

# การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลในพลาสติก โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Method validation for determination of phenol in plastic products using high performance liquid chromatography

วงศ์กนก อยู่สงค์<sup>1\*</sup>  
Wongkanok Yoosong<sup>1\*</sup>

## บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลในพลาสติกดำเนินการตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน EN 71, 2005: Safety of toys method โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์พบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าขีดจำกัดของการตรวจหาเท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตรและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษาความเอนเอียงและความเที่ยงของวิธีโดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น (0.2, 4.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่ามีค่าคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 80-120 และมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 0.01-0.04 ค่าคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้นพบว่าไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความเอนเอียงและความเที่ยงมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของการวิเคราะห์ฟีนอลในพลาสติกที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่ามีค่าน้อยกว่าร้อยละ 20 ซึ่งสอดคล้องกับค่าความไม่แน่นอนเป้าหมายที่กำหนดไว้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์

## Abstract

The method validation for determination of phenol in plastic products was performed by the modified method based on European Standard EN 71-11, 2005: Safety of toys Method using high-performance liquid chromatography. From the study, the calibration graph showed a good linear range from 0.2 to 10 mg/L. The limit of detection was 0.03 mg/L and limit of quantitation was 0.2 mg/L. Bias and precision study were performed by using spike samples at 3 concentration levels (0.2, 4.0 and 10.0 mg/L). The recoveries of phenol in plastic were between 80-120%. Relative standard deviations were between 0.01-0.04. The percentage recovery and relative standard deviation were within acceptance limit. The result showed that there is no matrix effect. Then data from bias and precision study could be used to estimate measurement uncertainty of the method. The expanded uncertainty of phenol at the confidence level of 95% was less than 20% which corresponding to the target uncertainty. Therefore, this method was fit for the intended use.

**คำสำคัญ:** ฟีนอล, พลาสติก, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

**Keywords:** Phenol, Plastic, High performance liquid chromatography

<sup>1</sup>กรมวิทยาศาสตร์บริการ

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

## 1. บทนำ (Introduction)

ในปัจจุบันพลาสติกมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันเป็นอย่างมาก เครื่องมือ เครื่องใช้ เครื่องอุปโภคและบริโภคต่างๆ ล้วนแล้วแต่ทำจากพลาสติกหรือมีพลาสติกเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากพลาสติกมีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีความเหนียว แข็งแรง น้ำหนักเบา ทนทานต่อสภาวะต่างๆ และสารเคมี เป็นฉนวนไฟฟ้าและฉนวนความร้อนที่ดี สามารถนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด เช่น อุปกรณ์ของเล่นเด็ก ของตกแต่งบ้าน เสื้อผ้า ภาชนะบรรจุอาหารและเครื่องดื่ม เป็นต้น ซึ่งสารตั้งต้นที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตพลาสติกมีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับประเภทและคุณสมบัติของพลาสติกชนิดนั้นๆ

พีนอลเป็นสารชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมพลาสติก มักพบเจือปนในบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารและของเล่น สามารถเข้าสู่ร่างกายเมื่อดื่มน้ำที่ปนเปื้อน รับประทานอาหารที่ปนเปื้อนหรือสัมผัสผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อนพีนอล ซึ่งจะส่งผลให้เกิดปัญหาสุขภาพของมนุษย์ โดยความเป็นพิษแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ การเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxic) จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง เยื่อบุตา เยื่อบุระบบทางเดินหายใจ มีอาการเวียนศีรษะ อาเจียน ท้องร่วง การได้รับพีนอลเข้าทางปากเพียง 4.8 มิลลิกรัม จะทำให้เสียชีวิตได้ภายใน 15 นาที ส่วนความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxic) เนื่องจากได้รับพีนอลเป็นเวลานานจนเกิดการสะสมในร่างกายแล้วเริ่มปรากฏอาการ เช่น ท้องร่วง เบื่ออาหาร ตัวบวม และอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีน (protein denature) และทำลายผนังเซลล์ [1] ค่ามาตรฐานพีนอลในผลิตภัณฑ์ของเล่นที่ทำจากพลาสติก ตามมาตรฐาน EN 71: 2005 กำหนดให้มีค่าไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตรในสารละลายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างพลาสติก การทดสอบหาปริมาณพีนอลสามารถดำเนินการโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดด้วย Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร ดำเนินการตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน EN 71: 2005 [2, 3] งานวิจัยนี้จึงเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณพีนอลในพลาสติก (method validation) โดยศึกษา คุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ช่วงความเข้มข้นที่ให้เส้นโค้งการสอบเทียบเป็นเส้นตรง (linearity range) ขีดจำกัดของการตรวจหา (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความเอนเอียง (bias) ความเที่ยง (precision) ผลกระทบจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง (matrix effect) และการประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด (uncertainty of measurement) [4, 5] เพื่อยืนยันความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ รวมทั้งพิสูจน์ว่าวิธีที่ทดสอบมีความเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้งาน

## 2. วิธีการทดลอง (Experimental)

### 2.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

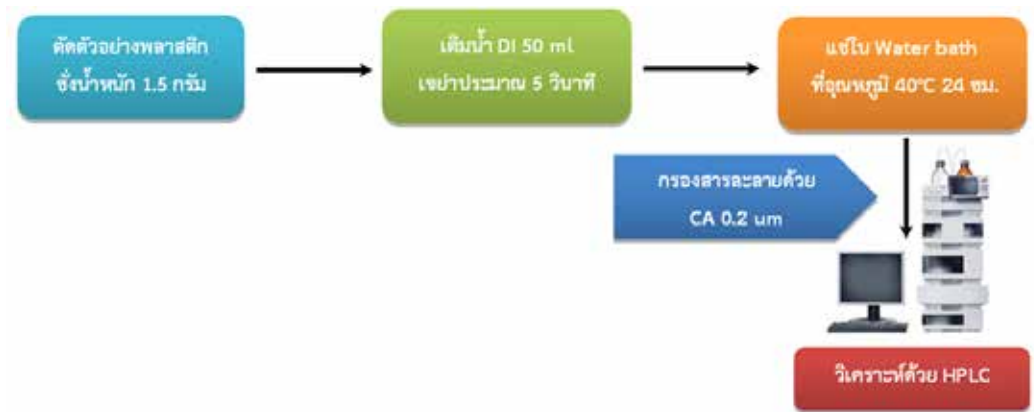
- 2.1.1 เครื่อง high performance liquid chromatography รุ่น 1200 ยี่ห้อ Agilent ประกอบด้วย Diode array detector
- 2.1.2 คอลัมน์ Stainless steel: Zorbax XDB C18 ความยาว 150 มิลลิเมตร, เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร, บรรจุด้วยวัสดุ ODS ขนาดอนุภาค 3.5 ไมครอน
- 2.1.3 เครื่องชั่งยี่ห้อ Mettler รุ่น AB204 - S/FACT ความละเอียด 0.0001 กรัม
- 2.1.4 ขวดแก้ววัดปริมาตรสีชา เกรดเอ (Volumetric flask class A) ขนาด 50 มิลลิลิตรและ 100 มิลลิลิตร
- 2.1.5 ปิเปตวัดปริมาตร เกรดเอ (Volumetric pipette class A) ขนาดต่างๆ
- 2.1.6 ขวดแก้วใส่สารละลาย (Reagent bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2.1.7 บิวเรตต์ เกรดเอ (Burette class A) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 2.1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Heto Lab Equipment รุ่น SBD 50 WARM
- 2.1.9 เยื่อกรองเมมเบรน Cellulose acetate (CA) ขนาด 0.2 ไมครอน

### 2.2 มาตรฐาน สารเคมีและอื่นๆ

- 2.2.1 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- 2.2.2 เมทานอล ชนิด HPLC
- 2.2.3 สารละลายมาตรฐานพีนอล ชนิด GR ของ Merck ใช้เป็น working standard ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
- 2.2.4 วัสดุอ้างอิงพีนอล ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ RESTEK, Certificate จาก RESTEK lot no. A0101912 (ได้รับการรับรองจาก irac-MRA และ A2LA)
- 2.2.5 สารละลายมาตรฐานพีนอล ระดับ working standard ที่ความเข้มข้น 0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานพีนอล 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 2.2.3) ด้วยน้ำปราศจากไอออน

## 2.3 วิธีการวิเคราะห์

### 2.3.1 การเตรียมตัวอย่าง



### 2.3.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอล โดยมีสภาวะดังนี้ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ 40:60 (น้ำ : เมทานอล) ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตรและตั้งอุณหภูมิที่ส่วนควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส การระบุพีคของฟีนอล โดยการเปรียบเทียบเวลา (Retention time,  $t_R$ ) ของพีคสารมาตรฐานกับพีคของสารละลายตัวอย่าง คำนวณผลโดยนำพื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานมาสร้างเส้นโค้งการสอบเทียบและนำพื้นที่พีคของสารละลายตัวอย่างมาคำนวณหาความเข้มข้นของฟีนอล ในสารละลายตัวอย่าง (C) เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) จากนั้นคำนวณปริมาณฟีนอล ในตัวอย่าง (W) กรัม

$$\text{ปริมาณฟีนอล, mg/kg} = \frac{C \times V}{W}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของฟีนอลที่ได้จากเส้นโค้งการสอบเทียบ, mg/L  
V = ปริมาตรสุดท้าย, mL  
W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้, g

### 2.3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ [4]

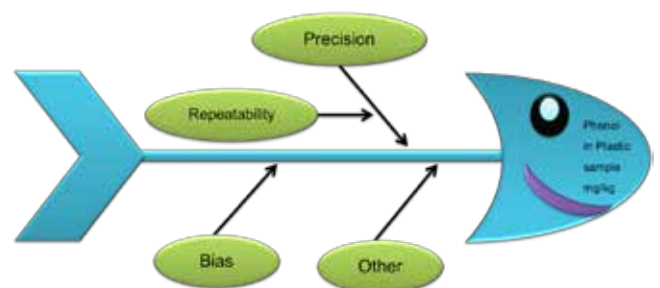
การหาช่วงความเข้มข้นที่ให้เส้นโค้งการสอบเทียบเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Correlation of determination,  $R^2$ ) ของเส้นโค้งการสอบเทียบ โดยค่า  $R^2 \geq 0.995$

ขีดจำกัดของการตรวจหาและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ศึกษาจากการเติมสารมาตรฐาน (spike sample) ที่มีความเข้มข้นต่ำจำนวน 10 ขั้ว ลงในตัวอย่าง จากนั้นคำนวณค่า และ

การศึกษาความโอนเอียงและความเที่ยง โดยทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอ้างอิงฟีนอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 4.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขั้ว ในสภาวะ repeatability และ intermediate repeatability ตามลำดับ

การพิสูจน์ผลกระทบจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง โดยทำการทดสอบตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบและทดสอบตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น (0.2, 4.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นละ 10 ขั้ว แล้วสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของ matrix spiked sample กับ ค่าเฉลี่ยของ Peak area จากนั้นเปรียบเทียบค่าความชัน (slope) ที่ได้กับค่าความชันของเส้นโค้งการสอบเทียบ โดยเกณฑ์กำหนดค่าความชันแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 10 จึงจะถือว่าเมทริกซ์ของตัวอย่างไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบ

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด โดยใช้แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation approach) [5] หาแหล่งค่าความไม่แน่นอนการวัดปริมาณฟีนอลในพลาสติกโดยใช้แผนภูมิแกงปลา ดังแสดงในรูปที่ 1 [6] จากนั้นคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนแต่ละแหล่งและค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 1 แผนภูมิแกงปลาแสดงแหล่งของความไม่แน่นอน ที่ใช้ข้อมูลจากการศึกษา method validation

### 3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

ผลจากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีทดสอบ พบว่าช่วงความเข้มข้นเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานพีนอล อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.99999 ค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่ามีค่าน้อยกว่าค่าเป้าหมายที่กำหนดไว้ที่ร้อยละ 20 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขีดจำกัดของการตรวจหา ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ช่วงความเข้มข้นที่ให้เส้นโค้งการสอบเทียบเป็นเส้นตรง และค่าความไม่แน่นอน

พารามิเตอร์	n = 10
ขีดจำกัดของการตรวจหา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.03
ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.2
ช่วงความเข้มข้นที่ให้เส้นโค้งการสอบเทียบเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.2 – 10.0
ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ร้อยละ)	15.7

จากการศึกษาความโอนเอียงและความเที่ยง ในสภาวะ repeatability และ intermediate repeatability พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า ร้อยละ 10 และค่าคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 80 – 120 ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

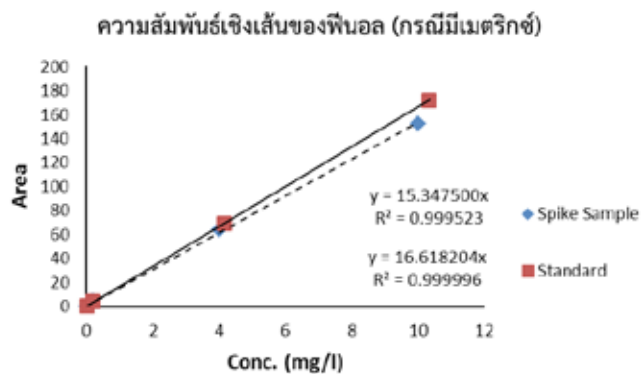
ตารางที่ 2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน

ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Repeatability	Intermediate repeatability
0.2	0.022	0.037
4.0	0.015	0.020
10.0	0.010	0.005

ตารางที่ 3 ค่าคืนกลับที่ได้การวิเคราะห์ปริมาณพีนอลในพลาสติก (n = 10)

ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าคืนกลับ (ร้อยละ)
0.0	0.00	-
0.2	0.21	105
4.0	3.79	95
10.0	9.17	92

การพิสูจน์ผลกระทบบจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้น ที่ได้จากการสร้างกราฟกรณีมีเมทริกซ์ของตัวอย่างพลาสติกซึ่งมีค่าเท่ากับ 16.62 กับค่าความเข้มข้นกรณีไม่มีเมทริกซ์ของตัวอย่างพลาสติกซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.35 พบว่ามีค่าความแตกต่างของความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 7.7 ข้อมูลแสดงในรูปที่ 2



### 4. สรุป (Conclusion)

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณพีนอลในพลาสติกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน EN 71, 2005: Safety of toys method ผลจากการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ ช่วงความเข้มข้นที่ให้เส้นโค้งการสอบเทียบเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดของการตรวจหา ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ความโอนเอียง ความเที่ยง การพิสูจน์ผลกระทบบจากเนื้อสารและการประมาณค่าความไม่แน่นอน พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด แสดงว่าวิธีทดสอบนี้เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์และสามารถนำไปทดสอบหาปริมาณพีนอลในผลิตภัณฑ์ประเภทพลาสติกเพื่อคุ้มครองความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค และสามารถทดสอบตัวอย่างได้ในช่วงความเข้มข้นซึ่งรองรับกฎหมายของประเทศทางสหภาพยุโรปที่กำหนดไว้ไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร [3]

### 5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณบุคลากรโครงการเคมีที่ช่วยให้คำแนะนำ และสนับสนุน ทำให้การดำเนินงานในครั้งนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์

## 6.เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] ECB. *European Union Risk Assessment Report – Phenol*, 1 – 240, 2006.
- [2] EUROPEAN COMMISSION. “*EN 71-10:2005 Safety of toys-Part 10: Organic chemical compounds – Sample preparation extraction*”, 9-10, January 12<sup>nd</sup> 2006.
- [3] EUROPEAN COMMISSION. “*EN 71-11:2005 Safety of toys-Part 11: Organic chemical compounds – Methods of analysis*”, 21-23, November 22<sup>nd</sup> 2005.
- [4] EURACHEM. *Guide: the fitness for purpose of analytical methods, a laboratories guide for method validation and related topics*, 2nd ed. [Online]. 2014. Available from: <http://www.eurachem.org>.
- [5] BARWICK, V.J., and S.L.R. ELLISON. *VAM Project 3.2.1 development and harmonisation of measurement uncertainty principles. Part(d): protocol for uncertainty evaluation from validation data. Version 5.1.2000*.
- [6] EURACHEM/ CITAC. *Guide CG4: quantifying uncertainty in analytical measurement*, 3rd ed. [Online]. 2012. Available from: <http://www.eurachem.org>.