การสกัดปริมาตรน้อยด้วยการประยุกต์วิธีแคชเชอร์สำหรับวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร
A Small-Volume Extraction using the Modification of QuEChERS for the Determination of Acrylamide in Food Products

พีรยา กันตา[1], วรารัตน์ บุญตา[2] และ วรพรรณ พรมศิลา[3*]
Preeraya Kanta[1], Wararat Boonta[2] and Worapan Pormsila[3*]

[1,2,3]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ กรุงเทพมหานคร, 10120*
[1,2,3]Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Krungthep, Bangkok, 10120*

Received : 2023-07-03 Revised : 2023-07-23 Accepted : 2023-07-26

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการประยุกต์วิธีการสกัดแบบ QuEChERS เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารที่มีแปรรูปผ่านความร้อน ได้แก่ มันฝรั่งแผ่นทอด ขนมปังอบกรอบและกาแฟคั่วบด โดยใช้ตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 มิลลิตร ในการสกัดตัวอย่างจำนวน 2.00 กรัม ร่วมกับการเติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตจำนวน 0.20 กรัม และโซเดียมคลอไรด์จำนวน 0.05 กรัม จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที สารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างจะถูกแยกออกมาอยู่ในชั้นตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีอะซิโตไนไตรล์ร้อยละ 4.0 โดยปริมาตรทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากการทดสอบคุณลักษณะทางเคมีวิเคราะห์ พบว่า ความใช้ได้ของวิธีมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.998 ขีดจำกัดต่ำสุดของวิธีการวิเคราะห์ (LOD) เท่ากับ 1.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความแม่นยำที่แสดงในรูป ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่าความถูกต้องในรูปร้อยละการกลับคืนอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ค่าปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่พบในตัวอย่าง มีค่าน้อยกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามแม้ว่ายังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานสารอะคิลาไมด์ในอาหาร การตรวจหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่ทดสอบ สามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงสำหรับผู้บริโภค และผู้วิจัยในลำดับต่อไป อีกทั้งงานวิจัยนี้เป็นการเห็นถึงประสิทธิภาพการสกัดสารด้วยตัวทำละลายปริมาณน้อยโดยการประยุกต์การสกัดแบบแคชเชอร์แบบไม่ใช้ชุดสกัดแบบสำเร็จรูป

คำสำคัญ : แคชเชอร์, อะคริลาไมด์, การสกัด

Abstract

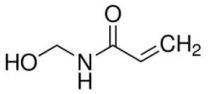
The work was to modify the QuEChERS extraction for the determination of acrylamide in the thermal process foods; French-fried, bread sticks, and roasted coffee. The optimal solvent used was a 2.50 ml acetonitrile for 2.00 g of sample weight, following the addition of 0.20 g magnesium sulfate and 0.05 g sodium chloride. Then, a 3 min centrifugation time was performed. Acrylamide was efficiently separated under optimal solvent, and it was determined by the HPLC method using 4% acetonitrile as a mobile phase. From the tests of analytical chemistry characteristics, the linearity in terms of correlation coefficient was present at 0.998 and the limit of detection (LOD) was 1.48 mg/L. The precision, displayed as %RSD, and the accuracy in terms of recovery percentage were acceptable. The amount of acrylamide in food samples was less than 2.0 mg/L. However, the standards of acrylamide in foods have not been recommended. The work has given the information to the customer for consumption foods. Moreover, these modified QuEChERS without using a test kit represented the small volume of reagent and solvent consumption.

*วรพรรณ พรมศิลา
E-mail address: worapan.p@mail.rmutk.ac.th

Keywords : QuEChERS, Acrylamide, Extraction

1.บทนำ

อะคริลาไมด์ (Acrylamide) เป็นสารเคมีทีมีสูตรโมเลกุลเป็น C_3H_5NO มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71.08 กรัมต่อโมล อะคริลาไมด์มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Pure and Applied Chemistry: IUPAC ว่า prop-2-eamide มีสูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 1 อะคริลาไมด์เป็นสารเคมีที่สามารถพบได้ในอาหารผ่านกระบวนการเตรียม การปรุง หรือการแปรรูปอาหาร โดยต้องใช้ความร้อนสูง (สูงกว่า 120 องศาเซลเซียส) ไม่ว่าจะเป็นการอบ ปิ้ง ย่าง อบ คั่ว หรือทอด อะคริลาไมด์พบได้ในอาหารที่มีแป้งสูง ตัวอย่างเช่น มันฝรั่ง ขนมปัง ธัญพืช รวมถึงกาแฟด้วย โดยความร้อนจากการแปรรูป จะกระตุ้นการเกิดอะคริลาไมด์ โดยจะความร้อนทำหน้าที่เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนแอสพาราจีน (กรดอะมิโนอิสระในอาหาร) กับน้ำตาลรีดิวซิ่ง (Reducing sugar) เช่น ฟรุกโตสและกลูโคส เกิดเป็นสารอะคลิลาไมด์ โดยปริมาณอะคริลาไมด์ที่เกิดขึ้นในอาหารนั้นมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย ได้แก่ ระดับความร้อนที่ใช้ ระยะเวลาที่ให้ความร้อน และปริมาณกรดอะมิโนแอสพาราจีนและน้ำตาลรีดิวซิ่งในอาหาร [1]



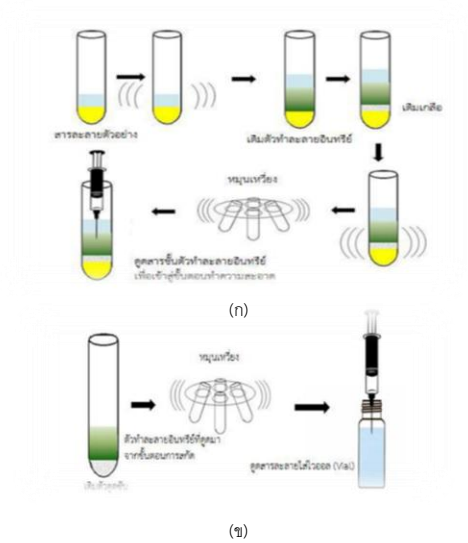
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะคริลาไมด์
ที่มา : https://www.sigmaaldrich.com

อะคริลาไมด์ เชื่อว่าเป็นสารก่อมะเร็ง โดยหน่วยงานวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศ (OARA) ได้จัดให้สารอะคริลาไมด์เป็นสารที่น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ กลุ่ม 2A (Probably carcinogenic to humans) [1-2]. สำหรับอาหารไทย มีการรายงานการตรวจพบสารอะคริลาไมด์ครั้งแรกในตัวอย่างแกงเขียวหวาน แกงกะหรี่ แกงแดง แกงมัสมั่น และฉู่ฉี่ปลาที่มีขายทั่วไป ทั้งในรูปของอาหารกระป๋อง อาหารแช่แข็ง และอาหารถุงปรุงสำเร็จ ซึ่งปริมาณที่ตรวจพบมีหลากหลายตั้งแต่น้อยกว่า 60 จนถึง 606 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของอาหาร [3] หรือแม้แต่เผือกทอดและกล้วยทอด ยังมีรายงานปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 34.65 และ 40.44 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ [4] ดังนั้น การบริโภคอาหารตามที่กล่าวมานี้ รวมถึงอาหารจารด่วน ขนมขบเคี้ยวจำพวกมันฝรั่ง ขนมปังอบกรอบ บิสกิต คุ๊กกี้ อาหารเช้าธัญพืช หรือกาแฟ ถือว่ามีโอกาสรับสารอะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกายได้ และถึงแม้สารอะคริลาไมด์จะสามารถขับออกทางปัสสาวะ แต่ยังถือว่าการบริโภคอาหารกลุ่มนี้ต่อเนื่อง ก็ยังมีความเสี่ยงที่ร่างกายจะรับสารนี้เข้าไปอะคริลาไมด์

การสกัดแบบแคชแชอร์ (QuEChERS extraction) นั้น QuEChERS เป็นคำเรียกย่อที่มาจากคำว่า “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe” แปลตามความหมายของคำ หมายถึง “เร็ว ง่าย ถูก มีประสิทธิภาพ มีความทนทานและปลอดภัย” แคชเชอร์เป็นเทคนิคการสกัดเพื่อเตรียมตัวอย่างที่มีสิ่งรบกวน (Matrices) โดยมีขั้นตอนการสกัด 2 ขั้น ได้แก่ 1) ขั้นตอนการสกัด (Extraction step) เป็นการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์มาอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ร่วมกับการเติมเกลือ ($MgSO_4$ และ NaCl) และการหมุนเหวี่ยง ซึ่งการเติมเกลือช่วยในการแยกเฟสของสารที่ต้องการออกมาอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และการหมุนเหวี่ยงทำให้ตัวทำละลายและตัวอย่างสัมผัสกันได้ดีขึ้น จากนั้นสารที่สกัดนำเข้าสู่ขั้นตอนการทำความสะอาดกำจัดสิ่งเจือปน และ 2) ขั้นตอนการทำความสะอาดหรือกำจัดสิ่งรบกวน (Clean up step) เพื่อกำจัดสิ่งรบกวน (Interference) ที่อาจมีเหลือหรือกำจัดไม่หมดออกจากสารตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่จะผ่านสารตัวอย่างลงบนตัวดูดซับของแข็งร่วมกับการหมุนเหวี่ยง เพื่อแยกสารรบกวนกับสารที่ต้องการ ตามรูปที่ 2 การสกัดด้วยแคชเชอร์เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ใช้ตัวทำละลายและตัวอย่างในปริมาณน้อย และได้รับการรับรองให้เป็นวิธีมาตรฐานของ AOAC นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการสกัดสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ที่มีความชื้นสูง มีไขมันต่ำ และมีสารรบกวนอื่น จนในปัจจุบันวิธีนี้ ได้ถูกปรับปรุงให้ใช้กับตัวอย่างที่มีความหลากหลายมากขึ้น [4] ใช้วิเคราะห์สารปริมาณน้อย ๆ ได้เป็นอย่างดี เช่น สารสเตียรอยด์ในยา [5-6], อะฟาทอกซินบี 1 อาหารสัตว์ [7]

สารอะคริลาไมด์ ถือเป็นภัยเงียบที่แฝงมากับการบริโภคอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านความร้อน การตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในการอาหารจะช่วยเป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภค รวมถึงการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์ที่หลากหลายขึ้น ได้แก่ เทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเมทริกซ์

โซลิด ดิสพอชั่นร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทรกราฟี [9] การเตรียมตัวอย่างด้วยการวิธีการสกัดแบบเฟสของแข็ง ร่วมกับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทรกราฟี [10] เทคนิคโวลแทเมทรีแบบแอโนดิกสตริปปิง [11] หรือ เทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี [12-13]



รูปที่ 2 การประยุกต์วิธีแคชเชอร์
(ก) ขั้นการสกัด (ข) ขั้นการกำจัดสิ่งเจือปน
ที่มา : พุทธมนต์ อัครฮาด และอรุณโรจน์ ผจญศึก [8]

2.วัตถุประสงค์และขอบเขตของงาน

2.1ขอบเขตของงาน

2.1.1ศึกษาตัวแปร (ชนิดตัวทำละลาย, ปริมาตรตัวทำละลาย, น้ำหนักและอัตราส่วนของเกลือ และเวลาในการสกัด) ที่มีผลต่อการสกัดสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่ มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ขนมปังกรอบ และกาแฟคั่วบด โดยประยุกต์วิธีการสกัดแบบแคชเชอร์โดยไม่ใช้ชุดสกัดแบบสำเร็จรูป

2.1.2ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีวิเคราะห์ของวิธีเพื่อแสดงความถูกต้องและแม่ยนยำ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรง (Linearity), ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ (Limit of Quantity, LOQ) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์วิธีแคชเชอร์แบบไม่ใช้ชุดสกัดแบบสำเร็จรูป สำหรับสกัดสารปริมาณน้อยในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีวิเคราะห์ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

3.วิธีดำเนินการวิจัย

3.1การเตรียมตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารที่มีจำหน่ายทั่วไปตามร้านสะดวกซื้อ ได้แก่ ขนมขบเคี้ยวมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ขนมปังอบกรอบ และตัวอย่างกาแฟคั่วบด นำมาบดและปั่นให้ละเอียด บรรจุตัวอย่างที่บดละเอียดลงในถุงซิปล๊อค เก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3.2วิธีสกัดอะคริลาไมด์ปริมาตรน้อย

ชั่งตัวอย่างอาหารบดละเอียดจำนวน 2.0 กรัม ละลายในตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ เขย่าด้วยมือให้เข้ากัน และหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ แรงเหวี่ยง 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ตัวทำละลายและตัวอย่างเข้ากัน จากนั้นเติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.20 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไร์จำนวน 0.05 กรัม (อัตราส่วนเกลือทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 4 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก) ลงในสารละลายตัวอย่าง เขย่าด้วยมือ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ แรงเหวี่ยง 2,000 รอบต่อนาที เพื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที การหมุนเหวี่ยงจะเป็นการเพิ่มการสัมผัสระหว่างตัวอย่างอาหารกับตัวทำละลายอินทรีย์และการเติมเกลือจะช่วยทำให้เกิดการแยกชั้นของสาร จากนั้นดูดชั้นสารละลายอินทรีย์ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์ จำนวน 0.005 กรัม นำไปหมุนเหวี่ยง แรงเหวี่ยง 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง อีกครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ดูดชั้นสารละลายกรองผ่านกระดาษกรอง (Membrane filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ ด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ต่อไป การเตรียมตัวอย่างนี้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตรน้อย และการเติมเกลือแบบวิธีแคชเชอร์ ร่วมกับการหมุนเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการสกัดและแยกเฟสที่ดีขึ้น ขั้นตอนวิธีการทดลองตัวอย่างอาหาร

3.3การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ด้วยเทคนิค HPLC แบบรีเวิร์สเฟส ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (ขนาด 4.6x150 นาโนเมตร) โดยเฟสเคลื่อนที่เป็น ใช้สารผสมระหว่างอะซิโตไนไตรล์และน้ำ

ในอัตราส่วน 4 ต่อ 96 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5 ด้วยกรดออโทฟอสฟอริก การวิเคราะห์ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวตรวจวัดชนิดยูวี ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.4การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีวิเคราะห์ของวิธี

การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีวิเคราะห์ของวิธีเป็นกระบวนการในเคมีวิเคราะห์ที่แสดงถึงผลของความถูกต้องและความแม่นยำที่เกิดจากการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยการทดสอบตัวอย่างที่มีการเติมสารมารตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จำนวน 10 ครั้ง เป็นการทดสอบการวัดสารละลายระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อหาค่าความแมนยำของการวิเคราะห์ ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และหาค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ (Limit of Quantity, LOQ) จากสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\mathrm{LOD} = \overline{X}_{blank} + 3\ SD_{blank} \qquad (1)$$

$$\mathrm{LOQ} = \overline{X}_{blank} + 10\ SD_{blank} \qquad (2)$$

สารละลายตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น นำมาเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น และปริมาตรที่แน่นอนระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์เพื่อหาค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ตามสมการ (3)

$$\%\ \mathrm{Recovery} = \frac{(\text{ตัวอย่าง} + \text{สารมาตรฐาน}) - (\text{ตัวอย่าง})}{\text{สารมาตรฐาน}} \times 100 \qquad (3)$$

4.ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการประยุกต์วิธีแคชเชอร์

ตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบ ได้แก่ มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ขนมปังกรอบ และกาแฟคั่วบด นำมาบดละเอียด ตามรูปที่ 3 ชั่งตัวอย่างตามจำนวนมาสกัดหาปริมาณสารอะคริลาไมด์วิธีประยุกต์การสกัดแบบแคชเชอร์ โดยอาศัยหลักการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตรไนไทรต์ ร่วมกับการเติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และการหมุนเหวี่ยงภายใต้เวลาที่เหมาะสม รวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพียงพอ เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของตัวอย่างในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และการแยกเฟสที่ชัดเจนระหว่างสาร ซึ่งการสกัดดังกล่าวเป็นการสกัดโดยประยุกต์หลักการสกัดแบบแคชเชอร์แบบไม่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป รวมถึงเป็นการสกัดนี้ใช้ตัวทำละลายในปริมาตรน้อย ซึ่งส่งผลดีต่อความปลอดภัยต่อผู้ทำการทดลองและต่อสิ่งแวดล้อม

รูปที่ 3 ตัวอย่างอาหารมันฝรั่งทอดชนิดแผ่น ขนมปังกรอบ และกาแฟคั่วบด ที่นำมาทดสอบ

4.1.1ผลของชนิดตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา คือ เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ พบว่า ตัวทำละลายทั้งสองสามารถแยกเฟสของสารออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นตัวอย่าง ชั้นเกลือ และชั้นตัวทำละลายได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบสารที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้งสอง โดยการพิจารณาจากพื้นที่ใต้พีกพบว่า ปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่สกัดออกมาได้ มีปริมาณพื้นที่ใต้พีกที่ไม่แตกต่างกันมาก แต่สิ่งที่แตกต่างอย่างชัดเจนคือ ในขั้นการสกัดสารละลายที่สกัดด้วยอะซิโตไนไตล์มีลักษณะใสกว่าสารละลายที่สกัดด้วยเมทานอล ตามรูปที่ 4ก. อีกทั้งเป็นตัวทำละลายอะซิโตไนไตล์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเดียวกับเฟสเคลื่อนที่ ๆ ใช้ ซึ่งจะมีความเข้ากันได้ (Compatibility) ของตัวทำละลายสกัดกับเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นเลือกอะซิโตไนไตรล์ เป็นตัวทำละลายในการทดลองต่อไป

4.1.2ผลของปริมาตรตัวทำละลาย

เทคนิคการสกัดแคชเชอร์ ถือว่าเป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดน้อย ลดการสิ้นเปลือง และลดความเป็น

พิษของสารอินทรีย์ที่มีต่อผู้ทำการทดลองและต่อสิ่งแวดล้อม และจากการศึกษาชนิดตัวทำละลายในการสกัด เลือกอะซิโตไนไตรล์ในการสกัดสารอะคริลาไมด์ เมื่อนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบเวลาที่ถูกหน่วง (Retention time, t_R) อยู่ที่ประมาณ 3.5 นาที และเมื่อศึกษาผลของปริมาตรของอะซิโตไนไตรล์ที่แตกต่างกัน (2.50, 3.50 และ 4.50 มิลลิลิตร) พบว่า พื้นที่ใต้พีกในแต่ละปริมาตรมีค่าใกล้เคียงกัน ผลการทดลองตามตารางที่ 1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาตรไม่มีผลต่อพื้นที่พีกอย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับพื้นที่ใต้พีก และเมื่อพิจารณาในเรื่องการดูดสารละลายในชั้นตัวทำละลาย ในเรื่องความยากง่าย และความเพียงพอของปริมาตร พบว่า ปริมาตรสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยอะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร มีปริมาตรน้อย แต่เพียงพอต่อการดูดเก็บชั้นตัวทำละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ดังนั้น ในการศึกษาไม่มีความจำเป็นต้องใช้ปริมาตรตัวทำละลายมากกว่า 2.50 มิลลิลิตร ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ ที่มุ่งเน้น ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ปริมาตรอะซิโตไนไตรล์ที่ 2.50 มิลลิลิตร ในการสกัดในลำดับต่อไป

ตารางที่ 1 ผลของปริมาตรตัวทำละลาย

ปริมาตรอะซิโตไนไตรล์ (มิลลิลิตร)	เวลาที่คงอยู่ (t_R) (นาที)	พื้นที่ใต้พีกx10^6 (μV*sec)
2.50	3.558	6.996
3.50	3.520	6.225
4.50	3.570	6.891

*4.1.3ผลของน้ำหนักเกลือ*แมกนีเซียมซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์

การสกัดแบบแคชเชอร์ เป็นการสกัดอาศัยหลักการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ร่วมกับการเติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จำนวนเล็กน้อย เกลือจะช่วยให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการกระจายตัวในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น เกิดการแยกเฟสดีขึ้น และการสกัดร่วมกับการหมุนเหวี่ยงจะเป็นการทำให้ตัวทำละลายสัมผัสกับตัวอย่างมากขึ้นด้วย ในงานวิจัยนี้กำหนดอัตราส่วนน้ำหนักเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เท่ากับ 4 ต่อ 1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดอะคริลาไมด์ โดยอ้างอิงจาก [8] การทดลองใช้น้ำหนัก $MgSO_4$: NaCl ดังนี้ 0.40 : 0.10, 0.30 : 0.075 และ 0.20 : 0.05 และจากการศึกษา พบว่า การเติมเกลือในปริมาณที่ต่างกันมีผลต่อการสกัดอะคริลาไมด์ (ผลการทดลองตามตารางที่ 2) โดยพิจารณาจากพื้นที่พีกที่ มีค่าแตกต่างกัน โดยน้ำหนักเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.20 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไร์ จำนวน 0.05 กรัม ให้พื้นที่พีกมากที่สุด นอกจากนี้สิ่งที่สังเกตุได้ชัดเจน คือ ก่อนเติมเกลือสารละลายใส สีเหลือง แต่เมื่อเติมเกลือร่วมกับการหมุนเหวี่ยง สารละลายที่ได้มีลักษณะใส ไม่มีสี แสดงว่าการเติมเกลือนอกจากจะช่วยแยกเฟสของสาร ยังช่วยกำจัดสีของตัวอย่างได้ (ในกรณีที่ตัวอย่างมีสี เช่น กาแฟคั่วบด)

ตารางที่ 2 ผลของน้ำหนักเกลือ $MgSO_4$ และ NaCl

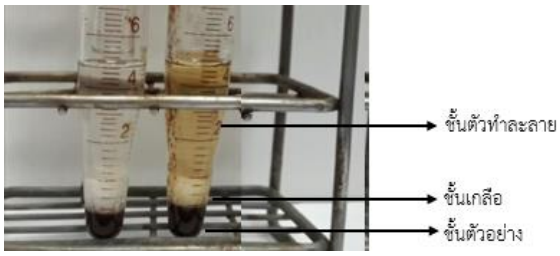
$MgSO_4$: NaCl		เวลา (t_R) (นาที)	พื้นที่ใต้พีก x10^6 (μV*sec)
$MgSO_4$ (กรัม)	NaCl (กรัม)		
0.40	0.10	3.526	1.114
0.30	0.075	3.522	5.839
0.20	0.05	3.546	8.607

4.1.4ผลเวลาในการสกัด

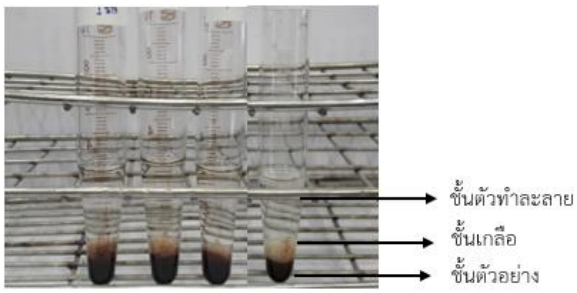
เวลาในการหมุนเหวี่ยงเพื่อสกัด คือ 1, 3, 5 และ 10 นาที พบว่า พื้นที่ใต้พีกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลา (ผลการทดลองตามตารางที่ 3) เมื่อเวลาการสกัดมากขึ้น มีแนวโน้มในการสักดอะคริลาไมด์ออกมาได้มาตามเวลา อย่างไรก็ตามการสกัดแบบแคชเชอร์เป็นการสกัดที่ผู้วิจัยเน้นเวลาที่ต้องรวดเร็ว (Quick) แต่มีประสิทธิภาพเพียงพอ เพราะการสกัดมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์และร่วมกับการเติมเกลือ จึงไม่ต้องการใช้เวลาในหมุนเหวี่ยงนานจนเกินไป ในการศึกษาพิจารณาจากพื้นที่พีกแล้ว เลือกใช้เวลาในการสกัดที่ 3 นาที ไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 ผลของเวลาในการสกัดหมุนเหวี่ยง

เวลาในการสกัด (นาที)	เวลาที่คงอยู่ (t_R) (นาที)	พื้นที่ใต้พีก x10^6 (μV*sec)
1	3.658	3.017
3	3.670	5.385
5	3.671	5.760
10	3.665	9.450



รูปที่ 4ก. ลักษณะของสารละลายที่ได้ในตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอล (ขวามือ) และอะซิโตไนไตรล์ (ซ้ายมือ)

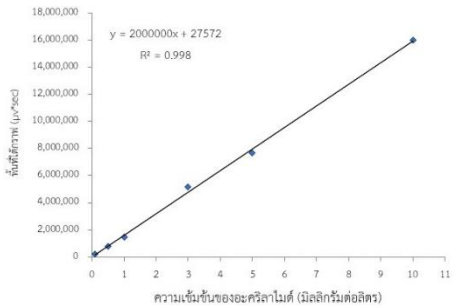


รูปที่ 4ข. การแยกชั้นของสารสกัดที่เกิดจากการประยุกต์การสกัดแบบแคชเชอร์

ภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม (ตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร เติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.20 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไร์จำนวน 0.05 กรัม หมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 3 นาที) พบว่า การสกัดภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถแยกชั้นตัวทำละลาย ชั้นเกลือ ชั้นตัวอย่างได้ชัดเจน ตามรูปที่ 4ข สารละลายอินทรีย์ที่ได้มีลักษณะใสและสามารถดูดสารละลายอินทรีย์ออกมาวิเคราะห์ได้ง่าย และเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลองพบพีกสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ ที่เวลาการหน่วง (Retention time, t_R) ประมาณ 3.5-3.7 นาที

4.2การทดสอบคุณลักษณะทางเคมีวิเคราะห์ของวิธี

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ด้วยการศึกษาความสัมพันธ์ เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับสัญญาณที่ได้จากการวัด (พื้นที่ใต้พีก) กับความเข้มข้น พบความเป็นเส้นตรง (Linear range) ในช่วงความเข้มข้น 0.10 ถึง 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นไปตามสมการ y= 2000000x + 27572 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, R_2) เท่ากับ 0.998 ตามรูปที่ 7

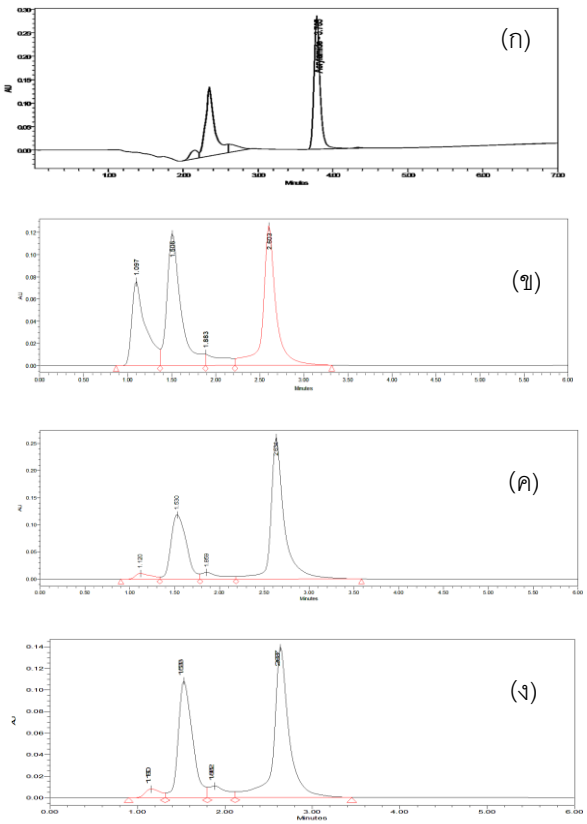


รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานอะคริลาไมด์ในช่วงความเข้มข้น 0.10 – 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ (Precision) ที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน (Repeatability หรือ Within day precision) จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้น 7.04 มิลลิกรัมต่อลิตรซ้ำ 7 ครั้ง ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage of Relative Standard Deviation, % RSD) จากผลการทดลอง ได้ค่า % RSD ของพื้นที่ใต้กราฟมีค่าเท่ากับร้อยละ 12.50 และได้ค่า % RSD ของเวลาหน่วงสารมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.2 และวิเคราะห์ Reproducibility (การวิเคราะห์ผลระหว่างวัน เป็นเวลา 3 วัน) ได้ค่า % RSD ของพื้นที่ใต้พีกมีค่าเท่ากับร้อยละ 14.12 และได้ค่า % RSD ของเวลาหน่วงสารมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.8 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ สำหรับการคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด (Limit of detection, LOD) จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นอะคริลาไมด์เท่ากับ 1.41 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ (Limit of Quantity, LOQ) เท่ากับ 1.66 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง ได้แก่ มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ขนมปังกรอบ และกาแฟคั่วบด พบปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง น้อยกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน ผลการทดลอง ตามตารางที่ 4 และโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ และของตัวอย่างแสดงตามรูปที่ 8



รูปที่ 6 โครมาโทแกรม (ก) สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และของตัวอย่าง (ข) มันฝรั่ง (ค) ขนมปังกรอบ (ง) กาแฟคั่วบด

ค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ของการวิเคราะห์จะเป็นการแสดงถึงความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป ได้ผลการคำนวณตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การกลับคืนของอะคริลาไมด์ (ร้อยละ) ในตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการสกัดปริมาตรน้อยตามหลักการแคชเชอร์

ตัวอย่าง	ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง (มก.ต่อ ล.)	ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง (มก.ต่อ ล.)	ร้อยละการกลับคืน
มันฝรั่งทอดชนิดแผ่น	0.60	9.80	93.90
ขนมปังอบกรอบ	1.15	28.30	95.94
กาแฟคั่วบด	0.76	53.60	98.58

5.สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการสกัดด้วยวิธีประยุกต์หลักการของการสกัดแบบแคชเชอร์ โดยการสกัดไม่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป เพื่อใช้ในการทดสอบปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร ซึ่งการสกัดใช้หลักการสกัดสารภายใต้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ร่วมกับการเติมเกลือ และการหมุนเหวี่ยงจะช่วยเพิ่มการกระจายตัวของตัวอย่างในชั้นตัวทำละลาย ทำให้ตัวอย่างและตัวทำละลายเกิดการแยกได้ดีขึ้น การทดลองนี้เลือกใช้ตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร เติมเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.20 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไร์จำนวน 0.05 กรัม หมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 3 นาที ภายใต้สภาวะการสกัดสามารถแยกเฟสของสารได้ เป็นการสกัดที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและตัวทำละลายในปริมาณน้อย ใช้อุปกรณ์และสารเคมีพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค HPLC และตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่า ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วงกว้าง มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยให้ค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) เฉลี่ย 96.14 อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ค่าความแม่นยำ ซึ่งแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของพื้นที่ใต้พีกมีค่าเท่ากับร้อยละ 14.12 และค่า % RSD ของเวลาหน่วงสารมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.8 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ นอกจากนี้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด เท่ากับ 1.41 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ เท่ากับ 1.66 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นจึงเป็นวิธีที่สามารถสกัดสารปริมาณน้อยได้ ด้วยการใช้ปริมาณตัวทำละลายและตัวอย่างน้อยได้อย่างดี

6.ข้อเสนอแนะ

6.1สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคในการสกัดแบบแคชเชอร์ในการสกัดเพื่อหาสารปริมาณน้อยชนิดอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลผู้บริโภค

6.2แนะนำศึกษาน้ำหนักตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อให้ได้น้ำหนักที่เหมาะสมกับปริมาตรตัวทำละลาย

7.กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ในการสนับสนุนในสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือจนงานนี้ให้สำเร็จลุล่วง

8.เอกสารอ้างอิง

[1] สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, อะคริลาไมด์. [Online]. http://fic.nfi.or.th/foodsafety/upload/damage/pdf/acrylamide_2.pdf. (เข้าถึงเมื่อ : 26 เมษายน 2566).

[2] อาทิตยา จิตจำนง, “สารก่อมะเร็งในงานอุตสาหกรรม”, *EAU HERITAGE JOURNAL (Science and Technology)*, ปีที่ 10 ฉบับที่ 2, หน้า 6-16, 2559.

[3] จิตติมา เจริญพานิช, “สารอะคริลาไมด์ที่แฝงมากับอาหารไทย”, *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, ปีที่ 40 ฉบับที่ 4, หน้า 1059-1072, 2555.

[4] ธรณิศวร์ ไชยมงคล และ ชีรวุฒิ วิทยา นันท์, “การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารที่ยากต่อการวิเคราะห์”, *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, ปีที่ 23 ฉบับที่ 3, หน้า 1426-1437, 2561.

[5] นันทนา กลิ่นสุนทร, ตวงพร เข็มทอง และปริชญา มาประดิษฐ์. “การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคแคชเชอร์สำหรับการหาปริมาณสเตียรอยด์ที่ปลอมปนในยาลูกกลอนสมุนไพร”, *วารสารอาหารและยา ฉบับเดือนมกราคม-เมษายน*, ปีที่ 21 ฉบับที่ 1, หน้า 59-66, 2557.

[6] Pormsila W, Jityongchai D, Tesphon W, “A modified QuEChERS extraction for the determination of dexamethasone”, *European Scientific Journal*, 10(33): 138-144, 2014.

[7] ศศิประภา ชูช่วย, ประกรณ์ จาละ, ธนภูมิ มณีบุญ, ปารียา อุดมกุศลศรี และ ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล. “การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง”, *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*. ปีที่ 36 ฉบับที่ 2, หน้า 254-259, 2560.

[8] พุทธมนต์ อัครฮาด และ อรุณโรจน์ ผจญศึก, การศึกษาการสกัดแบบแคชเชอร์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป, วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ, 2558.

[9] จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข และ สมภพ ลาภวิบูลย์สุข, “การทดสอบหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทอดด้วยเทคนิคเมทริกซ์ โซลิด ดิสเพอชั่นและอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี”, *วารสารผลงานวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ*, ปีที่ 11 ฉบับที่ 11, หน้า 21-34, 2565.

[10] Zeng S, Xu T, Wang M, Yang C., “Determination in roasted coffee by UPLC-MS/MS”, In: Proceeding of the 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering, 27-28 June 2015, page 376-379. Guangzhou, China, 2015.

[11] Vesela H, Šucman E., “Determination of Acrylamide in Food Using Adsorption Stripping Voltammetry”. *Czech J. Food Sci*. 4: 401-406. 2013.

[12] Nemoto S, Takatsuki S, Sasaki K, Maitani T. “Determination of Acrylamide in Foods by GC/MS Using 13C-labaled Acrylamide as an Internal Standard”. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 43(6): 371-376, 2002.

[13] Pittet A, Perisset A, Oberson KM., “Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, 1035(1): 123-130, 2004.