

การวิเคราะห์โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในหมู่งัดโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟและ
การสกัดระดับจุลภาคร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Grilled Pork Using Microwave-
Assisted Extraction and Microextraction Followed
by High-Performance Liquid Chromatography

พิมพา สร้อยสูงเนิน* สิริมนต์ ยกบัตร และ พรสุดา นามบุญลือ

Phimpha Soisungnoen* Sirimon Yokbat and Pornsuda Nambunlue

สาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

Applied Chemistry Program, Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan

*E-mail: ann_chem@hotmail.com

Received: Aug 22, 2017

Revised: Apr 23, 2018

Accepted: May 02, 2018

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการวิเคราะห์โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) 3 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน ฟิแนนทริน และแอนทราซีน ในตัวอย่างหมู่งัดโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟและการสกัดระดับจุลภาคร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ศึกษาและปรับสภาวะของปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการทั้งหมดให้เหมาะสม ตัวอย่างเช่น อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่สำหรับเทคนิค HPLC ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสำหรับขั้นตอนการสกัด เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า สามารถวิเคราะห์สารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนทั้งสามชนิดโดยพร้อมกันได้ภายในเวลา 24 นาที ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 10-15 พีพีบี ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.02-10 พีพีเอ็ม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSDs) มีค่า 2.72-3.51 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเที่ยงในวันเดียว และ 3.23-4.09 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเที่ยงต่างวันกัน ค่าการกลับคืนสำหรับโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนทั้งสามชนิดอยู่ในช่วง 75.38 - 93.60 เปอร์เซ็นต์ วิธีที่นำเสนอมีความเที่ยงและความแม่นยำที่ดีสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างหมู่งัด

คำสำคัญ: โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ การสกัดระดับจุลภาค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หมู่งัด

Abstract

This work studied the determination of three polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) namely fluorene, phenanthrene and anthracene in grilled pork using microwave-assisted extraction and microextraction combined with high performance liquid chromatography (HPLC). The parameters affecting all methods were investigated and optimized such as mobile phase compositions for HPLC method, type and volume of solvents for extraction methods. Under the optimum condition, the simultaneous analysis of three PAHs was achieved within 24 min. Limit of detections were 10-15 ppb. The linearity of the method was in the range of 0.02-10 ppm. The relative standard deviations (RSDs) were 2.72-3.51% for intra-day precision and 3.23-4.09% for inter-day precision. The recoveries of three PAHs ranged from 75.38 to 93.60%. The proposed method provides good precision and accuracy for the analysis of PAHs in grilled pork samples.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, microwave-assisted extraction, microextraction, high performance liquid chromatography, grilled pork

บทนำ

สารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า “PAHs” เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยวงเบนซินตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป เป็นสารพิษที่ค่อนข้างร้ายแรงมาก มีความเป็นพิษในด้านการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Premutagen) และสารเริ่มต้นของสารก่อมะเร็ง (Precarcinogen) สามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ รวมทั้งควันจากท่อไอเสียรถยนต์และควันบุหรี่ กระบวนการแปรรูปและปรุงอาหาร การปรุงและการแปรรูปอาหารที่ทำให้เกิด PAHs ได้คือการอบขนม การคั่วเนื้อสัตว์ การย่างเนื้อสัตว์ การคั่วกาแฟ หรือเกิดขึ้นระหว่างการหมักดอง เช่น ผักดอง กิมจิ ซิอิ๊ว นอกจากนี้ การปรุงอาหารโดยการอบปิ้งย่างที่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน เช่น ไส้กรอกรมควัน หมูปิ้ง ไก่ย่าง ที่ไหม้เกรียมทำให้มี PAHs ปนเปื้อนในอาหารได้ [1], [2], [3] สารกลุ่มนี้ได้รับการจัดว่าทำให้เกิดมะเร็งในคนได้ โดยทั่วไป PAHs เป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำ ในสัตว์ชั้นสูงจะพบความเป็นพิษเรื้อรัง ดังนั้นการได้รับอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบต่างๆ ของร่างกายได้ [4]

เนื่องจากความเป็นพิษและคุณสมบัติการเป็นสารก่อมะเร็งของ PAHs ทำให้การสกัดและการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะในอาหารที่มนุษย์บริโภคเข้าไปโดยตรง วิธีที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่มนี้จะต้องมีความไวสูง มีความจำเพาะ และมีความถูกต้องและแม่นยำมากพอ วิธีทางโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่นิยมใช้มากในการวิเคราะห์ PAHs เช่น เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) [2], [5], [6], [7] หรือ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) [1], [8], [9], [10] อย่างไรก็ตามสำหรับการวิเคราะห์ PAHs ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีความสำคัญมากเพราะจะเป็นการแยกและกำจัดสารรบกวนออกก่อนที่จะทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีนั่นเอง

การวิเคราะห์ PAHs โดยเฉพาะในตัวอย่างอาหารที่มีทั้งไขมันและโปรตีนอยู่ จำเป็นต้องใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอนเพื่อดึง PAHs ออกจากตัวอย่างก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี วิธีที่นิยมใช้ในขั้นตอนแรกคือ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extraction) [11] ซึ่งมีข้อเสียคือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากและต้องใช้เวลานาน ทำให้มีการพัฒนาวิธีใหม่ๆ ขึ้นมาเพื่อแก้ข้อเสียเหล่านี้ วิธีหนึ่งที่มีการนำเสนอคือ การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction, MAE) ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้สกัดสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ ออกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็งได้ดี MAE จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพโดยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และลดเวลาในการสกัดอีกด้วย โดยเทคนิค MAE จะอาศัยการดูดซับพลังงานของตัวทำละลายจากคลื่นไมโครเวฟ ซึ่งจะช่วยให้อุณหภูมิและความดันทำให้สารที่

ต้องการสามารถถ่ายเทจากตัวอย่างของแข็งเข้าไปในตัวทำละลายที่เป็นของเหลวได้อย่างรวดเร็ว [12], [13]

เนื่องจากในตัวอย่างอาหารอาจจะมีปริมาณ PAHs น้อยมาก ทำให้จำเป็นต้องมีการเพิ่มความเข้มข้นก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ วิธีที่นิยมใช้สำหรับเพิ่มความบริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นของ PAHs ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ คือ การสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction, LLE) [14] และ การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) [15] ซึ่ง LLE เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกและการเพิ่มความเข้มข้น แต่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากและมีหลายขั้นตอนทำให้มีการสูญเสียสารที่สนใจไประหว่างการสกัดได้ ส่วนเทคนิค SPE มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์น้อยกว่า LLE แต่ต้องใช้เวลาในการสกัดนาน ทำให้วัตถุประสงค์หลักสำหรับการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์มุ่งเน้นที่จะกำจัดข้อเสียเหล่านี้โดยทำให้ง่ายขึ้นและใช้สารปริมาณน้อยลงนั่นเอง

ในปัจจุบันเทคนิคการเตรียมตัวอย่างทางเคมีวิเคราะห์มักจะคำนึงถึงความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เทคนิคที่มีความน่าสนใจและเป็นทางเลือกที่ดีคือการสกัดระดับจุลภาค (microextraction) ซึ่งเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ลดขนาดลงนั่นเอง [16] Rezaee และคณะ [17] ได้พัฒนาการสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของเหลว ชื่อว่า การสกัดระดับจุลภาคโดยอาศัยการกระจายตัวของของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ซึ่งมีข้อดีคือทำได้ง่าย รวดเร็ว สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารได้สูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เทคนิค DLLME เป็นการสกัดระบบตัวทำละลาย 3 องค์ประกอบ ได้แก่ ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว (disperser solvent) และสารตัวอย่างที่เป็นน้ำ (aqueous sample) ขั้นตอนการสกัดสามารถทำได้โดยการฉีดตัวทำละลายสกัดผสมกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัวลงในสารตัวอย่างน้ำอย่างรวดเร็ว จะเกิดการกระจายตัวของตัวทำละลายสกัดเป็นหยดเล็ก ๆ ในสารตัวอย่างที่เป็นน้ำ ทำให้เกิดสารละลายขุ่น (cloudy state) แล้วทำการแยกตัวทำละลายสกัดออกหลังจากปั่นเหวี่ยง [18] แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีต่อไป

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ใช้วิธีการสกัด DLLME เพื่อวิเคราะห์ PAHs ส่วนใหญ่จะประยุกต์ใช้วิเคราะห์ PAHs ในตัวอย่างน้ำเท่านั้น ยังมีการรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ PAHs ในตัวอย่างอาหารซึ่งมีความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างอยู่น้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการสกัด PAHs ออกจากตัวอย่างหมูปิ้ง โดยอาศัยการสกัดด้วย MAE และ DLLME ซึ่งช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิค HPLC

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สารเคมี

สารมาตรฐาน PAHs ที่ศึกษา 3 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน (fluorene) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) และ แอนทราซีน (anthracene) เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน (stock standard solution) แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 1000 ppm โดยละลายในอะซิโตนไทรล์ และเจือจางเป็นสารละลายที่นำไปใช้ (working standard solution) แต่ละความเข้มข้นก่อนใช้ใหม่ทุกครั้งโดยใช้อะซิโตนไทรล์เป็นตัวทำละลาย

สารเคมีอื่นๆ ได้แก่ อะซิโตนไทรล์ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เฮกเซน โซเดียมคลอไรด์ และน้ำปราศจากไอออน

2. เครื่องมือและสภาวะโครมาโทกราฟี

เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Shimadzu) ใช้ระบบกลับเฟส (reversed phase) คอลัมน์ที่ใช้ คือ C18 (VertiSep™) ยาว 15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ขนาด

อนุภาค 5 ไมโครเมตร ตัวตรวจวัดที่ใช้คือ diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่คือ อะซิโตนไทรล์/น้ำ อัตราส่วน 50:50 %v/v ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรที่ฉีดสาร 10 ไมโครลิตร

3. การสกัดด้วยเทคนิค DLLME

ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค DLLME แสดงดัง Figure 1 ทำการฉีดตัวทำละลายสกัด (คลอโรฟอร์ม 250 ไมโครลิตร) ซึ่งผสมกับตัวทำละลายช่วยกระจายตัว (อะซิโตนไทรล์ 3 มิลลิลิตร) ลงในสารตัวอย่างอย่างรวดเร็วโดยใช้กระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร จะเกิดการกระจายตัวของตัวทำละลายสกัดเป็นหยดเล็กๆ ทำให้เกิดสารละลายลักษณะขุ่น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำและตัวทำละลายสกัด จากนั้นแยกตัวทำละลายสกัดที่ได้ (ชั้นล่างที่ก้นหลอด) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป

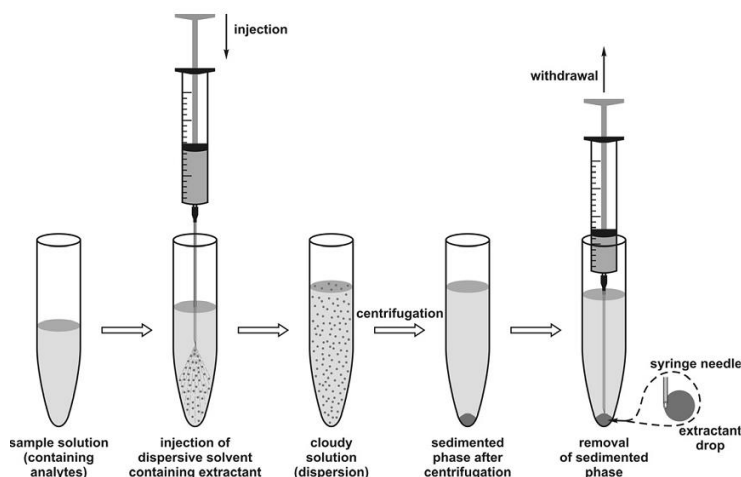


Figure 1 DLLME procedure [19]

4. การสกัดตัวอย่างหมูบึงด้วยเทคนิค MAE

ขั้นตอนการสกัดด้วยเทคนิค MAE สามารถทำได้โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างหมูบึงที่ผ่านการบดแล้ว 1 กรัม ในปิกรอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายคือสารผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เพื่อทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนและสกัด PAHs ที่สนใจออกจากตัวอย่าง แล้วนำเข้าเครื่องไมโครเวฟใช้กำลังไฟฟ้าที่ 300 วัตต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยจนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยเทคนิค DLLME ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

5. การศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธี

ศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการ ได้แก่ ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ความเที่ยง (precision) โดยทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน PAHs ความเข้มข้น 0.1 ppm ซ้ำกันวันละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 วัน และ ค่าการกลับคืน (recovery) โดยทำการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างหมูบึงที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 2.5 ppm

ผลการวิจัย

1. ศึกษาการแยก PAHs ด้วยเทคนิค HPLC

ศึกษาการแยกสารละลายของสารมาตรฐาน PAHs ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ฟลูออรีน ฟีนแอนทรีน และแอนทราซีน ที่ความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้อะซิโตนไทรล์ (ACN) และน้ำ (H₂O)

เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการศึกษาอัตราส่วนของ ACN:H₂O คือ 70:30, 60:40, 55:45 และ 50:50 %v/v พบว่าสภาวะที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น ACN:H₂O อัตราส่วน 50:50 %v/v สามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด โดยมีค่าการแยก (resolution, R_s) ระหว่างฟลูออรีน (พีคที่ 1) กับ ฟีนแอนทรีน (พีคที่ 2) เท่ากับ 1.41 และระหว่างฟีนแอนทรีน (พีคที่ 2) กับแอนทราซีน (พีคที่ 3) เท่ากับ 1.47 ซึ่งค่า R_s > 1.0 ถือว่าเป็นค่าที่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ [20]

2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PAHs ด้วยเทคนิค DLLME

เทคนิค DLLME เป็นการสกัดระบบตัวทำละลาย 3 องค์ประกอบ ได้แก่ ตัวทำละลายสกัด ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว และสารตัวอย่างที่เป็นน้ำ ซึ่งตัวทำละลายสกัดจะต้องมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำและละลายในน้ำได้เพียงเล็กน้อย ตัวทำละลายช่วยกระจายตัวจะต้องทำให้ตัวทำละลายสกัดเกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ได้ดี และสามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายสกัดและน้ำตัวอย่าง [18] ดังนั้นจึงทำการศึกษาง่ายต่อประสิทธิภาพการสกัดของเทคนิค DLLME ดังนี้ ชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วย

กระจายตัว ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยกระจายตัว

2.1 ชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยกระจายตัว

ตัวทำละลายสกัดที่ศึกษาได้แก่ ไดคลอโรมีเทน (DCM) และ คลอโรฟอร์มหรือไตรคลอโรมีเทน (TCM) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตัวทำละลายช่วยกระจายตัวที่เลือกนำมาใช้ในการสกัดได้แก่ ACN เมทานอล (MeOH) และอะซิโตน (Acetone) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทำการทดลองจะแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง พบว่าเมื่อนำตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยกระจายตัวในแต่ละคู่มาใช้ในการสกัด ตัวทำละลายทุกคู่สามารถแยกเฟสตัวทำละลายออกจากกันได้ยกเว้นการใช้ไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล และจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายสกัด และอะซิโตนไทรล์ เป็นตัวทำละลายช่วยกระจายตัวในเทคนิค DLLME ให้ประสิทธิภาพการสกัด (extraction recovery, %ER) สูงที่สุด ดัง Figure 2 ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ คลอโรฟอร์ม (ตัวทำละลายสกัด) และอะซิโตนไทรล์ (ตัวทำละลายช่วยการกระจายตัว)

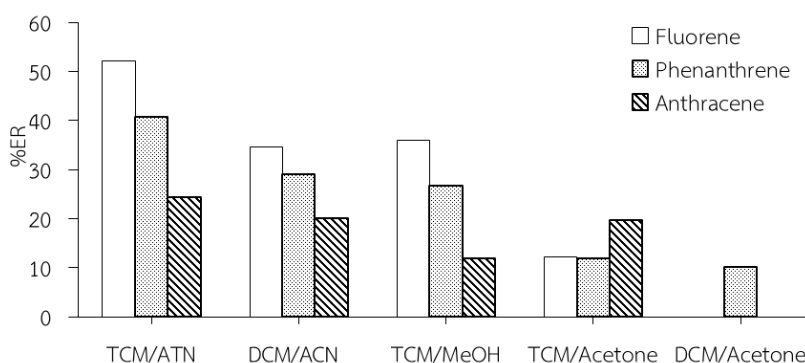


Figure 2 Effect of type of extraction and disperser solvents on the extraction recovery of the PAHs using DLLME (Extraction conditions: extraction solvent volume, 300 μ L; disperser solvent volume, 3 mL)

2.2 ปริมาตรของตัวทำละลายสกัด

การเลือกปริมาตรของตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสมมีความสำคัญสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ โดยจะต้องให้ค่าเพิ่มความเข้มข้น (enrichment factor, EF) สูง ซึ่งสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการสกัดนั่นเอง อีกทั้งยังต้องสามารถแยกเฟสสารได้มากพอที่จะทำไปวิเคราะห์ต่ออีกด้วย [21] ศึกษาปริมาตรของคลอโรฟอร์ม ในช่วง 150-400 ไมโครลิตร โดยใช้อะซิโตนไทรล์ 3 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายช่วยกระจายตัว ผลการทดลองแสดงดัง Figure 3 จะเห็นว่า

ปริมาตรที่เหมาะสมของคลอโรฟอร์มคือ 250 ไมโครลิตร เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ในการสกัดสูงที่สุด ถ้าเติมปริมาตรคลอโรฟอร์มน้อยเกินไปทำให้หยดของคลอโรฟอร์มมีปริมาณที่น้อยจึงสกัดสารมาตรฐาน PAHs ได้น้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดต่ำ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าเติมปริมาตรคลอโรฟอร์มมากเกินไป ทำให้ปริมาตรของชั้นสารละลายสกัดหลังปั่นเหวี่ยงมีมาก ส่งผลให้ค่า EF ต่ำ ประสิทธิภาพการสกัดจึงต่ำด้วย [21]

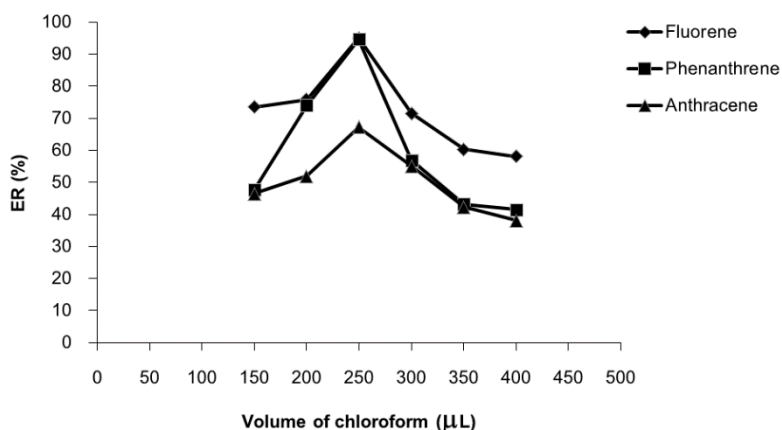


Figure 3 Effect of the volume of the extraction solvent (chloroform) on the extraction recovery of the PAHs using DLLME (Extraction condition: disperser solvent; 3 mL of acetonitrile)

2.3 ปริมาตรของตัวทำละลายช่วยกระจายตัว

การเลือกปริมาตรของตัวทำละลายช่วยกระจายตัวมีความสำคัญในการช่วยให้ตัวทำละลายสกัดกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ได้ดี เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสกัด ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดได้ [17] ศึกษาปริมาตรของอะซิโตนไทรล์ ในช่วง 1.0-4.0 มิลลิลิตร โดยใช้คลอโรฟอร์ม 250 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายสกัด ผลการทดลองแสดงดัง Figure 4 จะเห็นว่าปริมาตรที่เหมาะสมของอะซิโตนไทรล์

คือ 3 มิลลิลิตร เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การสกัดสูงที่สุด ถ้าเติมอะซิโตนไทรล์น้อยเกินไปจะทำให้การกระจายตัวของหยดคลอโรฟอร์มไม่ดีทำให้พื้นที่ผิวของหยดคลอโรฟอร์มน้อย ส่งผลให้สกัดสารได้น้อย ประสิทธิภาพการสกัดจึงน้อยด้วย แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าเติมอะซิโตนไทรล์มากเกินไปจะทำให้หยดของคลอโรฟอร์มละลายน้ำได้บางส่วน ทำให้ชั้นของสารละลายสกัดหลังปั่นเหวี่ยงมีปริมาตรน้อยลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง [21]

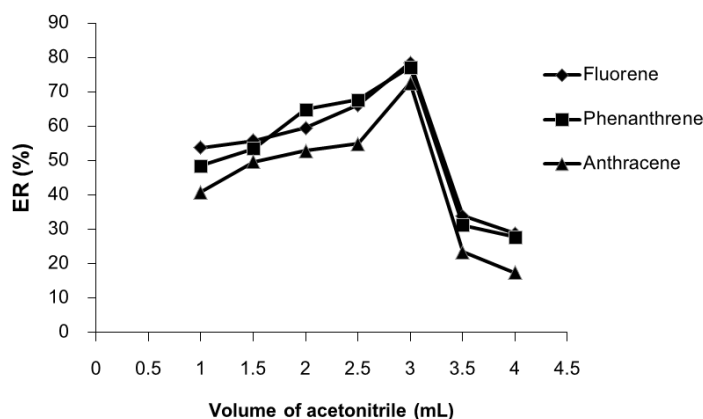


Figure 4 Effect of the volume of disperser solvent (acetonitrile) on the extraction recovery of the PAHs using DLLME (Extraction condition: extraction solvent; 250 µL of chloroform)

3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PAHs ด้วยเทคนิค MAE

เทคนิค MAE เป็นการให้พลังงานไมโครเวฟซึ่งเป็นการให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายอินทรีย์และสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นการเพิ่มการถ่ายเทมวลของสารที่สนใจจากตัวอย่างเข้าไปสู่ตัวทำละลายที่ใช้สกัด [22] เพื่อให้สามารถสกัด PAHs ออกจากตัวอย่างหมู่ปิ้งให้ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลดังนี้ ชนิดตัวทำละลายสกัดกำลังไฟฟ้าและระยะเวลาการสกัด

3.1 ชนิดของตัวทำละลายสกัด

การเลือกตัวทำละลายมีความสำคัญมากในกระบวนการสกัดโดยพิจารณาจากความสามารถในการละลายของสารที่สนใจ และความสามารถในการดูดกลืนไมโครเวฟ เนื่องจากสารที่สนใจคือ PAHs ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายที่ควรใช้จึงต้องไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยเช่นเดียวกัน จึงได้ทำการศึกษาตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ อะซิโตนไทรล์ (เป็นตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ในขั้นตอน DLLME) เฮกเซน

เนื่องจากตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน ไม่สามารถเกิดความร้อนเมื่อรับคลื่นไมโครเวฟ จะต้องมีการเติมตัวทำละลายชนิดอื่นที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กตริกสูง เช่น อะซิโตน เอทานอล เป็นต้น ผสมลงไปเพื่อช่วยให้เกิดความร้อนในตัวทำละลายได้ [23]

ในการทดลองจึงมีการเติมเอทานอลเพื่อช่วยให้เกิดการเพิ่มอุณหภูมิของตัวทำละลายได้ และยังสามารถช่วยตกตะกอนโปรตีนในตัวได้อย่างได้อีกด้วย ตัวทำละลายสกัดที่ศึกษาได้แก่

อะซิโตน ไทรอลกับเอทานอล และเฮกเซนกับเอทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้เฮกเซนกับเอทานอล มาสกัดด้วยเทคนิค MAE ให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด ดัง Figure 5 เนื่องจากความไม่มีขั้วของเฮกเซนทำให้สกัด PAHs ซึ่งไม่มีขั้ว เช่นเดียวกันได้ดี

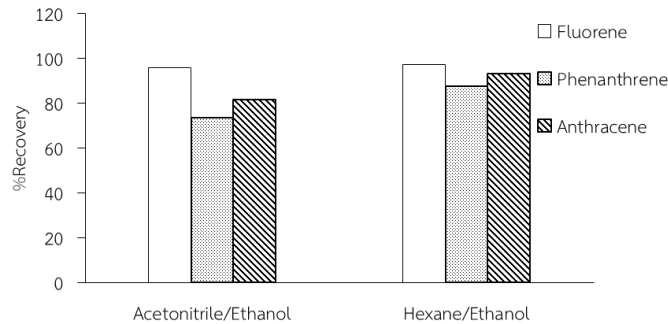


Figure 5 Effect of extraction solvent on the recovery (%) of the PAHs using MAE

(Extraction conditions: extraction solvent volume; 10 mL, extraction power; 300 W, extraction time; 1 min)

3.2 กำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการสกัด

กำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการสกัดด้วยเทคนิค MAE เป็นปัจจัยที่ต้องศึกษา เพื่อป้องกันการเกิดความร้อนที่สูงเกินไปซึ่งอาจทำให้สารที่สนใจเกิดการสลายตัวหรือเกิดความดันสูงเกินไปทำให้สารเกิดการกระเด็นหรือหกจากภาชนะบรรจุได้ [22] ในการทดลองได้ศึกษากำลังไฟฟ้าที่ 300 W และ 450 W โดยใช้เฮกเซนกับเอทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายสกัด จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 300 W จะทำให้มีพื้นที่ได้ฟักสูงและให้ประสิทธิภาพในการสกัด

สูง ผลแสดงดัง Figure 6 ดังนั้นกำลังไฟฟ้าที่ใช้ 300 W เป็นกำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดด้วยเทคนิค MAE ซึ่งกำลังไฟฟ้าที่ 450 W เป็นการใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงจะทำให้เกิดความร้อนและความดันสูงด้วย อาจทำให้เกิดการกระเด็นของตัวอย่างจึงสูญเสียตัวอย่างไปบางส่วนและอาจเกิดการระเหยของตัวทำละลายทำให้ปริมาตรของตัวทำละลายลดลงจากเดิม จึงสกัด PAHs ได้น้อยลง และส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดน้อยลงนั่นเอง

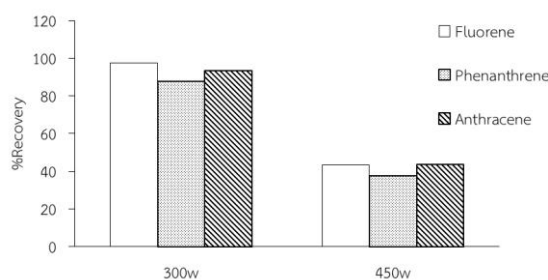


Figure 6 Effect of extraction power on the recovery (%) of the PAHs using MAE

(Extraction conditions: extraction solvent; hexane-ethanol (1:1), solvent volume; 10 mL, extraction time; 1 min)

3.3 เวลาที่ใช้ในการสกัด

เวลาที่ใช้ในการสกัดเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องศึกษา โดยทั่วไปการเพิ่มเวลาในการสกัด จะทำให้สามารถสกัดสารได้มากขึ้น แต่ก็ส่งผลต่อการสลายตัวของสารได้เช่นเดียวกัน [24] ในการทดลองได้ศึกษาเวลาในการสกัดที่ 1 และ 2 นาที โดยใช้เฮกเซนกับเอทานอล ในอัตราส่วน

1:1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายสกัด จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้เวลาสกัด 1 นาที จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด ผลแสดงดัง Figure 7 ซึ่งที่เวลา 2 นาที อาจจะทำให้เกิดความร้อนสูงทำให้ตัวทำละลายบางส่วนไปส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดน้อยลง

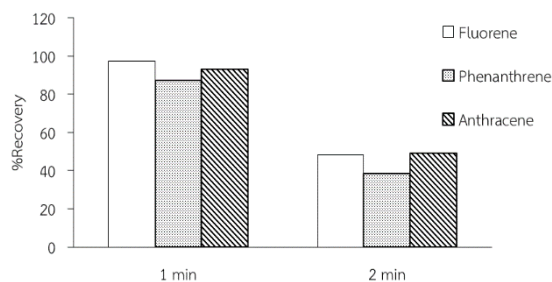


Figure 7 Effect of extraction time on the recovery (%) of the PAHs using MAE

(Extraction conditions: extraction solvent; hexane-ethanol (1:1), solvent volume; 10 mL, extraction power; 300 W)

4. การศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธี

ศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีการ ได้แก่ ซีตจำกัดการตรวจวัด ช่วงความเป็นเส้นตรง ความเที่ยง และ ค่าการกลับคืน แสดงค่าใน Table 1 พบว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ PAHs ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ค่าความเป็นเส้นตรง

อยู่ในช่วง 0.02 – 10 พีพีเอ็ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) มากกว่า 0.99 มีค่าความเที่ยงที่ดี คือมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 5% และค่าการกลับคืนอยู่ในช่วง 75.38 – 93.60 เปอร์เซ็นต์

Table 1 Analytical performance for PAHs obtained from MAE-DLLME-HPLC

PAHs	LOD (ppb)	Linear range (ppm)	Precision		% Recovery	
			Intra-day (n=10)	Inter-day (n=10*3 days)	0.5 ppm	2.5 ppm
Fluorene	10	0.02-10	3.09	3.23	89.85	81.85
Phenanthrene	10	0.02-10	2.72	3.30	93.60	77.99
Anthracene	15	0.02-10	3.51	4.09	86.65	75.38

5. การวิเคราะห์ PAHs ในตัวอย่างหุ้บั้ง

ประยุกต์ใช้วิธี MAE-DLLME-HPLC ที่ได้วิเคราะห์หา PAHs ในตัวอย่างหุ้บั้งซึ่งสุ่มตัวอย่างจากบริเวณหน้ามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน นครราชสีมา โดยนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดก่อนจะทำการสกัดด้วยเทคนิค MAE และ DLLME ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยทำการ

เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เดิมสารมาตรฐาน PAHs ที่ความเข้มข้น 0.5 ppm ผลการวิเคราะห์ดัง Figure 8 พบว่ามีพีคขึ้นที่เวลาการคงอยู่ (retention time, t_R) เดียวกันกับสารมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างหุ้บั้งตรวจพบฟลูออรีนและฟิแนนทริน ซึ่งมีความเข้มข้น 0.0681 $\mu\text{g/g}$ และ 0.1632 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ

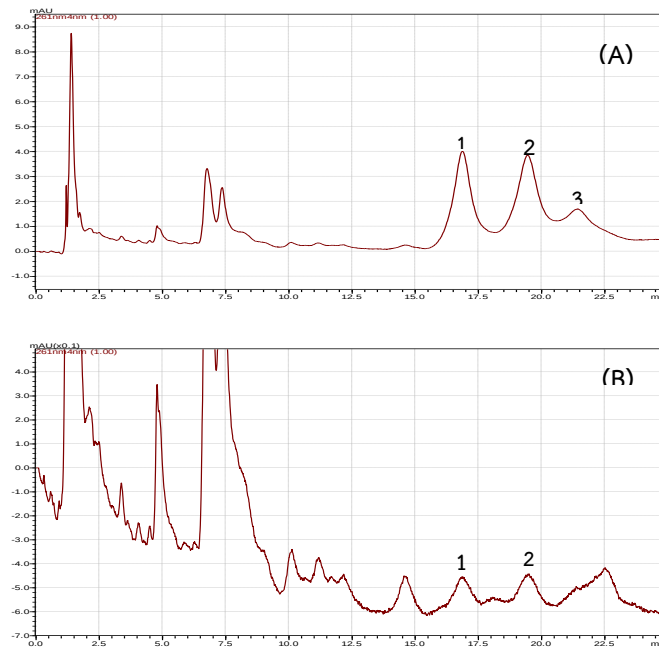


Figure 8 Chromatograms of the studied PAHs obtained from grilled pork sample using MAE-DLLME-HPLC method
 (A) spiked sample (0.5 ppm) and (B) non-spiked sample (Peak assignment; 1 = fluorine, 2 = phenanthrene and 3 = anthracene)

สรุปและเสนอแนะ

การศึกษาเทคนิคการสกัดสารกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยใช้การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับการสกัดระดับจุลภาคโดยอาศัยการกระจายตัวของของเหลว และวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าวิธีที่ได้มีความเที่ยงและความถูกต้องสูง ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดน้อย เวลาในการสกัดสั้น สามารถวิเคราะห์ PAHs ได้ในความเข้มข้นต่ำถึงระดับพีพีบีและสามารถประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ในตัวอย่างหมูปังได้จริง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ตามสัญญาเลขที่ NKR2561REV025 และผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี นครราชสีมา สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

Reference

- [1] Dost, K. and Ideli, C. 2012. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection". **Food Chemistry**. 133: 193-199.
- [2] Kao, T.H. and et al. 2014. "Occurrence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in kindling-free-charcoal grilled meat products in Taiwan". **Food and Chemical Toxicology**. 71: 149-158.
- [3] Plaza-Bolaños, P., Frenich, A.G. and Vidal, J. 2010. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages: Analytical methods and trends". **Journal of Chromatography A**. 1217: 6303-6326.
- [4] National Food Institute, Ministry of Industry. 2009. **Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs; Carcinogen from PAHs**. <http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/PAHs.pdf>. Accessed 18 July 2017. (in Thai)

- [5] Tavakoli, L. and et al. 2008. "Homogeneous liquid-liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system". **Journal of Chromatography A**. 1196-1197: 133-138.
- [6] Olatunji, O.S. and et al. 2014. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography – flame ionization detector". **Food Chemistry**. 156: 296-300.
- [7] Lee, J.G. and et al. 2016. "Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats". **Food Chemistry**. 199: 632-638.
- [8] Xu, H. and et al. 2009. "A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples". **Analytica Chimica Acta**. 636: 28-33.
- [9] Molle, D.R.D. and et al. 2017. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake". **Food Control**. 81: 96-100.
- [10] Santonicola, S. and et al. 2017. "Study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and meat/fish based baby food available in Italy". **Chemosphere**. 184: 467-472.
- [11] Chen, B. and Lin, Y. 1997. "Formation of polycyclic hydrocarbons during processing of duck meat". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45(4): 1394-1403.
- [12] Chan, C.-H. and et al. 2011. "Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants". **Journal of Chromatography A**. 1218: 6213-6225.
- [13] Basheer, C., Obbard, J.P. and Lee, H.K. 2005. "Analysis for persistent organic pollutants in marine sediments using a novel microwave assisted solvent extraction and liquid-phase microextraction technique". **Journal of Chromatography A**. 1068: 221-228.
- [14] Tfouni, S. and et al. 2009. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice". **Food Chemistry**. 113: 391-394.
- [15] Liang, H.-D., Han, X.-P. and Yan, X.-P. 2006. "Cigarette filter as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water". **Journal of Chromatography A**. 1103: 9-14.
- [16] Ojeda, C.B. and Rojas, F.S. 2011. "Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: Recent application". **Chromatographia**. 74: 651-679.
- [17] Rezaee, M. and et al. 2006. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction". **Journal of Chromatography A**. 1116: 1-9.
- [18] Zang, X.H. and et al. 2009. "Development of dispersive liquid-liquid microextraction technique". **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. 37(2): 161-168.
- [19] Zagola-Grzeskowiak, A. and Grzeskowiak, T. 2011. "Dispersive liquid-liquid microextraction". **Trends in Analytical Chemistry**. 30(9): 1382-1399.
- [20] Weston, A. and Brown, P.R. 1997. **HPLC and CE : Principles and Practice**. San Diego, Academic Press.
- [21] Rezaee, M., Yamini, Y. and Faraji, M. 2010. "Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method". **Journal of Chromatography A**. 1217: 2342-2357.
- [22] Sibiya, P. and et al. 2013. "Development and application of microwave assisted extraction (MAE) for the extraction of five polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment sample in Johannesburg area, South Africa". **Environmental Monitoring and Assessment**. 185: 5537-5550.
- [23] Shu, Y.Y. and et al. 2000. "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment reference materials by microwave-assisted extraction". **Chemosphere**. 41: 1709-1716.

- [24] Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S. 2007.
“Microwave-assisted extraction: an innovating
and promising tool for medicinal plant
research”. *Pharmacognosy Reviews*. 1: 7-18.