

แก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบเปลวไอออนในเซชัน สำหรับการหาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด Gas Chromatography-Flame Ionization Detection for Determination of Acrylamide in Potato Chip

อนุวัฒน์ รัศมีสมศรี และวาราวุธ ตียพงศ์พัฒนา*

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย 12120

Anuwat Ratsamisomsi and Warawut Tiyapongpatana*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Center,

Khlong Neung, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

อะคริลาไมด์จัดเป็นสารก่อมะเร็งที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงในกระบวนการปรุงอาหาร อะคริลาไมด์เป็นผลผลิตพลอยได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างหมู่เอมีนของแอสพาราจिनกับหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ พัฒนาริธีแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ที่มีการตรวจวัดแบบเปลวไอออนในเซชัน (flame ionization detection, FID) สำหรับหาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด โดยสกัดอะคริลาไมด์จากตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปกำจัดไขมัน น้ำมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนก่อนการเตรียมอนุพันธ์ด้วยแซนไธนดรอล สกัดอนุพันธ์ที่ได้ด้วยอะมิโนซิลและตรวจวัดด้วย GC-FID และศึกษาสภาวะในการทดลองต่าง ๆ ได้แก่ การเตรียมตัวอย่างให้สะอาดขึ้น ความเข้มข้นของแซนไธนดรอลและกรดไฮโดรคลอริก เวลาและอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ความเข้มข้น 70-140,000 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ($r^2 = 0.9994$) ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณได้เท่ากับ 14 และ 70 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้หาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด 6 ตัวอย่าง พบว่ามีอะคริลาไมด์ในช่วงความเข้มข้น 1.52-13.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 78.10-111.87

คำสำคัญ : แก๊สโครมาโทกราฟี; เพรหมไอออนในเซชัน; อะคริลาไมด์; แซนไธนดรอล; มันฝรั่งทอด

Abstract

Acrylamide is a carcinogenic compound that can be formed at high temperature during the cooking process. Acrylamide is a byproduct of the Maillard reaction between the amino group of

asparagine and carbonyl groups of reducing sugars. The objective of this work was to develop a quantification method of acrylamide in potato chip using gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). Acrylamide in the samples was extracted with deionized water. Fat, oil, carbohydrate and protein in the water extract were then removed before derivatization with xanthidrol. Finally, the derivative was extracted with anisole and analyzed using GC-FID. Some influential parameters were studied such as sample clean-up, the concentration of xanthidrol and hydrochloric acid, derivatization time and temperature of derivatization, and type of extraction solvent. Under the optimal conditions, the calibration curve was linear in the range of 70-140,000 ng/kg ($r^2 = 0.9994$). Limits of detection and quantitation were 14 and 70 ng/kg, respectively. Acrylamide content in six potato chip samples was analyzed using the developed method and found in the range of 1.52-13.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with the recoveries of 78.10-111.87 %.

Keywords: gas chromatography; flame ionization detector; acrylamide; xanthidrol; potato chip

1. บทนำ

กระบวนการปรุงอาหารที่ใช้ความร้อน เช่น การทอด การอบ และการย่างนั้น หมูอะนิโนของแอสพาราจีนกับหมูคาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวิซ์ เช่น ฟรุตโตส กลูโคส สามารถเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ทำให้อาหารมีสีน้ำตาลและกลิ่นรสต่าง ๆ แต่ถ้าหากเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่าอะคริลาไมด์ (acrylamide หรือ 2-propenamide, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$) [1] เมื่ออะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดอาการแพ้ วิงเวียนศีรษะ ส่งผลต่อระบบโครโมโซม อาจก่อให้เกิดมะเร็ง และอาจเสียชีวิตได้ หากได้รับในปริมาณที่มากเกินไป โดยองค์การอนามัยโลกได้จัดให้อะคริลาไมด์เป็นสารพิษและสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ [2] โดยอาหารที่อาจพบอะคริลาไมด์ ได้แก่ มันฝรั่งทอด เฟรนช์ฟรายส์ คุกกี้ ขนมปัง กาแฟ ซีเรียล เป็นต้น [3]

องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, FAO/WHO) แนะนำว่าไม่ควร

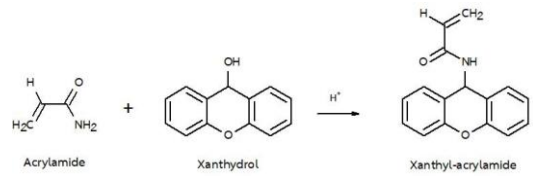
บริโภคอาหารที่มีปริมาณอะคริลาไมด์เกิน 0.3-0.8 ไมโครกรัมอะคริลาไมด์ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน [4] นอกจากนี้ องค์การอนามัยโลกและสหภาพยุโรป (European Union, EU) กำหนดปริมาณอะคริลาไมด์ในน้ำดื่มไม่เกิน 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร [5] และ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร [6] ตามลำดับ ส่วนสำนักงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Environmental Protection Agency, US EPA) กำหนดให้น้ำดื่มจะต้องตรวจไม่พบอะคริลาไมด์ [7] ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจวัดที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับหาปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์มีหลายวิธี เช่น ไอออนโครมาโทกราฟีร่วมกับแมสสเปคโตรเมทรี (ion chromatography mass spectrometry, IC-MS) [8] โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับแมสสเปคโตรเมทรี (high-performance liquid chromatography - mass spectrometry, HPLC-MS) [9] แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ที่มีการตรวจวัดแบบอิเล็กตรอนแคปเจอร์ (electron capture detector, GC-ECD) [10] เฟรม

ไอออนไนเซชัน (flame-ionization detection, GC-FID) [11] และแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry, GC-MS) [12] โดยวิธีที่มีการตรวจวัดมวลด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถระบุและยืนยันชนิด อีกทั้งยังมีความสามารถในการเลือกและมีสภาพไวที่ดี อย่างไรก็ตาม เครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพงและมีการดูแลรักษาที่ยุ่งยาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบเฟรมไอออนไนเซชัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย มีความเที่ยงและแม่นยำ อีกทั้งเครื่องมือยังมีราคาถูกอีกด้วย

อย่างไรก็ตาม วิธีแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบเฟรมไอออนไนเซชันสำหรับการตรวจวัดอะคริลาไมด์มีสภาพไวค่อนข้างต่ำ เนื่องจากอะคริลาไมด์มีจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างที่น้อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มสภาพไวในการตรวจวัดโดยอาศัยการเตรียมอนุพันธ์ให้ได้อนุพันธ์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้น งานวิจัยที่ผ่านมานิยมเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับโบรมีนในตัวอย่งน้ำ [13] และอาหาร [10,14,15] ซึ่งข้อดีของวิธีนี้ คือ อนุพันธ์ที่ได้เป็นสารที่ระเหยได้ง่ายขึ้น มีเอกลักษณ์เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ และเพิ่มสภาพไวเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่องอิเล็กตรอนแคปเจอร์ [16] แต่ยังไม่มีความเหมาะสมกับเครื่องตรวจวัดชนิดเฟรมไอออนไนเซชัน เนื่องจากอนุพันธ์ที่ได้ไม่มีจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้น ในปี ค.ศ. 2011 Yamazaki และคณะเสนอวิธีการเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ในอาหารด้วยแซนโทนดรออลสำหรับวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับแมสสเปกโตรเมทรี [17] ซึ่งปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์แสดงดังรูปที่ 1 วิธีนี้ได้อนุพันธ์ที่มีมวลมากขึ้นจึงทำให้การตรวจวัดมีสภาพไวสูง อีกทั้งยังมีจำนวนคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่อนุพันธ์ดังกล่าว จะเพิ่มสภาพไวในการ

การตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดเฟรมไอออนไนเซชัน



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ด้วยแซนโทนดรออล [17]

ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การพัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบเฟรมไอออนไนเซชันร่วมกับการเตรียมอนุพันธ์ด้วยแซนโทนดรออลเพื่อหาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด โดยจะศึกษาสภาวะต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเตรียมตัวอย่างให้สะอาดขึ้นและการเตรียมอนุพันธ์ให้มีความเสถียรและรวดเร็วขึ้น เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงและความแม่นยำสูง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยเป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเกรดสำหรับแก๊สโครมาโทกราฟี (GC grade) และเกรดสำหรับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC grade) ทั้งหมด และใช้น้ำปราศจากไอออน (ELGASTAT UHQ PS, ELGA, อังกฤษ)

สารเคมีประกอบด้วยอะคริลาไมด์ (C_3H_5NO , Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) อะเซตาไมด์ C_2H_5NO , Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) แซนโทนดรออล ($C_{13}H_{10}O_2$, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) กรดไฮโดรคลอริก (37 %w/w, HCl, RCI Labscan, ไทย) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, RCI Labscan, ไทย) โพสแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ไตรไฮเดรต [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, Carlo Erba, ฝรั่งเศส] ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต

(ZnSO₄·7H₂O, RCI Labscan, ไทย)

ตัวทำละลายอินทรีย์ประกอบด้วยอะนิโซล (C₇H₈O, Merck, เยอรมนี) เฮกเซน (C₆H₁₄) เฮปเทน (C₇H₁₂) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl₄) และไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) เมทานอล (CH₃OH) จาก RCI Labscan, ไทย

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC 2010 plus, Shimadzu, ญี่ปุ่น) ประกอบด้วยเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (AOC 5000 plus, Shimadzu, ญี่ปุ่น) คอลัมน์ชนิด HP-5MS (30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร, Agilent Technologies, เยอรมนี)

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีตั้งอุณหภูมิของส่วนฉีดสารที่ 300 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีดตัวอย่าง 2 ไมโครลิตร โปรแกรมอุณหภูมิของตู้อบเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส และคงที่ไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที เพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนถึง 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 300 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 30 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ไว้ 18 นาที เครื่องตรวจวัดมีอุณหภูมิ 310 องศาเซลเซียส โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาที่มีอัตราการไหลที่ความแรงเชิงเส้น 25 เซนติเมตรต่อวินาที

2.2.2 ตัวอย่างมันฝรั่งทอด

ตัวอย่างมันฝรั่งทอดซื้อจากร้านค้าในพื้นที่กรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยมันฝรั่งทอดจะนำมาบดให้ละเอียดและเก็บในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้องก่อนการวิเคราะห์

2.2.3 การสกัดอะคริลาไมด์จากมันฝรั่งทอด

ซึ่งตัวอย่างมันฝรั่งทอดที่บดละเอียด

แล้ว 1.50xx กรัม ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลายมาตรฐานภายในอะเซตาไมด์ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 30.00 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker 3006, Gesellschaft für Labortechnik, เยอรมนี) ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (TGL20MB, Xiangzhi, จีน) ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกสารละลายตัวอย่างส่วนใสลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างไปกำจัดไขมันและน้ำมันโดยเติมเฮกเซนปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป Vortex ที่ความเร็ว 3,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แยกชั้นสารละลายตัวอย่างและเฮกเซนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ไปกำจัดคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายคาร์เนสที่หนึ่ง [Carrez I solution, K₄Fe(CN)₆·3H₂O] เข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และสารละลายคาร์เนสที่สอง (Carrez II solution, ZnSO₄·7H₂O) ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอย่างละ 250 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วนำไป Vortex ที่ความเร็ว 3,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.2.4 การเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์และการสกัด

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากตอนที่

2.2.3 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลายแซนไทน์ดรอแล็กซ์ 1.5 %w/v ในเมทานอล และสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.6 โมลต่อลิตร ปริมาตร

ละ 1.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำเค็มคลอรีน 1.2 กรัม และอะนิโซล ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง นำไป Vortex ที่ความเร็ว 3,200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อสกัดอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ (แซนทิลอะคริลาไมด์) ไปยังชั้นอะนิโซล จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

2.2.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

กราฟมาตรฐานเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ (แกน x) กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคระหว่างแซนทิลอะคริลาไมด์กับแซนทิลอะเซตาไมด์ (แกน y)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เตรียมได้จากการปิเปตสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 125 และ 250 ไมโครลิตร เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เตรียมได้จากการปิเปตสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25, 125, 250, 1,250 และ 2,500 ไมโครลิตร ตามลำดับ และสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, และ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร เตรียมได้จากการปิเปตสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25, 125, 250 and 1,250 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ทุกความเข้มข้นจะเติมสารละลายมาตรฐานภายในอะเซตาไมด์

เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 25 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร และเตรียมตัวอย่างและการเตรียมอนุพันธ์เช่นเดียวกับตัวอย่างมันฝรั่งทอดในขั้นตอน 2.2.3 และ 2.2.4 ยกเว้นขั้นตอนสกัดอะคริลาไมด์จากมันฝรั่งทอดด้วยน้ำ

3. ผลการทดลอง

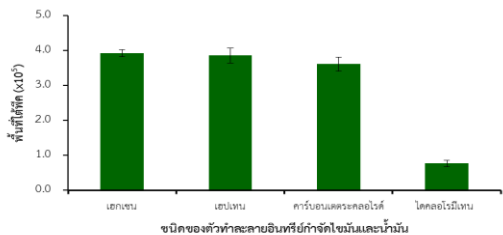
3.1 การสกัดอะคริลาไมด์จากมันฝรั่งทอด

มันฝรั่งทอดนอกจากจะมีไขมันและน้ำมันที่ได้จากกระบวนการปรุงอาหารแล้ว ยังมีคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนอีกด้วย ซึ่งรบกวนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ได้ ดังนั้นเพื่อให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพจึงต้องมีการกำจัดสิ่งเจือปนเหล่านี้ก่อนการเตรียมอนุพันธ์และการสกัด

3.1.1 การกำจัดไขมันและน้ำมัน

(1) ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ การกำจัดไขมันและน้ำมันในมันฝรั่งทอดนิยมใช้การสกัดแบบของเหลว-ของเหลว โดยสมบัติของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกำจัดไขมันและน้ำมันที่เหมาะสม คือ (ก) ละลายไขมันและน้ำมันจากมันฝรั่งทอดได้ (ข) ไม่สกัดอะคริลาไมด์และอะเซตาไมด์จากชั้นน้ำ (ค) ไม่ละลายและแยกออกจากชั้นน้ำได้ง่าย จากสมบัติดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเฮกเซน เฮปเทน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และไดคลอโรมีเทน เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกำจัดไขมันและน้ำมันในมันฝรั่งทอด ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด สามารถกำจัดไขมันและน้ำมันได้ใกล้เคียงกัน แต่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไดคลอโรมีเทน สามารถสกัดอะคริลาไมด์ได้ โดยอะคริลาไมด์จะถูกสกัดออกไ้มากขึ้นตามสภาพความมีขี้ที่มากขึ้นของตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้อะคริลาไมด์สูญเสียไปมากที่สุดเมื่อ

สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ขณะที่การสกัดด้วยเฮกเซน และเฮปเทนจะมีปริมาณอะคริลาไมด์เหลืออยู่สูงสุดใกล้เคียงกัน แต่พบว่า การสกัดด้วยเฮกเซนมีความเที่ยงที่ดีกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับกำจัดไขมันและน้ำมัน



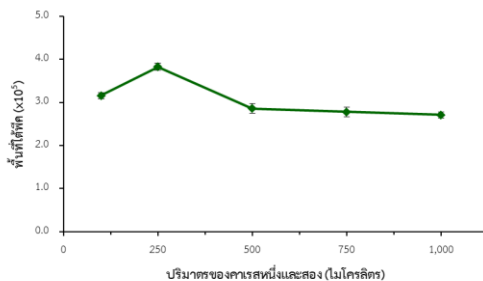
รูปที่ 2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดไขมันและน้ำมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กำจัดไขมัน

(2) จำนวนครั้งในการสกัดเพื่อกำจัดไขมันและน้ำมัน การเพิ่มประสิทธิภาพของการกำจัดไขมันและน้ำมันทำได้โดยการเพิ่มจำนวนครั้งในการสกัดด้วยเฮกเซน จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดจำนวน 1 และ 2 ครั้ง ผลทดลองพบว่า การสกัดในครั้งที่ 2 พบว่าไม่มีไขมันหรือน้ำมันถูกสกัดไปยังชั้นเฮกเซนแล้ว นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของพีคต่าง ๆ ในโครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดทั้ง 1 และ 2 ครั้ง ดังนั้นการสกัดด้วยเฮกเซนเพียงครั้งเดียวจึงเพียงพอที่จะกำจัดไขมันและน้ำมันในมันฝรั่งทอด

3.1.2 การตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน

มันฝรั่งทอดมีส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งรบกวนการเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สารละลายคาร์โบไฮเดรตที่มีสมบัติในการตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่ละลายน้ำ สามารถกำจัดความขุ่นและการทำลายอิมัลชัน [18] โดยได้ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายคาร์โบไฮเดรตที่หนึ่งและคาร์โบไฮเดรตที่สอง

ตั้งแต่ 100-1,000 ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของสารละลายคาร์โบไฮเดรตสองชนิด ชนิดละตั้งแต่ 100 ถึง 250 ไมโครลิตร จะให้สัญญาณของแชนเทิลอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่ละลายน้ำตกตะกอน ทำให้สามารถสกัดแชนเทิลอะคริลาไมด์ได้มากขึ้น และจำนวนพีคเมทริกซ์ลดน้อยลง แต่เมื่อใช้สารละลายคาร์โบไฮเดรตเพิ่มมากขึ้น พบว่าสัญญาณของแชนเทิลอะคริลาไมด์ลดลง อันเป็นผลมาจากอะคริลาไมด์มีหมู่อะมิโน (-NH₂) จึงสามารถตกตะกอนร่วมได้ ดังนั้นปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายคาร์โบไฮเดรตที่หนึ่งและที่สอง คืออย่างละ 250 ไมโครลิตร



รูปที่ 3 ผลการศึกษาการตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนด้วยสารละลายคาร์โบไฮเดรต

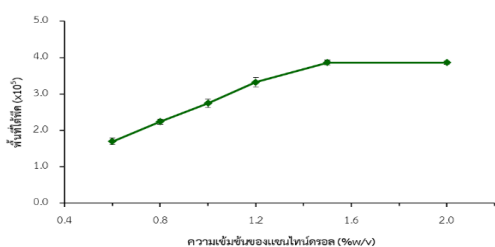
3.2 การเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์และการสกัด

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ที่นำเสนอโดย Yamazaki และคณะ [17] โดยได้ศึกษาสภาวะของปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ด้วยแชนไทน์ดรอแล เพื่อลดเวลาและเพิ่มสภาพไวในการวิเคราะห์ให้ดีขึ้น

3.2.1 ความเข้มข้นของสารละลายแชนไทน์ดรอแล

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายแชนไทน์ดรอแลเป็นพารามิเตอร์แรกที่ศึกษาใน

การเตรียมอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแชนไทน์ทรอลตั้งแต่ 0.6-2.0 %w/v ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าปริมาณของแชนไทลอะคริลาไมด์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายแชนไทน์ทรอลจาก 0.6-1.5 %w/v และเริ่มคงที่ นอกจากนี้ขนาดพิกของแชนไทน์ทรอลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นอีกด้วย ซึ่งสัมพันธ์กับพิกของแชนไทลอะคริลาไมด์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นที่ 1.5 %w/v

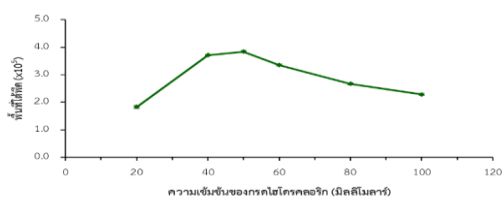


รูปที่ 4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแชนไทน์ทรอลที่มีผลต่อการเตรียมอนุพันธ์

3.2.2 ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของแชนไทน์ทรอลกับหมู่เอไมด์ (-CONH₂) ของอะคริลาไมด์เป็นปฏิกิริยาแทนที่แบบ S_N2 [19] ซึ่งหมู่ -OH ของแชนไทน์ทรอลเป็นหมู่ถูกแทนที่ที่ไม่ดี ส่งผลให้อะคริลาไมด์เข้ามาทำปฏิกิริยาได้ยาก ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้หมู่ -OH รับโปรตอนไปอยู่ในรูป -OH₂⁺ ซึ่งเป็นหมู่ถูกแทนที่ที่ดีขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก รูปที่ 5 แสดงผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกตั้งแต่ความเข้มข้น 0-100 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อไม่เติมกรดไฮโดรคลอริก (0 มิลลิโมลาร์) จะไม่พบพิกของแชนไทลอะคริลาไมด์ในโครมาโทแกรม นั้นแสดงให้เห็นว่า แชนไทน์ทรอลไม่สามารถ

ทำปฏิกิริยากับอะคริลาไมด์ได้ แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจาก 20-50 มิลลิโมลาร์ พบว่าสัญญาณของแชนไทลอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมากกว่า 50 มิลลิโมลาร์ สัญญาณที่ได้กลับลดลง อาจเป็นผลเนื่องมาจาก pH ต่ำเกินไปไม่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมคือ 50 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่มีผลต่อการเตรียมอนุพันธ์

3.2.3 อุณหภูมิและเวลาของการเตรียมอนุพันธ์

อัตราของปฏิกิริยาสามารถควบคุมโดยอุณหภูมิและเวลา เมื่ออุณหภูมิต่ำอัตราของปฏิกิริยาจะช้าส่งผลให้ใช้เวลานานในทางกลับกัน การเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะช่วยลดเวลาของปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์ [20] ดังนั้นจึงศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์ ตั้งแต่ 30 (อุณหภูมิห้อง) ถึง 80 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณแชนไทลอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และลดลงหลังจากอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากอาจเกิดการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ [20] ดังนั้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์ จากนั้นได้ศึกษาเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ตั้งแต่เวลา 15-150 นาที ผลการทดลองพบว่า

ปริมาณแชนทิลอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น จาก 15 จนถึง 20 นาที และลดลงหลังจากเวลา 20 นาที เนื่องจากการใช้เวลานาน ณ อุณหภูมิสูงอาจส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สลายตัวได้ ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ คือ 20 นาที

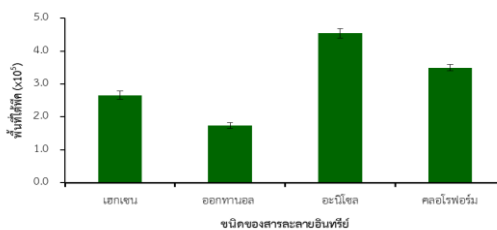
3.2.4 ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการสกัดแชนทิลอะคริลาไมด์

ชนิดของสารละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดแชนทิลอะคริลาไมด์จากชั้นน้ำไปยังชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อตรวจวัดต่อด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ถือว่าเป็นพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญ โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมควรมีสสมบัติ เช่น สามารถสกัดแชนทิลอะคริลาไมด์จากชั้นน้ำได้ เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่แยกชั้นจากน้ำได้ดีหลังจากการสกัด นอกจากนี้ยังมีพฤติกรรมทางโครมาโทกราฟที่ดี [21] จากสมบัติดังกล่าวจึงได้เลือกเฮกเซน โทลูอิน ออกทานอล อะนิโซล และคลอโรฟอร์มเพื่อนำมาศึกษา ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6 พบว่าโทลูอินเป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากสามารถสกัดเมทริกซ์ที่ซ้อนทับกับพีคของแชนทิลอะคริลาไมด์ จึงไม่สามารถแสดงผลการทดลองที่ได้จากการสกัดด้วยโทลูอิน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอะนิโซลสามารถสกัดแชนทิลอะคริลาไมด์ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากมีสภาพขั้วเหมาะสมกับแชนทิลอะคริลาไมด์ ดังนั้นจึงใช้อะนิโซลในการสกัดแชนทิลอะคริลาไมด์จากชั้นน้ำ

3.3 การประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การประเมินความใช้ได้ของวิธีใช้เกณฑ์จาก The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods [22] ภายใต้สถานะที่เหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้น ช่วงความเป็น

เส้นตรงและสัมประสิทธิ์การวิเคราะห์ (linear range and determination of coefficient) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of detection) ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) แสดงในตารางที่ 1 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 70-140,000 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า $r^2 = 0.9994$ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง สามารถวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันได้ สามารถตรวจวัดและหาปริมาณได้ต่ำถึง 14 และ 70 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม วิธีนี้มีความเที่ยงที่สูง โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.91 และ 9.72 % ของการทำซ้ำภายในวันเดียวและการซ้ำระหว่างวันตามลำดับ ซึ่งการประเมินความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ อยู่ในช่วงการยอมรับได้ของ AOAC



รูปที่ 6 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการสกัดแชนทิลอะคริลาไมด์

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอดจำนวน 6 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าปริมาณอะคริลาไมด์อยู่ในช่วง 1.52-13.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ได้ศึกษาความแม่นยำของวิธี โดยอาศัยค่าร้อยละการกลับกลับคืน (% recovery) ที่ความเข้มข้น 20 และ 100

ตารางที่ 1 การประเมินความใช้ได้ของวิธีในการหาปริมาณอะคริลาไมด์

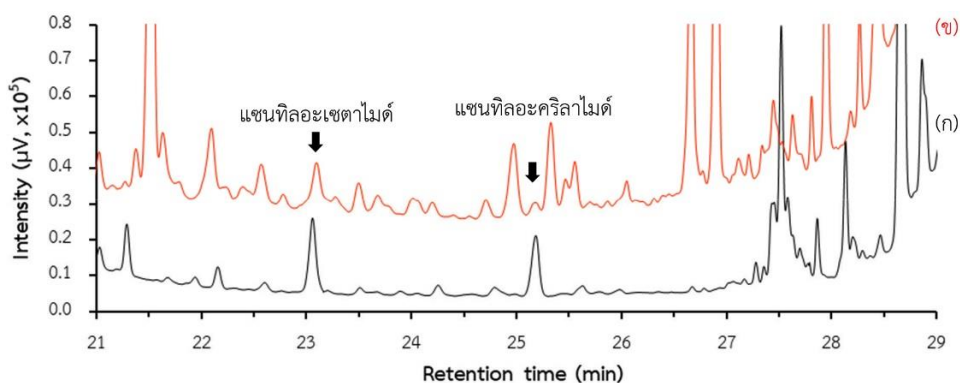
พารามิเตอร์	ผลการทดสอบ	เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณา ^{ก)}
ช่วงความเป็นเส้นตรง	70-140,000 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ($r^2 = 0.9994$)	$r^2 > 0.99$
ขีดจำกัดการตรวจวัด	14 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม	3S/N
ขีดจำกัดการหาปริมาณ	70 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม	10S/N
ความเที่ยง (% RSD)		
- ภายในวันเดียวกัน (intra day)	4.91 % ^{ข)} (HORRATr = 0.57)	HORRATr = 0.5 – 2
- ระหว่างวัน (inter day)	9.72 % ^{ข)} (HORRATr = 0.65)	HORRATr = 0.5 – 2

^{ก)}เกณฑ์จาก AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods; ^{ข)}ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 10 ครั้ง (n = 10)

ตารางที่ 2 ปริมาณและร้อยละการกลับคืนของอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด

ตัวอย่าง	ปริมาณอะคริลาไมด์ (Mean±SD ^{ก)} , ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละการกลับคืน (% (Mean±SD ^{ข)})	
		20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ^{ข)}	100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ^{ข)}
มันฝรั่งทอด ก	3.30±0.14	93.81±7.46	106.00±7.57
มันฝรั่งทอด ข	13.09±0.38	89.13±2.86	111.87±5.10
มันฝรั่งทอด ค	1.52±0.05	90.09±5.23	91.36±4.61
มันฝรั่งทอด ง	9.86±0.17	78.10±4.42	89.22±7.96
มันฝรั่งทอด จ	6.77±0.24	80.30±5.40	87.39±2.50
มันฝรั่งทอด ฉ	2.37±0.03	81.01±4.18	89.01±4.82

^{ก)}ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง (n = 3); ^{ข)}ความเข้มข้นที่เติมลงไปในตัวอย่



รูปที่ 7 GC-FID โครมาโทแกรมที่ได้จาก (ก) สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ และ (ข) มันฝรั่งชนิด ก

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 78.10-111.87 % ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับของ AOAC (75-125 %) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแซนทิลอะคริลาไมด์ที่ได้จากการเตรียมอนุพันธ์และมันฝรั่งทอด ก แสดงดังรูปที่ 7 ซึ่งจะเห็นได้ว่าพีคของอะคริลาไมด์สามารถแยกออกจากเมทริกซ์ได้ดี

4. สรุป

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบแฟรมไอออนในเซชันร่วมกับการเตรียมอนุพันธ์สำหรับการหาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความเที่ยงและความแม่นยำสูงเนื่องจากการใช้สารละลายมาตรฐานภายในอะเซตาไมด์ร่วมด้วย นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีขั้นตอนที่ง่าย สามารถกำจัดเมทริกซ์ได้เป็นอย่างดี และใช้เวลาในการเตรียมอนุพันธ์เพียง 20 นาที จึงสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการหาปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างมันฝรั่งทอดเพื่อคุ้มครองและสร้างความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคในการรับประทานอาหารทอดได้

5. กิตติกรรมประกาศ

อนุวัฒน์ รัศมีสมศรี ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยประเภททุนบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2560 (สัญญาเลขที่ บพ. วช. 11/2560)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (CSIC) และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อการวิจัยขั้นสูง (TU-CSEAR) สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีขั้นสูง มหาวิทยาลัย

ลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

- [1] Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F. and de Meulenaer, B., 2012, Acrylamide formation in fried potato products: Present and future, a critical review on mitigation strategies, Food Chem. 133: 1138-1154.
- [2] Shipp, A. , Lawrence, G. , Gentry, R. , McDonald, T. , Bartow, H. , Bounds, J. , Macdonald, N., Clewell, H., Allen, B. and van Landingham, C. , 2006, Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects, Crit. Rev. Toxicol. 36: 481-608.
- [3] US FDA, The 2006 Exposure Assessment for Acrylamide, Available Source: <http://www.fda.gov>, September 15, 2017.
- [4] European Commission, Opinion on the results of the Risk Assessment of: ACRYLAMIDE (Human Health and the Environment), Available Source: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/opinions/sctee/sc_t_out88_en.htm, September 15, 2017.
- [5] Organization World Health Organization, 2004 , Guidelines for drinking- water quality, 3.
- [6] European Commission, 1998, European Council Drinking Water Directive, EU 98/83/EC
- [7] United States Environmental Protection Agency, 1995, National primary drinking

- water regulations: Acrylamide, EPA811-f-96-004a-T, 4601.
- [8] Thermo Scientific, Fast Determination of Acrylamide in Food Samples Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Ion Chromatography with UV or MS Detection, Application Note 409.
- [9] Inoue, K., Yoshimura, Y. and Nakazawa, H., 2003, Development of high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with size-exclusion chromatography for determination of acrylamide in fried foods, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 26: 1877-1884.
- [10] Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y. and Zhang, Y., 2006, Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector, *J. Chromatogr. A* 1116: 209-216.
- [11] Jörgen, R.P. and Jim, O.O., 2003, Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips, *Analyst* 128: 332-334.
- [12] Pittet, A., Périsset, A. and Oberson, J.M., 2004, Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1035: 123-130.
- [13] Yamini, Y., Ghambarian, M., Esrafil, A., Yazdanfar, N. and Moradi, M., 2012, Rapid determination of ultra-trace amounts of acrylamide contaminant in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-electron capture detector, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92: 1493-1505.
- [14] Fernandes, J.O. and Soares, C., 2007, Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips, *J. Chromatogr. A* 1175: 1-6.
- [15] Zhu, Y., Li, G., Duan, Y., Chen, S., Zhang, C. and Li, Y., 2008, Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector, *Food Chem.* 109: 899-908.
- [16] Zhang, Y., Zhang, G. and Ying, Z., 2005, Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods, *J. Chromatogr. A* 1075: 1-21.
- [17] Yamazaki, K., Isagawa, S., Kibune, N. and Urushiyama, T., 2012, A method for the determination of acrylamide in a broad variety of processed foods by GC-MS using xanthidrol derivatization, *Food Addit. Contam. A*, 29: 705-715.
- [18] EMD Millipore Corporation, 2013, Carrez clarification, 1.10537.0001.
- [19] Yang, E.Y. and Shin, H.S., 2013, Trace level determinations of carbamate pesticides in surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 9-xanthidrol, *J. Chromatogr. A* 1305: 328-332.

- [20] Chemguide, The effect of temperature on rates of reaction, Available Source: <https://www.chemguide.co.uk/physical/basicrates/temperature.html>, October 3, 2017.
- [21] Zhang, Y. and Lee, H.K., 2013, Low-density solvent-based vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the fast determination of phthalate esters in bottled water, J. Chromatogr. A 1274: 28-35.
- [22] The Association of Analytical Communities, 2002, AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods.