 , 8.5 ± 0.4 และ 17.2 ± 1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ การล้างน้ำปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 ครั้ง, 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และ 8 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ทำให้ปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ที่ตกค้างในข้าวลดลง 47.6, 77.3 และ 54.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ที่ตรวจพบในข้าวสารที่ได้จากการทดลองประเภทต่าง ๆ

การทดลอง	ปริมาณ bromide ion (mg/kg) (3 ซ้ำ) mean $\pm$ SD
ข้าวสารทั้งเมล็ด	24.4 $\pm$ 1.5
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh)	37.6 $\pm$ 2.4
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh) ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ml 1 ครั้ง	19.7 $\pm$ 0.2
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh) ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ml 2 ครั้ง	8.5 $\pm$ 0.4
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh) ล้างด้วยน้ำกลั่น 8 ml 1 ครั้ง	17.2 $\pm$ 1.2

เมื่อทำการทดลองศึกษาผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ระหว่างตัวอย่างข้าวสารบดละเอียดที่บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และที่เปิดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7, 14, 30 และ 120 วัน อย่างละ 3 ซ้ำ พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารทั้งสองอุณหภูมิในทุกช่วงเวลามีค่าอยู่ระหว่าง 35–37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (%RSD <25%) ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนั้นยังได้ทำการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างธัญพืชชนิดอื่น เช่น ข้าวโพด พบว่ามีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยมี %recovery ที่ LOQ เท่ากับ 95.5% และ HORRAT น้อยกว่า 2

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารโดยการดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงสารตกค้างจากสารกำจัดศัตรูพืชของสหภาพยุโรป (EURL) ที่อ้างอิงถึงวิธีของ Stijve โดยมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ในช่วง 5–75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งคุณลักษณะของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวัดเพื่อควบคุมคุณภาพของข้าวสารที่จำหน่ายในประเทศไทยตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 361) พ.ศ. 2556 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้างที่ระบุค่ากำหนดปริมาณการตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limits, MRL) ไว้ที่ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้การพัฒนาวิธีดังกล่าวได้มีการปรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างและขั้นตอนการสกัดบางส่วนเพื่อให้เหมาะสมกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและสามารถทำการวิเคราะห์ได้พร้อมกันประมาณ 30 ตัวอย่างต่อชุดการทดสอบเพื่อรองรับงานสำรวจหรือตรวจสอบคุณภาพข้าวได้ทันต่อสถานการณ์ เมื่อทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี internal และ external standard calibration โดยได้สกัดตัวอย่างที่มีโบรไมด์นินทรีย์ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าข้อมูล 2 ชุดที่ได้จากการคำนวณไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ในการนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้จึงไม่จำเป็นต้องใช้ internal standard เป็นการประหยัดสารเคมีค่าใช้จ่ายและเวลาโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC ให้มีเวลาการวิเคราะห์ที่สั้นลงได้โดยไม่ต้องระวังการเกิดการซ้อนทับของ internal standard กับสารที่สนใจ เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกันและเกิดพีคที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดี ผู้ที่จะนำวิธีนี้ไปใช้ควรทราบเทคนิคและข้อควรระวังเนื่องจากในขั้นตอนการทำอนุพันธ์มีการใช้สารที่มีความเป็นพิษสูง ระคายเคืองต่อผิวหนังและทางเดินหายใจ เช่น สาร propylene oxide ซึ่งต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 11 องศาเซลเซียส และต้องทำการเตรียมสารละลายใหม่

ทุกครั้งก่อนการใช้งาน หากเก็บไว้เกิน 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของสารละลายดังกล่าวจะลดลงส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ หลังการใช้งานหากมีสารละลายเหลือให้ทำลายโดยการเติมเกลือแกง (NaCl) ในการใช้ propylene oxide เพื่อทำให้เกิดอนุพันธ์นั้นมีข้อดีกว่าการใช้ ethylene oxide ที่สามารถเพิ่มความเชื่อมั่นในการตรวจวิเคราะห์โดยไม่ต้องตรวจยืนยันซ้ำ เนื่องจากให้อนุพันธ์ 2 ชนิดที่เป็นไอโซเมอร์กันและมีสัดส่วน 3 ต่อ 1 เสมอ และสัดส่วนนี้เป็นการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์แล้ว ในขณะที่ ethylene oxide ให้อนุพันธ์เพียงชนิดเดียวที่ไม่สามารถระบุได้ว่าสารที่ตรวจพบเป็นอนุพันธ์ของโบรมไดอนินทรีย์หรือไม่จึงต้องตรวจยืนยันอีกครั้ง นอกจากนั้นการเตรียมตัวอย่างโดยการเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ปริมาณ 0.1 กรัม ลงใน GC vials โดยตรงเพื่อดึงน้ำออกจากสารละลายตัวอย่างจะต้องระวังไม่ให้ความสูงของสารสูงถึงปลายเข็มที่ใช้ดูดตัวอย่างและจะต้องทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง GC ทันที และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณโบรมไดอนินทรีย์โดยใช้ข้าวทั้งเมล็ดและข้าวสารบดละเอียดซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันแล้วพบว่าปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ของตัวอย่างที่บดละเอียดมีค่ามากกว่ากรณีวิเคราะห์ทั้งเมล็ด แสดงว่าขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยทำการบดตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์นั้นจะทำให้สามารถสกัดโบรมไดอนินทรีย์ออกมาจากตัวอย่างได้ดี นอกจากนั้นเมื่อนำมาศึกษาการลดลงของปริมาณโบรมไดอนินทรีย์โดยการล้างน้ำโดยใช้ข้าวสารบดละเอียดเป็นตัวอย่าง เพราะข้าวสารชนิดเม็ดให้ผลการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าความเป็นจริง พบว่าจำนวนครั้งในการล้างข้าวด้วยน้ำนั้นมีความสำคัญมากกว่าปริมาณน้ำที่ใช้ ดังนั้นในการหุงข้าวเพื่อบริโภคควรล้างน้ำหรือที่เรียกว่าขาวน้ำหลายครั้งน่าจะช่วยลดปริมาณสารตกค้างในข้าวได้ และรายงานของ Nakamura ที่พบว่าทำให้สุกด้วยการหุงหรืออบด้วยไอน้ำสามารถลดปริมาณการตกค้างลงได้อีก 41.2% ทำให้การบริโภคข้าวที่สุกแล้วจึงมีความเสี่ยงต่อการได้รับสัมผัสสารโบรมไดอนินทรีย์ลดลง แต่สารโบรมไดอนินทรีย์ที่ตกค้างในข้าวไม่สามารถทำให้ลดลงได้โดยการเปิดภาชนะทิ้งไว้เนื่องจากโบรมไดอนินทรีย์ได้ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับเนื้อข้าวสารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักโดยไม่สามารถระเหยออกได้

สรุป

วิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งแบบ ESTD และ ISTD สามารถตรวจวิเคราะห์โบรมไดอนินทรีย์ที่ตกค้างในข้าวสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ของสารดังกล่าวในข้าวสารที่นำมาบริโภคเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค รวมถึงสามารถใช้ในการสนับสนุนการตรวจสอบคุณภาพของข้าวสารที่ประเทศไทยส่งออกไปยังต่างประเทศได้ รวมทั้งสามารถใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทเมล็ดธัญพืช อาทิ ข้าวโพด ข้าวสาลี ถั่วเมล็ดแห้ง ได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Methyl bromide. In: Bond EJ. Manual of fumigation for insect control. [online]. 1989; [cited 2014 Jul 25]; [8 screens]. Available from: URL: <http://www.fao.org/docrep/X5042E/x5042E08.htm>.
2. Mayr GE. Methyl bromide and ethylene oxide as fumigants. Pure & Appl Chem 1978; 50: 519-23.
3. U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide fact sheet number 98: methyl bromide. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1986.
4. Gehring PJ, Nolan RJ, Watanabe PG, Schumann AM. Solvents fumigants and related compounds. In: Hayes WJ, Laws ER, editors. Handbook of pesticide toxicology. San Diego, CA: Academic Press; 1991. p. 668-671.
5. World Health Organization. Methyl bromide, environmental health criteria, 166. Geneva, Switzerland: WHO; 1995.

6. U.S. Department of Human Health & Human Services. Monohalomethanes: methyl chloride, methyl bromide, methyl iodide. Current intelligence bulletin no. 43. Atlanta, GA: National Institute for Occupational Safety and Health; 1984.
7. Wagner SL. The fumigants. In: Clinical toxicology of agricultural chemicals. Corvallis, OR: Oregon State University, Environmental Health Sciences Center. 1981. p. 284-290.
8. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 109 ตอน 39 (วันที่ 6 เมษายน 2535).
9. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 361 (พ.ศ. 2556) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 130 ตอนพิเศษ 106 ง (วันที่ 26 สิงหาคม 2556).
10. พิธีสารมอนทรีออลว่าด้วยสารทำลายชั้นบรรยากาศโอโซน. [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 พ.ค. 2557]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www2.diw.go.th/treaty/montreal/พิธีสารมอนทรีออลweb.pdf>.
11. Mapes DA, Shrader SA. Determination of total and inorganic bromide a residues in fumigated products. J Assoc Offic Agr Chem 1957; 40: 189-91.
12. Lindren DL, Gunther FA, Vincent LE. Bromine residues in wheat fumigated with methyl bromide. J Econ Entomol 1962; 55: 773-6.
13. Banks HJ, Desmarchelier JM, Elek JA. Determination of bromide ion content of cereals and other foodstuffs by specific ion electrode. Pestic Sci 1976; 7(6): 595-603.
14. Mitsuhashi T, Adachi K, Kaneda Y. Determination of total bromide in cereals by gas chromatography. J Food Hygienic Society Japan 1987; 28(2): 130-5.
15. บุญไพ สวรรานนท์, พัชรวรรณ จงมีวาสนา และกอบทอง รูปหอม. การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์โบรไมด์ในข้าวสารเจ้าและข้าวสารเหนียว. ว กรมวิทย์ พ 2541; 40(2): 171-7.
16. Bromide-containing fumigants S 18. In: Thier HP, Zeumer H, editors. Manual of pesticide residue analysis volume I. Weinheim, NY: VCH; 1987. p. 377-381.
17. Stijve T. Gas chromatographic determination of inorganic bromide residues - a simplified procedure. Dtsch Lebenm Rundsch 1981; 77: 99-101.
18. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
19. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
20. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4th ed. Harlow, NY: Prentice Hall; 2000.
21. Nakamura Y, Sekiguchi Y, Hasegawa S, Tsumura Y, Tonogai Y, Ito Y. Reductions in postarvest-applied dichlorvos, chlorpyrifos-methyl, malathion, fenitrothion and bromide in rice during storage and cooking processes. J Agric Food Chem 1993; 41(11): 1910-5.

Method Development and Removal of Methyl Bromide Residue Determined as Total Inorganic Bromide in Rice by Gas Chromatographic Technique

Weerawut Wittayanan and Wischada Jongmevasna

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000. Thailand

ABSTRACT Methyl bromide is mainly used as a fumigant for postharvest treatment of plant products. Especially, rice and grains are fumigated to eliminate undesired pests before commercializing. Inorganic bromide is resulted from repeating fumigation of methyl bromide and reacts chemically with some constituents of the material. This study was consequently conducted by using modified Stijve T. method to determine total inorganic bromide in rice. The comminuted ground samples are suspended in an acidified aqueous solution of propylene oxide, with bromide being simultaneously extracted and derivitized into 1-bromopropane-2-ol and 2-bromopropane-1-ol which can be detected by GC- μ ECD. As a result of method validation, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) are 2 and 5 mg/kg, respectively. The accuracy expressed as mean of %recovery by using external standard calibration at 5, 25 and 50 mg/kg were found to be 96.9, 93.4 and 94.3% respectively and those results obtained by using 3-bromopropane-1-ol as the internal standard were also found to be 94.5, 89.2 and 86.9% respectively. The method precision expressed as HORRAT were in the acceptable range which less than 2 in both cases. In addition, the linearity was found to be in the working range of 5-75 mg/kg with Pearson's correlation coefficient (r) = 0.999. The result of the validation study demonstrated that, there was non-significant difference between the result obtained from external and internal standard calibrations at the LOQ (level of confidence=95%, α =0.05). The performance characteristics of this method were fit for intended use according to maximum residue limit established by CODEX and Thai Ministry of Public Health set at 50 mg/kg.

Key words: methyl bromide, inorganic bromide, GC- μ ECD, rice