การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

เมนะกา วิวน และวงเดือน นาคนิยม

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ จากสถานการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่ยังมีการแพร่ระบาดทั่วโลก การล้างมือด้วยผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบโดยไม่ใช้น้ำจึงได้รับความนิยม จากประกาศกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54ง พ.ศ. 2563 กำหนดว่าเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือโดยไม่ใช้น้ำมีความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ หรือ เอ็น-โพรพิลแอลกอฮอล์ เพียงสารเดียวหรือผสมรวมกันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิดได้พร้อมกันด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีและตัวตรวจวัดชนิด FID โดยใช้คอลัมน์ DB-624 โปรแกรมอุณหภูมิในช่วง 40-150 °ซ ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่ามีความจำเพาะ การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0-5.0 มก./มล. มีค่า r >0.9999 ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 99.0-103.0 ความเที่ยงจากการทำซ้ำในวันเดียวกัน ระหว่างวันและระหว่างนักวิเคราะห์มีค่าที่ยอมรับได้ (RSD <3%) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 1.81, 1.76 และ 1.80 %v/v ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบ 0.18 %v/v และค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ 0.05 %v/v ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนานี้มีความเหมาะสมและนำไปวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้

คำสำคัญ: การทดสอบความถูกต้องของวิธี, ปริมาณแอลกอฮอล์, ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ, แก๊สโครมาโทกราฟี

Corresponding author E- mail: menaka.v@dmsc.mail.go.th

Received: 30 June 2020 *Revised: 19 August 2020* *Accepted: 11 September 2020*

บทนำ

เนื่องจากในปัจจุบันที่ยังคงมีสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้มีการรณรงค์ให้ความรู้แก่ประชาชนในการดูแลป้องกันตนเองจากโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) โดยการใส่หน้ากากอนามัย หลีกเลี่ยงการอยู่สถานที่แออัด ไม่อยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยที่มีอาการไอ จาม และหมั่นล้างมือบ่อย ๆ ซึ่งการทำความสะอาดมือด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบในรูปแบบสารละลายและเจลโดยไม่ใช้น้ำ เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมมากสำหรับการป้องกันตนเองของประชาชนในประเทศไทย โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการจำหน่ายในท้องตลาดอย่างแพร่หลาย จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54ง พ.ศ. 2563[1] กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำความสะอาดมือโดยไม่ใช้น้ำ จัดเป็นเครื่องสำอาง และกำหนดให้เครื่องสำอางดังกล่าวมีความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (ethyl alcohol หรือ ethanol) ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์หรือไอโซโพรพานอล (isopropyl alcohol หรือ isopropanol) เอ็น-โพรพิลแอลกอฮอล์ หรือ เอ็น-โพรพานอล (n-propyl alcohol หรือ n-propanol) เพียงสารเดียวหรือผสมรวมกันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ โดยสามารถเตรียมตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย สามารถวิเคราะห์สารกลุ่มแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด ได้พร้อมกัน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ การทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้องเหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบให้เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐาน และมีประสิทธิภาพตามวัตถุประสงค์

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าพิกัด 0.1-0.01 มิลลิกรัม

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC) (Agilent 6890 series) ประกอบด้วย detector ชนิด Flame ionization detector (FID) ระบบฉีดสารอัตโนมัติ โดยใช้คอลัมน์ DB-624 ขนาด 0.53 mm I.D. x 30 m length x 3 μm film thickness

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี methyl alcohol ชนิด analytical reagent grade

สารมาตรฐาน สาร ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol (Chem Service) ความบริสุทธิ์ >99% ใช้เป็นสารมาตรฐาน และสาร 1,4-dioxane (Merck®) ความบริสุทธิ์ >99% เป็นสารมาตรฐานชนิด internal standard

ตัวอย่าง

1. ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์ส่วนประกอบรูปแบบเจลที่เตรียมขึ้นเองโดยปราศจากแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด เป็นส่วนประกอบ โดยมีส่วนผสมของน้ำ, carbopol, triethanolamine และน้ำหอม เป็นส่วนประกอบ สำหรับใช้เป็น Matrix blank เพื่อใช้ในการตรวจสอบ parameter ของการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

วิเคราะห์ เช่น ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and working range) และความแม่น (accuracy)

2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีส่วนประกอบของแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol และมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด เพื่อใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีเฉพาะ parameter ความเที่ยง (precision)

3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลจำนวน 170 ตัวอย่าง ที่ส่งตรวจโดยหน่วยงานรัฐและผู้ประกอบการ ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2563

วิธีการทดสอบ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock standard solution และ Standard solution

สารละลายมาตรฐาน Stock standard solution เตรียมโดยชั่งสาร ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol แต่ละชนิดจำนวน 0.5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐาน (stock standard solution) ของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน Standard solution เตรียมโดยปิเปต stock standard solution แต่ละชนิด จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน Internal standard solution เตรียมโดยชั่งสาร 1,4-dioxane จำนวน 1.5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม methyl alcohol เขย่าให้ละลายและปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร จะได้ internal standard solution ที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลประมาณ 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าพิกัด 0.1-0.01 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จากนั้น ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methyl alcohol จนครบปริมาตร เก็บในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องมือต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด ด้วยเครื่อง GC-FID Detector ใช้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ Column Oven 40˚C ถึง 150˚C , Injection port temperature 250˚C, Detector temperature 250˚C อัตราการไหล 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร

เมื่อสภาวะของเครื่อง GC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area ratio, retention time (RT), Theoretical Plate count และค่า tailing factor โดยเกณฑ์ยอมรับค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบดังนี้ %RSD (peak area ratio) ≤3%, %RSD (RT) ≤3%, Theoretical Plate count (EP), N >20,000 และ tailing factor 0.8-1.2

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)[2]

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่มีความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อฉีดเข้าเครื่อง GC แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยค่า r ที่ยอมรับได้ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard solution) ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC ภายใต้สภาวะที่กำหนด เพื่อตรวจสอบการแยกของสารทั้ง 4 ชนิด จากการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง และต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ 7 ซ้ำ โดยค่า LOD เท่ากับความเข้มข้นของสารที่สนใจ ที่มี signal-to-noise ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 3 คำนวณเป็นร้อยละโดยปริมาตรของตัวอย่าง

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นใกล้เคียงค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน และเติม internal standard solution ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน matrix blank วิเคราะห์จำนวน 7 ซ้ำ แล้วคำนวณเป็นค่าร้อยละโดยปริมาตรของ %Recovery และ %Relative Standard Deviation (%RSD) โดยเกณฑ์ยอมรับค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ต้องอยู่ในช่วง 95.0-110.0% และค่า %RSD ≤3%

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง Matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาปริมาณสารมาตรฐานที่ตรวจพบ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ r) ซึ่งค่า r ที่ยอมรับได้ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

ความแม่น (Accuracy)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง Matrix blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol ให้มีความเข้มข้น 19, 39 และ 49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ คำนวณปริมาณแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเป็นร้อยละโดยปริมาตร แล้วคำนวณหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยเกณฑ์ยอมรับของค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ต้องอยู่ในช่วง 95.0-110.0 และค่า %RSD ≤3%

ความเที่ยง (Precision)

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง วิเคราะห์ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยปริมาตร คำนวณค่า %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับได้ของค่า %RSD≤3%

การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน (Intermediate precision, between-day)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง เป็นเวลา 5 วัน วันละ 7 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยปริมาตร คำนวณค่า %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับได้ของค่า %RSD≤3%

การวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ (Intermediate precision, between-analysts)

วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ 3 คน คนละ 7 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยปริมาตร ประเมินความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน คำนวณค่า %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับได้ของค่า %RSD≤3%

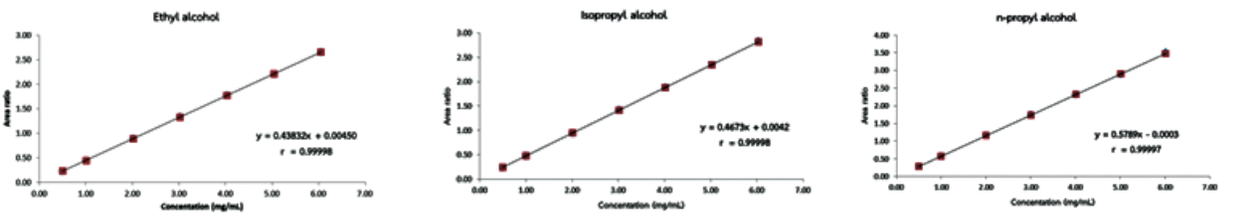
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด[3] โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่งรวมของค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k = 2) ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตร (%v/v) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจากกราฟมาตรฐานโดยใช้สมการเส้นตรง[4]

ผล

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

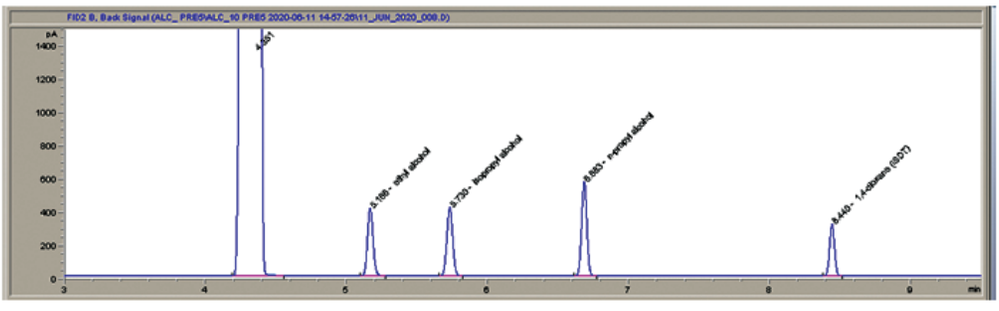
กราฟมาตรฐานของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ที่ช่วงความเข้มข้น 0.5-6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998, 0.99998 และ 0.99997 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐาน ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard solution) ภายใต้สภาวะของเครื่อง GC พบว่าสามารถแยกพีคของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane ออกจากกันได้ โดยมีค่า retention time ประมาณ 5.1, 5.7, 6.6 และ 8.4 นาที ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล (Matrix blank) และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol พบว่าไม่มีพีคของสารอื่นในตัวอย่างรบกวน ดังแสดงในภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard)

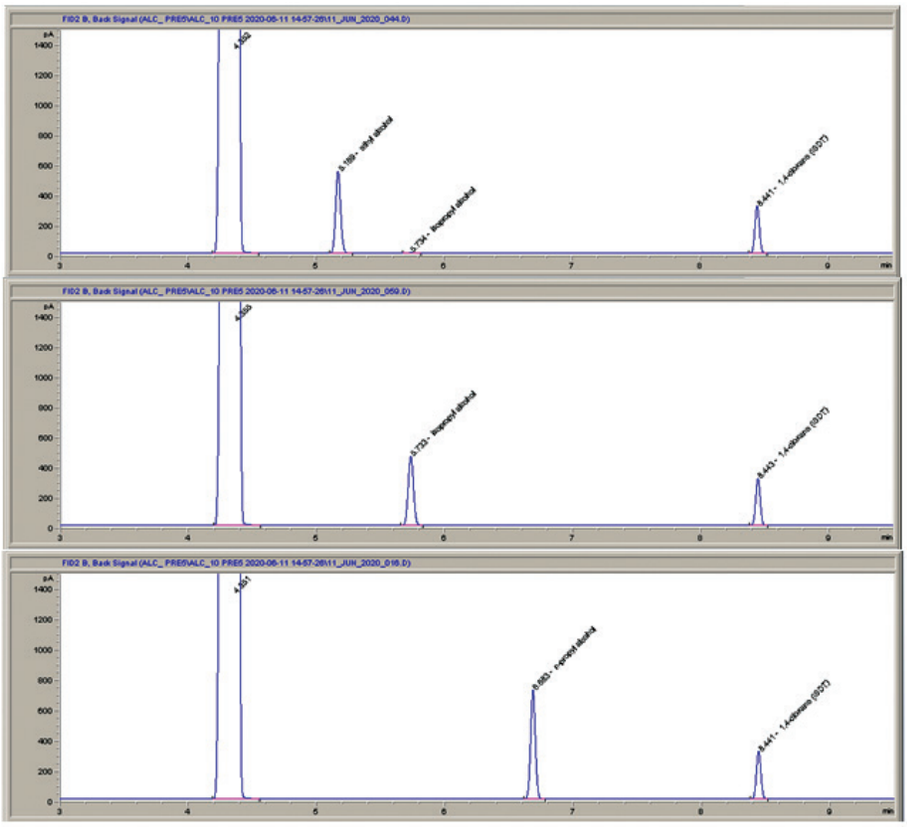
ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ Matrix blank

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

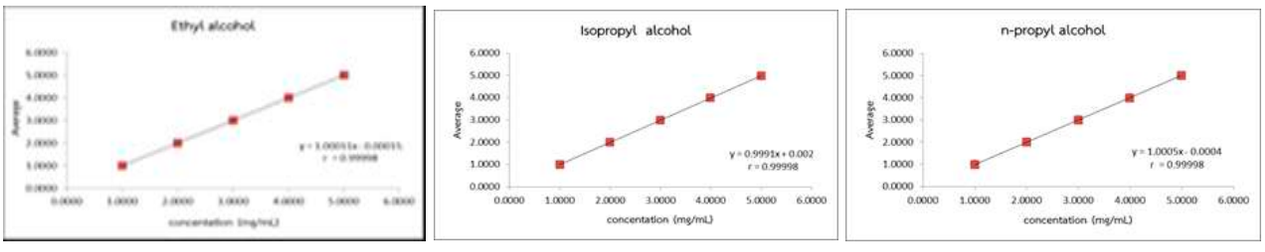
กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมกับพื้นที่ใต้พีคมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฉลี่ยที่ตรวจวิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998, 0.99998 และ 0.99998 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5

การทดสอบความแม่น (Accuracy)[2, 5]

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง Matrix blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol ให้มีความเข้มข้น 19, 39 และ 49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ พบว่าค่า %Recovery อยู่ในช่วง 99.45-102.79 และค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.26-0.61 ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane (internal standard)



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range) ของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ของวิธีวิเคราะห์

Alcohol Additives	Alcohol Additives 35 %v/v (n = 7*)		Alcohol Additives 70 %v/v (n = 7*)		Alcohol Additives 90 %v/v (n = 7*)	
	%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD
Ethyl alcohol	99.92-100.58	0.26	99.72-101.36	0.56	100.99-102.78	0.58
Isopropyl alcohol	99.70-100.73	0.54	100.32-101.73	0.61	101.07-102.79	0.41
n-Propyl alcohol	99.45-101.10	0.60	101.65-102.25	0.58	101.50-102.36	0.50

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจล ที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่างจำนวน 7 ซ้ำ พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 0.86, 1.56 และ 1.48 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน (Intermediate precision, between-day)

จากวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง เป็นเวลา 5 วัน วันละ 7 ซ้ำ พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 0.76, 0.91 และ 0.96 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยง โดยการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน

Alcohol	วันที่	ปริมาณ (%v/v) (n = 5*)		%RSD	
		ค่าเฉลี่ย	%RSD	ค่าเฉลี่ยระหว่างวัน	ค่าเฉลี่ยระหว่างวัน
Ethyl alcohol	1	75.5573	0.42	74.8817	0.76
	2	74.8043	0.37		
	3	74.5616	0.86		
	4	74.9010	0.68		
	5	74.5844	0.55		
Isopropyl alcohol	1	66.0337	0.37	65.9172	0.91
	2	65.3287	0.39		
	3	66.0424	1.56		
	4	66.1736	0.61		
	5	66.0076	0.42		
n-Propyl alcohol	1	64.2040	1.48	64.1612	0.96
	2	64.0352	0.70		
	3	63.7629	0.58		
	4	64.7664	0.40		
	5	64.0373	0.51		

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ซ้ำโดยต่างนักวิเคราะห์ (Intermediate precision, between-analysts)

จากวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลที่มีแอลกอฮอล์แยกชนิดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่าง โดยนักวิเคราะห์ 3 คน คนละ 7 ซ้ำ พบว่ามีค่า %RSD เท่ากับ 1.09, 1.10 และ 1.00 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำโดยต่างนักวิเคราะห์

Alcohol	นักวิเคราะห์ที่	ปริมาณ (%v/v)		
		ค่าเฉลี่ย (n = 7*)	ค่าเฉลี่ยนักวิเคราะห์ (n = 3)	%RSD
Ethyl alcohol	1	74.8043	76.1821	1.09
	2	75.9679		
	3	77.7741		
Isopropyl alcohol	1	65.3287	65.2924	1.10
	2	65.2197		
	3	65.3287		
n-Propyl alcohol	1	63.7685	63.9795	1.00
	2	63.4813		
	3	64.6888		

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

จากผลการวิเคราะห์พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับร้อยละ 0.18 โดยปริมาตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้เท่ากับร้อยละ 1.81, 1.76 และ 1.80 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ในช่วง 98.09-100.95, 98.50-101.64 และ 98.99-102.11 ตามลำดับ และ %RSD เท่ากับ 1.23, 1.33 และ 1.43 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4

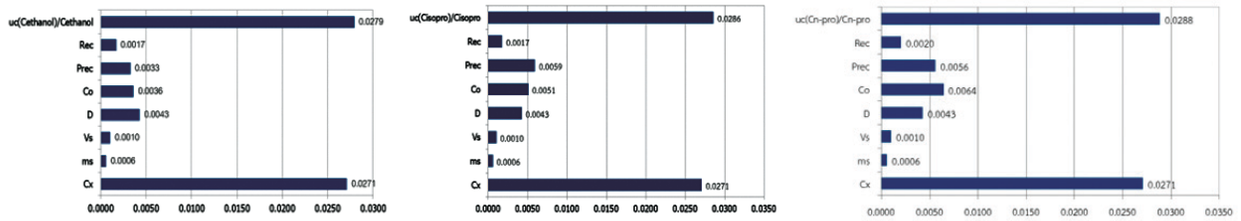
ตารางที่ 4 ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของค่า LOQ

Alcohol Additives	LOQ (n = 7*)	
	%Recovery	%RSD
Ethyl alcohol	98.09-100.95	1.23
Isopropyl alcohol	98.50-101.64	1.33
n-Propyl alcohol	98.99-102.11	1.43

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

จากการประเมินประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด พบว่าแหล่งของค่าความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ได้แก่ สารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง การทำซ้ำ (repeatability) กราฟมาตรฐาน (calibration curve) และค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ได้ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า k = 2 เท่ากับ ร้อยละ 0.05, 0.05 และ 0.05 โดยปริมาตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ตามลำดับ

วิจารณ์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือครั้งนี้ ได้ดัดแปลงจากการวิเคราะห์ ILIADe143:2019[6] ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ ethyl alcohol ในผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่มีลักษณะตัวอย่างแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือรูปแบบเจล และมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์แอลกอฮอล์ที่อนุญาตให้ใช้ได้พร้อมกัน 3 ชนิด ในเวลาเดียวกัน จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการใช้เครื่อง GC จากเดิมวิธี ILIADe143:2019 ซึ่งเป็นแบบ gradient ใช้คอลัมน์ DB-624 ใช้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ Column Oven 45˚C ถึง 200˚C, Injection temperature 230˚C, Detector temperature 230˚C และ split approx. 120 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นการใช้ภายใต้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ Column Oven 40 ˚Cถึง 150 ˚C, Injection temperature 250˚C, Detector temperature 250˚C และ split approx. 50 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้เครื่อง GC เป็นแบบ gradient ใช้คอลัมน์ DB-624 และ Flame Ionization Detector (FID) เป็นตัวตรวจวัด เช่นเดียวกับในวิธี ILIADe143:2019 ซึ่งพบว่าภายใต้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ครั้งนี้สามารถแยก ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-propyl alcohol และ 1,4-dioxane ออกจากกันได้ รวดเร็วและประหยัดเวลายิ่งขึ้น

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับได้ คือการทดสอบความเหมาะสมของระบบได้ค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของค่า Retention time ≤3%, %RSD ของค่า peak area ratio ≤3%, ค่าสูงสุดของ tailing factor <1.2, ค่าต่ำสุดของ Theoretical Plate count >50,000 และค่าต่ำสุดของ resolution >5 การทดสอบความจำเพาะของวิธี พบว่าภายใต้สภาวะของเครื่อง GC การตรวจวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ ไม่พบพีคที่ตรงกับสารมาตรฐาน การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.5-6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998, 0.99998 และ 0.99997 ตามลำดับ การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวิเคราะห์ (Working range) ในช่วงของความเข้มข้น 1.0-5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า r เท่ากับ 0.99998 ของแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด การทดสอบค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และความเที่ยง (Precision) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือรูปแบบเจล ที่เติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับคือ %RSD ไม่เกิน 3% และค่าร้อยละของการคืนกลับของ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol อยู่ในช่วงระหว่าง 99.0-103.0%

วิธีวิเคราะห์ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ มีการควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์ (Internal Quality

control) โดยกำหนดให้กราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥0.9995 ค่า %recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 95.0-110.0 ทุกรุ่นการวิเคราะห์ และเมื่อวิเคราะห์ duplicate sample ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% ผลการวิเคราะห์มีหน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก แล้วนำค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ของผลิตภัณฑ์มาใช้ในการคำนวณแปลงหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตร ในการรายงานผลการทดสอบตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54ง พ.ศ. 2563 กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ (alcohol based hand sanitizer) เป็นเครื่องสำอาง และกำหนดให้ปริมาณของแอลกอฮอล์ชนิดเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol หรือ ethanol) ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol หรือ isopropanol) หรือ เอ็น-โพรพิลแอลกอฮอล์ (เอ็น-โพรพานอล) (n-propyl alcohol หรือ n-propanol) เพียงชนิดเดียวหรือผสมรวมกันต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร (volume by volume) เพื่อให้สามารถนำผลวิเคราะห์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพตามกฎหมายต่อไป

จากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ในประเทศไทย ทำให้มีหน่วยงานราชการและผู้ประกอบการส่งตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือจำนวน 170 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2563 พบว่าชนิดและปริมาณแอลกอฮอล์เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนดจำนวน 94 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55.3 และมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าที่กฎหมายกำหนดจำนวน 76 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 44.7 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่มีการวางจำหน่ายในท้องตลาดให้แก่ผู้บริโภค ยังมีคุณภาพและปริมาณของแอลกอฮอล์ไม่เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด จนอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังต่อไปเพื่อติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังจำหน่ายให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อสุขภาพและอนามัยของประชาชน

สรุป

การพัฒนาและการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ethyl alcohol, isopropyl alcohol และ n-propyl alcohol ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ มีความถูกต้อง แม่นยำ ความไวและความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบเหมาะสมกับการใช้งาน (fitness for intended use) และให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์การยอมรับ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์เป็นไปอย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบรูปแบบเจลเป็นตัวแทน สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยตามกฎหมาย เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2558 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54 ง (วันที่ 9 มีนาคม 2563). หน้า 6.
2. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
3. EURACHEM/CITAC. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. [online]. 2000; [cited 2020 Jun 15]; [126 screens]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2000-1.pdf.
4. สุวรรณา จารุนุช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
5. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical method: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. [online]. 2014; [cited 2020 Jun 15]; [70 screens]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.
6. Customs Laboratories European Network. ILIADe 143:2019 CLEN Method. Determination of ethanol in alcoholic products by GC-FID version 14, October 2019. [online]. 2019; [cited 2020 Jun 15]; [7 screens]. Available from: URL: https://ec.europa.eu/taxation_customs/sites/taxation/files/iliade-143_ethanol_gc-fid.pdf.

Method Validation of Alcohol Contents in Alcohol-based Hand Sanitizer Products Using Gas-chromatography

Menaka Vivon and Wongduan Nakniyom

Bureau of Cosmetics and Hadzardous Substances, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Since the situation of COVID-19 infection around the world has still been widespread. Therefore, the alcohol-based sanitizer products are used popularly for washing hand without water. In Thailand, according to the Notification No. 137, Special Part 54, (2020) of the Ministry of Public Health, only ethyl alcohol, isopropyl alcohol or n-popyl alcohol are used in alcohol based hand sanitizer products which its total content shall not be less than 70% v/v. This study was aimed to develop and validate the method to determine three types of alcohol simultaneously using Gas-chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID). The test conditions were composed of DB-624 column with oven temperature program from 40-150 °C. The method was specific. The linearity and working range were shown between 1.0-5.0 mg/mL with r >0.9999. The %recovery was 99.0-103.0%. The precision, within day, between days and analysts, were acceptable with RSD <3%. Limit of quantitation (LOQ) was 1.81, 1.76 and 1.80%v/v, respectively, while limit of detection (LOD) was 0.18 %v/v. Measurement uncertainty was equal to 0.05 %v/v. As the result, the developed method was suitable to be used for alcohol contents analysis in alcohol-based hand sanitizer products.

Keywords: method validation, alcohol contents, alcohol-based hand sanitizer products, Gas-chromatography