การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค GC-MS ร่วมกับ เทคนิค IDMS ในการแยกสารผสมเบนโซฟีโนน และอนุพันธ์ในกระดาษบรรจุภัณฑ์อาหาร

Optimization study of GC-MS and IDMS technique for separation of benzophenone and its derivatives from food packaging paper

12

หนึ่งฤทัย แสแสงสีรุ้ง[1*]
Neungrutai Saesaengseerung[1*]

บทคัดย่อ

รายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค GC-MS ร่วมกับ Isotope Dilution Mass spectrometry (IDMS) เพื่อแยกสารผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ ได้แก่ 4-เมทิลเบนโซฟีโนน, 4-ไฮดรอกซีเบนโซฟีโนน, 2-ไฮดรอกซีเบนโซฟีโนน, 4,4'-บิส (ไดเมทิลอะมิโน) เบนโซฟีโนน และ 4,4'-บิส (ไดเอทิลอะมิโน) เบนโซฟีโนน สารก่อมะเร็งทั้ง 6 ตัวนี้มักใช้เป็นสารเริ่มปฏิกิริยาด้วยแสงชนิดหนึ่งที่เป็นส่วนประกอบของหมึกที่พิมพ์บนบรรจุภัณฑ์กระดาษ ในการศึกษานี้ได้ใช้เบนโซฟีโนน-D10 เป็นสารมาตรฐานภายใน และ ใช้แคปปิลาลีคลอลัมน์ ชนิด 50% ไดฟีนิล/50% ไดเมทิล พอลีไซลอกเซน เป็น GC-MS คอลัมน์ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมนี้ได้โดยการเปลี่ยน อุณหภูมิเริ่มต้น อุณหภูมิสุดท้าย และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ เมื่อใช้โหมด GC-MS full scan ผลการศึกษาพบว่ามี 3 วิธีที่สามารถแยกสารอันตรายทั้ง 6 สาร ได้ภายในเวลา 24, 29 และ 41 min ตามลำดับ ได้เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับตู้อบคอลัมน์โดยเลือกจากวิธีที่ใช้เวลาในการทดสอบสั้นที่สุด คือ 24 min และเปลี่ยนโหมดในการทดสอบจากโหมด GC-MS full scan ไปเป็นโหมด selective ion monitoring (SIM) เพื่อให้เห็นความแตกต่างของพีกที่ใช้การคำนวณหาปริมาณของเบนโซฟีโนน (m/z = 105) และ ของเบนโซฟีโนน-D10 (m/z = 110) สุดท้ายสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค GC-MS ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เพื่อทดสอบหาปริมาณสารเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์อีก 5 ชนิด ในตัวอย่างกระดาษบรรจุภัณฑ์อาหารโดยเปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.990$)

Abstract

This report is a study of optimized condition for GC-MS and Isotope Dilution Mass spectrometry (IDMS) techniques to separate mixture of benzophenone and its derivatives; involving 4-methylbenzophenone, 4-hydroxybenzophenone, 2-hydroxybenzophenone, 4,4'-bis (dimethylamino) benzophenone and 4,4'-bis (diethylamino) benzophenone. These 6 carcinogenic compounds are photo-initiators; used in UV cure ink for food packaging paper. In this study, benzophenone-D10 was used as an internal standard and 50% diphenyl/50% dimethyl polysiloxane capillary column was selected as a GC-MS column. This study was performed through varying of GC oven temperature; including initial, final and increasing temperature rate under the GC-MS full scan mode. The results show 3 studied methods could obtain all 6 dangerous compounds separately in 24, 29 and 41 min, respectively. The optimized GC oven temperature was selected from the method using the shortest runtime (24 min) and the GC-MS full scan mode has been changed to a selective ion monitoring (SIM) mode instead to achieve the differences between quantified peak of benzophenone (m/z = 105) and of benzophenone-D10 (m/z = 110). Finally, the optimized condition of the GC-MS technique from this study can be used to analyze benzophenone and its 5 derivatives in food packaging paper sample by comparison to standard calibration curve that the correlation coefficient was in the limit of acceptance ($r^2 \geq 0.990$)

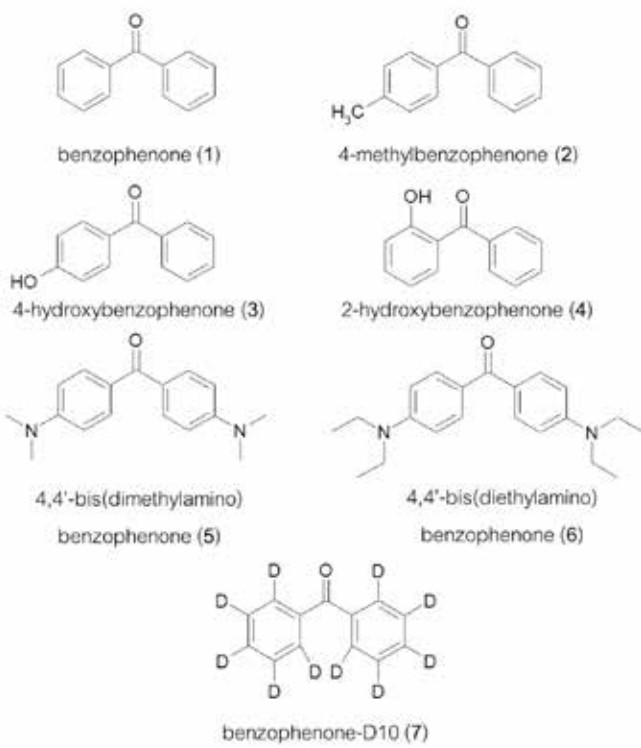
คำสำคัญ: เบนโซฟีโนน แก๊สโครมาโทกราฟี ไอโซโทปไดลูชันแมสสเปกโทเมตรี
Keywords: Benzophenone, Gas chromatography, Isotope dilution mass spectrometry

[1]กรมวิทยาศาสตร์บริการ
*Corresponding author. E-mail address: sneungrutai@dss.go.th h

1. บทนำ (Introduction)

สารเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์เป็นสารที่มักใช้เป็นสารเริ่มปฏิกิริยาด้วยแสง (Photo-initiator) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization process) เพื่อทำให้หมึกพิมพ์เกิดการแข็งตัวเป็นฟิล์มเคลือบบนวัสดุที่พิมพ์ เช่น กระดาษหรือกระดาษแข็ง สารเหล่านี้หากเกิดเป็นพอลิเมอร์ไม่หมด จะตกค้างอยู่บนกระดาษในรูปของโมเลกุลเดี่ยวซึ่งเป็นโครงสร้างที่อันตราย และถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็ง [1] อีกทั้งยังมีโอกาสแพร่สู่อาหารได้หากใช้สัมผัสอาหาร

ปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดหรือกฎระเบียบทั้งของประเทศไทยและต่างประเทศในการควบคุมปริมาณสารอันตรายเหล่านี้ตกค้างในวัสดุสัมผัสอาหารประเภทกระดาษ แต่ในปี ค.ศ. 2012 ได้มีคำแนะนำ (Guideline) จากกลุ่มผู้เกี่ยวข้องและผู้เชี่ยวชาญด้านบรรจุภัณฑ์อาหารประเภทกระดาษและกระดาษแข็งในประเทศกลุ่มสหภาพยุโรป [2] เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมปริมาณสารอันตรายกลุ่มเบนโซฟีโนน (1-6) (รูปที่ 1) และมีแนวโน้มว่าในอนาคตข้อกำหนดตามคำแนะนำฉบับนี้อาจถูกพัฒนาไปเป็นกฎระเบียบของสหภาพยุโรปได้ การเตรียมความพร้อมรับมือกับกฎระเบียบระหว่างประเทศที่อาจเกิดขึ้นในอนาคตด้วยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทดสอบสารเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ในวัสดุสัมผัสอาหารประเภทกระดาษให้มีความรวดเร็วจึงเป็นสิ่งจำเป็น อีกทั้งจากคำแนะนำ (Guideline) ดังกล่าวได้อ้างถึงวิธีทดสอบสารกลุ่มนี้ไว้สองวิธี วิธีแรกอ้างถึงงานวิจัยของ Castle L. และคณะ [3] ที่ศึกษาการแยกสาร 4,4'-bis (dimethylamino) benzophenone, DMAB (5) และสาร 4,4'-bis (diethylamino) benzophenone, DEAB (6) จากกระดาษสัมผัสอาหารโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และใช้สาร 2-amino-4methylbenzophenone เป็นสารมาตรฐานภายใน ก่อนนำไปทดสอบด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ส่วนวิธีที่สองเป็นวิธีของ S.M. Johns และคณะ [4] ที่สกัดตัวอย่างกระดาษสัมผัสอาหารด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเป็นเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาการเคลื่อนย้ายสารเบนโซฟีโนนจากตัวอย่างกระดาษสู่อาหารที่อุ่นด้วยไมโครเวฟ แล้วทดสอบหาปริมาณเบนโซฟีโนนด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทเมตรี (Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS) ร่วมกับ เทคนิค Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) ซึ่งอาศัยหลักการเติมโมเลกุลสารที่เหมือนกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ แต่สารนั้นจะมีอะตอมบางตัวถูกแทนด้วยไอโซโทป (Isotopically labelled analogue) และสารที่เติมนี้จะทำหน้าที่เป็นสารมาตรฐานภายในเพื่อใช้คำนวณหาปริมาณสารที่ต้องการศึกษาเมื่อใช้ร่วมกับเทคนิคแมสสเปกโทเมตรี [5] ซึ่งงานวิจัยของ Johns S.M. และคณะ [4] ได้เลือกใช้สาร benzophenone-D5 ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบนโซฟีโนนที่ต้องการวัด แต่แตกต่างกันเพียงที่โครงสร้างของ benzophenone-D5 นั้นจะมีอะตอมของดิเทอเรียม (D) จำนวน 5 อะตอม อยู่แทนที่อะตอมของไฮโดรเจน ซึ่งส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของเบนโซฟีโนน-D5 (m/z = 187) จะหนักกว่าน้ำหนักโมเลกุลสารเบนโซฟีโนน (1) (m/z = 182) และความต่างของน้ำหนักโมเลกุลจะวัดได้โดยแมสสเปกโทรมิเตอร์ อย่างไรก็ตามแม้การใช้เบนโซฟีโนน-D5 เป็นสารมาตรฐานภายในจะเพิ่มคุณภาพในงานทดสอบ แต่การที่ต้องสังเคราะห์สารนี้ขึ้นมาเองก็ทำให้เกิดความยุ่งยากและเสียเวลา ในส่วนอนุพันธ์ของเบนโซฟีโนนอีก 3 ตัว คือ 4-methylbenzophenone (2), 4-hydroxybenzophenone (3) และ 2-hydroxybenzophenone (4) แม้ในคำแนะนำ (Guideline) จะกล่าวถึงสารดังกล่าวแต่ไม่ได้อ้างอิงถึงวิธีทดสอบใดๆ



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเบนโซฟีโนน (1) อนุพันธ์ของเบนโซฟีโนน (2-6) และสารมาตรฐานภายในที่ใช้ (7)

ในเวลาต่อมาได้เริ่มมีงานวิจัยที่ใช้สาร benzophenone-D10 (7, รูปที่ 1) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล m/z = 192 ทำหน้าที่เป็นสารมาตรฐานภายในซึ่งสารนี้สามารถหาซื้อได้ไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์เองทำให้สะดวกที่จะนำมาใช้งาน ตัวอย่างของงานวิจัยที่ใช้เทคนิค IDMS ด้วยสาร (7) ได้แก่ การหาปริมาณของเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2) ในซีเรียลอาหารเช้าโดยการสกัดด้วยเทคนิคอัลตร้าโซนิค และวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโทกราฟี แทนเดมแมสสเปกโทเมตรี (GC-MSn) ซึ่งสามารถให้ค่าคืนกลับ (%recovery) ได้ในช่วง 74-98% [6] และเวลาที่เบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2) ออกมา คือ 9.4 และ 10.2 นาทีตามลำดับ หรืองานวิจัยของ Van Den Houwe k. และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 [7] ได้ประเมินการแพร่กระจายของสารเร่งปฏิกิริยาแสงจากกระดาษแข็ง สู่อาหารเทียมชนิดแห้ง (Tenax®) ด้วยเครื่องมือ

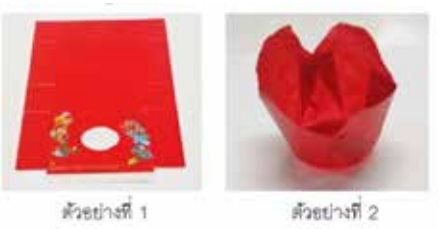
Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) ด้วยร้อยละของค่าคืนกลับของเบนโซฟีโนน และอนุพันธ์ ในช่วง ร้อยละ 43-92 แม้งานวิจัยชิ้นนี้จะศึกษาสารเร่งปฏิกิริยาแสงจำนวน 15 ตัว แต่มีสารเพียงสามตัว คือ สาร (1), (2) และ (5) เท่านั้นที่ถูกระบุอยู่ในที่คำแนะนำ (Guideline) [2] งานวิจัยต่อมาในปี พ.ศ. 2559 ผู้วิจัย [8] ได้ตีพิมพ์บทความที่เกี่ยวกับการศึกษาการสกัดสารเบนโซฟีโนน (1) จากกระดาษกล่องใส่ขนมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ก่อนนำไปทดสอบด้วยเทคนิค GC-MS โดยเลือกใช้ benzophenone-D10 เป็นสารมาตรฐานภายใน ผลการศึกษาครั้งนั้น พบว่า การสกัดด้วยเทคนิคอัลตร้าโซนิคโดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย นั้น เป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดตัวอย่างที่มีปริมาณเบนโซฟีโนนปนเปื้อนสูง เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้จะใช้เทคนิค GC-MS เช่นเดียวกันกับที่จะใช้ในงานวิจัยในฉบับนี้ แต่การศึกษา [8] ยังไม่ได้ครอบคลุมถึงการทดสอบแยกสารผสมเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2-6)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่ายังไม่มีงานใดที่ศึกษาการแยกสารผสมเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2-6)ด้วยวิธีทดสอบเพียงวิธีเดียว และเพื่อเป็นการเตรียมพร้อมรับข้อกำหนดหรือกฎระเบียบทั้งในประเทศ และระหว่างประเทศในการควบคุมสารอันตรายเหล่านี้กระดาษสัมผัสอาหาร หรือกระดาษบรรจุภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค GC-MS ร่วมกับเทคนิค IDMS เพื่อแยกสารผสมเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2-6) ให้ได้รวดเร็วและถูกต้อง โดยมีแนวคิดที่จะเลือกใช้สาร benzophenone-D10 เป็นสารมาตรฐานภายใน เช่นเดียวกับงานวิจัยผ่านมา [6-8]

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 ตัวอย่างกระดาษ

กระดาษสัมผัสอาหารจำนวน 4 ตัวอย่าง ซื้อจากร้านจำหน่ายอุปกรณ์เบเกอรี่ในย่านสำเพ็ง เขตสัมพันธ์วงศ์ กรุงเทพมหานคร ได้แก่ กล่องใส่ขนม จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1) และกระทงสำหรับอบขนมจำนวน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4) ตัวอย่างทั้งหมดแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ลักษณะของตัวอย่างกระดาษที่ใช้ในการศึกษา

2.2 สารเคมี

- benzophenone (reagent plus, 99.9%), 4-methylbenzophenone (reagent plus, 99.9%), 4-hydroxybenzophenone (reagent plus, 99.9%), 2-hydroxybenzophenone (reagent plus, 98.6%), 4,4'-bis(dimethylamino)benzophenone (reagent plus, 99.5%) และ 4,4'-bis(diethylamino)benzophenone (reagent plus, 99.7%) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich

- benzophenone D-10 สำหรับใช้เป็น Internal standard ยี่ห้อ AccuStandard (Standard, 99.5%)

- ตัวทำละลาย cyclohexane และ dichloromethane ยี่ห้อ Fisher (AR, 99.9%)

2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเดี่ยว

2.3.1.1 สารละลายมาตรฐานเบนโซฟีโนน (1) ความเข้มข้นตัวละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชั่งสารเบนโซฟีโนน (1) น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะแก้วขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร สูง 0.5 เซนติเมตร นำภาชนะแก้วที่มีสารใส่ลงในขวดแก้วสีชามีฝาเกลียวปิดขนาด 40 มิลลิลิตร ที่บรรจุตัวทำละลายผสม cyclohexane : dichloromethane (1:1) น้ำหนัก 19.98 กรัม จะได้สารละลายเบนโซฟีโนนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เจือจางสารละลาย 10 เท่า โดยชั่งสารละลายเบนโซฟีโนนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่เตรียมได้น้ำหนัก 0.5 กรัม แล้วเจือจางด้วยตัวทำละลายผสม cyclohexane : dichloromethane (1:1) น้ำหนัก 4.5 กรัม ในขวดแก้วสีชามีฝาเกลียวปิด จะได้สารละลายเบนโซฟีโนนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3.1.2 สารละลายมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของเบนโซฟีโนน (2-6) สารละลายมาตรฐานภายใน (7) ความเข้มข้นตัวละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ทำซ้ำข้อ 2.3.1.1 แต่เปลี่ยนจากสาร (1) เป็น (2-6) และสารมาตรฐานภายใน (7) จะได้สารละลายมาตรฐานเดี่ยวของสาร (2)-(7) ความเข้มข้นตัวละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม

2.3.2.1 สารละลายมาตรฐานผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ (1-6) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ (1-6) แต่ละตัว ตัวละ 10 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะแก้วขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร สูง 0.5 เซนติเมตร นำภาชนะแก้วที่มีสารใส่ลงในขวดแก้วมีฝาเกลียวปิดขนาด 40 มิลลิลิตร ที่บรรจุตัวทำละลายผสม cyclohexane:dichloromethane (1:1) น้ำหนัก 20 กรัม เขย่าขวดเบาๆ จนกว่าสารจะลายลายหมด จะได้สารละลายผสม (1-6) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเจือจางสารละลายที่เตรียมได้ 5 เท่า โดยชั่งสารละลายผสม (1-6) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนัก 5 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วสีชามีฝาเกลียวปิดซึ่งบรรจุทำละลายผสม cyclohexane: dichloromethane (1:1) น้ำหนัก 20 กรัม เขย่าขวดเบาๆ จนสารละลายผสมกันดี จะได้สารละลายมาตรฐานผสม (1-6) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชั่งสารละลายที่เตรียมได้น้ำหนัก 1.25 และ 5 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเดิม จะได้สารละลายมาตรฐานผสม (1-6) ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.3.2.2 สารละลายมาตรฐานผสมเบนโซฟีโนน (1) อนุพันธ์ (2-6) และ สารละลายมาตรฐานภายใน (7) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ทำเหมือนข้อ 2.3.2.1 แต่เพิ่มสารมาตรฐานภายใน (7) น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายผสม (1-7) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วเจือจางสารละลายที่เตรียมได้ 50 เท่า โดยชั่งสารละลายผสม (1-7) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วสีชามีฝาเกลียวปิดซึ่งบรรจุทำละลายผสม cyclohexane: dichloromethane (1:1) น้ำหนัก 49 กรัม เขย่าขวดเบาๆ จนสารละลายผสมกันดี จะได้จะสารละลายผสม (1-7) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

2.3.3.1 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ GC-MS

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสม (1-6) ความเข้มข้น 25 มิลิกรัมต่อลิตร มา 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 ไมโครลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานภายใน (7) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละขวดแล้วจึงปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสม cyclohexane: dichloromethane (1:1) สารละลายมาตรฐานผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ (1-6) ที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.3.3.2 กราฟมาตรฐานที่ใช้สำหรับทดสอบตัวอย่างกระดาษ ตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4

ปิเปตสารละลายมาตรฐานของสารผสม (1-6) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25, 50, 250, 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปริมาตรละ 1 ขวด แล้วเติมเบนโซฟีโนน-D10 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในทุกขวด ปรับปริมาตรด้วย cyclohexane: dichloromethane (1:1) จะได้สารละลายมาตรฐานของสารผสม (1-6) ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.4 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

2.4.1 การสกัดตัวอย่างกระดาษตัวอย่างที่ 1

ชั่งตัวอย่างกระดาษที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดไม่เกิน 1×1 ซม. น้ำหนัก 0.1 กรัม ใส่ลงในขวดสีชามีฝาเกลียวปิดขนาด 40 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด แต่ละขวดเติมตัวทำละลายเอทานอล ร้อยละ 95 (ในน้ำ) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ สารละลายมาตรฐานภายใน (benzophenone-D10) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิทแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนแล้วจึงกรองและนำสารละลายที่ได้มาเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ก่อนเติมตัวทำละลายผสม cyclohexane: dichloromethane (1:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ถ่ายสารละลายดังกล่าวลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS

2.4.2 การสกัดตัวอย่างกระดาษตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4 [8]

ชั่งตัวอย่างกระดาษ (ตัวอย่างที่ 2-4) ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดไม่เกิน 1×1 ซม. ปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงในขวดสีชาขนาด 40 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 4 ขวด แต่ละขวดเติม benzophenone-D10 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเฉพาะขวดที่ 4 ของทุกตัวอย่างให้เติมสารละลายมาตรฐานผสม (1-6) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ก่อนนำไปสกัด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นและเติมเอทานอลร้อยละ 95 ในน้ำ (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป ปิดฝาแล้วแช่ขวดสกัดใน ultrasonic bath (Sonorex: super RX 255H, Germany)ที่ 60°C เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านหลอดหยดที่ปลายอุดด้วยสำลีใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีกสองครั้งแล้วนำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi, Switzerland) ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง cyclohexane: dichloromethane (1:1) ถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ด้วยสภาวะเหมาะสมที่ศึกษาได้

2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ด้วยเทคนิค GC-MS

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารผสมที่ศึกษาด้วยเทคนิค GC-MS ใช้เครื่อง GC-MS รุ่น Trace GC Ultra/ISQ

(Thermo Scientific, Sci Spec, China) ประกอบด้วยเครื่อง GC รุ่น Trace 1300 ร่วมกับเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ รุ่น AI 1310 เครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ รุ่น ISQ LT และคาพิลารีคอลัมน์เคลือบด้วย 50% diphenyl/50% dimethyl polysiloxane (TG-17Sil MS, Thermo Scientific; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพาที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของ injector, mass transfer line และ ion source คือ 280, 300 และ 275°C ตามลำดับ ปริมาตรที่ฉีด คือ 1ไมโครลิตร และศึกษาในโหมด Full scan mode และ SIM mode รายละเอียดเพิ่มเติมตามข้อ 2.5.1 และ2.5.2

2.5.1 การวิเคราะห์ด้วยโหมด Full scan mode : ตั้งค่าเครื่อง GC-MS ให้แสกนมวลของไอออนช่วง 50-350 amu

2.5.1.1 นำสารละลายเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2-7) ความเข้มข้นตัวละ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละตัวมาทดสอบโดยสาร (1-4 และ 7) ตั้งอุณหภูมิ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ ตามวิธี Full scan1(ตารางที่ 1) และสาร (5) และ (6) ตั้งอุณหภูมิ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ ตามวิธี Full scan2 และ Full scan3 (ตารางที่ 1) ตามลำดับ บันทึกเวลา และค่ามวลสาร (m/z) ของสารแต่ละตัว

2.5.1.2 นำสารละลายผสม (1-6) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มาทดสอบตามวิธี Full scan4 และ Full scan5 (ตารางที่ 1) และนำสารละลายผสม (1-7) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มาทดสอบตามวิธี Full scan5, Full scan6 และ Full scan7 (ตารางที่ 1) แล้วพิจารณาผลโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อเลือกสภาวะอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ที่สามารถแยกสารผสม (1-6) ได้ภายในระยะเวลาที่เร็วที่สุด

ตารางที่ 1 สภาวะอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ที่ใช้ศึกษาการแยกสารละลายมาตรฐานเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ ด้วยเทคนิค GC-MS : Full scan mode

GC method name	Total runtime (min)	Step	Rate (°C/min)	Temp (°C)	Hold time (min)
Full scan1*	17	0	-	80	2
		1	20	280	5
Full scan2	27	0	-	80	2
		1	20	280	10
Full scan3	37	0	-	80	2
		1	20	280	25
Full scan4	22.5	0	-	80	2
		1	20	290	10
Full scan5	24	0	-	150	2
		1	20	290	15
Full scan6	29	0	-	50	2
		1	20	290	15
Full scan7	41	0	-	150	2
		1	10	290	15

*สภาวะของอุณหภูมิตู้อบคอลัมน์เป็นสภาวะเดียวกับงานวิจัยของ Jonhs S. M. และคณะ [4]

2.5.2 การวิเคราะห์ด้วยโหมด Selective ion monitoring mode (SIM mode): นำสภาวะอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ วิธี Full scan5, Full scan6 และ Full scan7 ไปตั้งการวัดของเครื่อง GC-MS ให้เป็น SIM mode ได้เป็น วิธี SIM1 SIM2 และ SIM3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

2.5.3 นำสารละลายมาตรฐานผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ (1-6) ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS: SIM mode ทั้ง SIM1 SIM2 และ SIM3 (ตารางที่ 2) ทุกความเข้มข้น

แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของเบนโซฟีโนนโดยใช้อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของเบนโซฟีโนน (1, m/z = 105 ต่อพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานภายใน (7, m/z = 110) เป็นแกน Y และความเข้มข้นของเบนโซฟีโนน (มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแกน X

2.5.4 นำสารสกัดตัวอย่างที่ 1 ไปทดสอบด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้ SIM1 SIM2 และ SIM3 เปรียบเทียบปริมาณของเบนโซฟีโนนจากตัวอย่างกระดาษ (sample 1) เมื่อคำนวณจาก การทดสอบด้วย SIM1 SIM2 และ SIM3 และทดสอบด้วยสถิติ Anova: Single Factor จากโปรแกรม Microsoft Excel ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 สำหรับการทดสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณเบนโซฟีโนนที่พบ โดยมีสมมติฐาน คือ ค่าเฉลี่ยของเบนโซฟีโนนที่ทดสอบด้วยวิธี SIM1 SIM2 และ SIM3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ โดยมีเกณฑ์การยอมรับสมมติฐาน คือ ค่า $F_{critical} > F_{cal}$

ตารางที่ 2 รายละเอียดของการเลือกวัดมวลของไอออน (Mass list) เมื่อใช้ SIM mode

GC method name	SIM mode name	Time (min)	Mass List (amu)
Full scan5	SIM1	4.0-24.0	50-350
		5.0	77, 82, 105, 110, 182 and 192
		6.5	77, 119, 121, 181, 196, 197 and 198
		16.0	148 and 268
		18.0	132, 309 and 324
Full scan6	SIM2	4.0-29.0	50-350
		10.0	77, 82, 105, 110, 182 and 192
		10.7	77, 119, 121, 181, 196, 197 and 198
		21.0	148 and 268
		23.0	132, 309 and 324
Full scan7	SIM3	4.0-34.0	50-350
		16.5	77, 82, 105, 110, 182 and 192
		18.5	77, 119, 121, 181, 196, 197 and 198
		30.0	148 and 268
		34.0	132, 309 and 324

2.6 การทดสอบหาปริมาณสารเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ในตัวอย่างที่ 2-4 ด้วยสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค GC-MS ที่ศึกษาได้

2.6.1 นำสารละลายมาตรฐานของสารผสม (1-6) ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3.2 มาทดสอบด้วย GC-MS วิธี SIM1 โดยเลือกพีกแมสโครมาโทแกรมของสารแต่ละตัวที่จะใช้คำนวณหาปริมาณสาร (quantification ion) จากมวลของไอออน (mass ion) ที่ให้ค่าสัญญาณสูงสุดของแต่ละสาร คือ 105, 119, 121, 121, 148, และ 309 สำหรับสาร (1-6) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แล้วสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน Y คือ อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของมวลของไอออนดังกล่าวแต่ละตัวต่อพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานภายใน (m/z = 110) และ แกน X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน Correlation coefficient, $r^2 \geq 0.990$

2.6.2 นำสารสกัดตัวอย่าง 2-4 ที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.2 มาทดสอบด้วย GC-MS วิธี SIM1 (ตารางที่ 2)

2.6.2.1 กรณีที่ค่าสัญญาณของ Quantification ion (ตารางที่ 3) ของสารที่ทดสอบได้มีค่า signal/noise (S/N) น้อยกว่า 3 จะรายงานผลว่าไม่พบพีกและไม่พบสารนั้นๆ

ตารางที่ 3 มวลของไอออนที่ใช้ในการทดสอบเชิงปริมาณ (quantification ion) และการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualification ion) ของสารเบนโซฟีโนน สารอนุพันธ์ และสารมาตรฐานภายใน

Substances	Quantification ion (amu)	Qualification ion (amu)
(1)	105	182, 77
(2)	118	196, 181
(3)	121	198,197
(4)	121	198,197
(5)	148	268, 224
(6)	309	324, 132
(7)	110	192, 82

2.6.2.2 กรณีผล GC-MS พบพีกของสาร (1-6) ทั้ง qualification และ quantification ion (ตารางที่ 3) ให้นำอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของ quantification ion ของสารที่พบต่อพื้นที่ใต้พีกของสาร internal standard (m/z = 110) ที่ทดสอบได้เทียบกับกราฟมาตรฐานคำนวณหาค่าเฉลี่ย (C_{sample}) จากสูตร

$$\bar{C}_{sample} = \frac{(C_{obs-1} + C_{obs-2} + C_{obs-3})}{3}$$

$\bar{C}_{sample}$ คือ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นวัดได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายของสารขวดที่ 1-3 ที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (1-6) ที่มีอยู่ในตัวอย่างกระดาษ, mg/kg

C_{obs-1}, C_{obs-2}, C_{obs-3} คือ ความเข้มข้นของสาร (1-6) ที่วัดได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายขวดที่ 1-3 ที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (1-6), mg/kg

คำนวณหา% recovery จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_{obs-4} - \bar{C}_{sample}) \times 100}{C_{added}}$$

C_{obs-4} คือ ความเข้มข้นที่วัดได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายขวดที่ 4 ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (1-6) ที่ทราบความเข้มข้น, mg/kg

$\bar{C}_{sample}$ คือ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นวัดได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายของสารขวดที่ 1-3 ที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (1-6) ที่มีอยู่ในตัวอย่างกระดาษ, mg/kg

C_{added} คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่างกระดาษ, mg/kg

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การศึกษาการแยกสารผสม (1-6) ด้วย GC-MS (Full scan mode) ที่สภาวะต่าง ๆ กัน

จากผลการศึกษาเมื่อนำสาร(1-6) แต่ละตัวมาทดสอบด้วย GC-MS โดยใช้โหมด Full scan พบว่าเมื่อตั้งอุณหภูมิและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ตามวิธี Full scan1ซึ่งเป็นวิธีที่ Jonhs S. M. และคณะ [4] ใช้ในการศึกษาปริมาณสารเบนโซฟีโนน (1) ในตัวอย่างกระดาษสัมผัสอาหาร พบว่าเมื่อใช้วิธีดังกล่าวสามารถแยกสาร (1-4) ได้ที่เวลา (retention time) 9.7, 10.4, 12.2, และ 10.2 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แต่สาร (5) และ (6) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่ายังคงค้างอยู่ในคอลัมน์ แสดงว่าการคงอุณหภูมิไว้ที่ 280°C เป็นเวลา 5 นาที นั้นไม่เพียงพอที่จะทำให้สาร (5) และ (6) ออกจากคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองเพิ่มระยะเวลาการคงอุณหภูมิไว้ที่ 280°C จาก 5 นาที (Full scan1, ตารางที่ 1) ไปเป็น 10 นาที (Full scan2, ตารางที่ 1) และ 25 นาที (Full scan3, ตารางที่ 1) ซึ่งผลการการเพิ่มระยะเวลาดังกล่าวพบว่า วิธี Full scan2 สามารถแยกสาร (5) ออกมาได้ที่เวลา 23.3 นาที แต่ยังคงไม่สามารถแยกสาร (6) ซึ่งมีมวลมากที่สุด (m/z = 324) ออกมาจากคอลัมน์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาการคงอุณหภูมิไว้ที่ 280°C เป็น 25 นาที (Full scan3, ตารางที่ 1) สารแยกสาร (6) ออกมาได้ที่เวลา 27.9 นาที

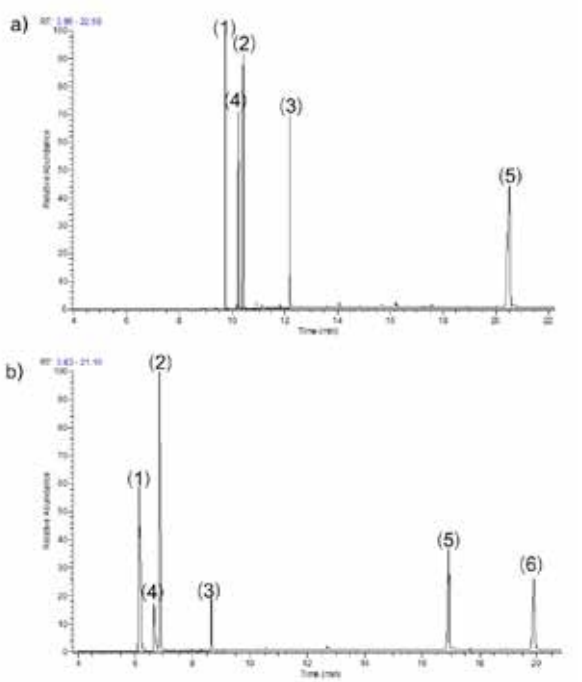
ตารางที่ 4 ค่า retention time และ มวลของไอออน (amu) ของสารเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2-7) เมื่อทดสอบด้วย GC-MS: Full scan1- Full scan3 (ตารางที่ 1)

Substances	Retention time (min)	Mass spectrum[e] (amu)
(1)	9.7[a]	182, 105[d], 77
(2)	10.4[a]	196, 119[d], 105, 91,77, 65
(3)	12.2[a]	198, 121[d], 105, 93, 77
(4)	10.2[a]	198, 121[d],105, 93, 77
(5)	23.3[b]	268, 224, 148[d], 120
(6)	27.9[c]	324, 309[d], 236, 132
(7)	9.7[a]	192, 110[d], 82

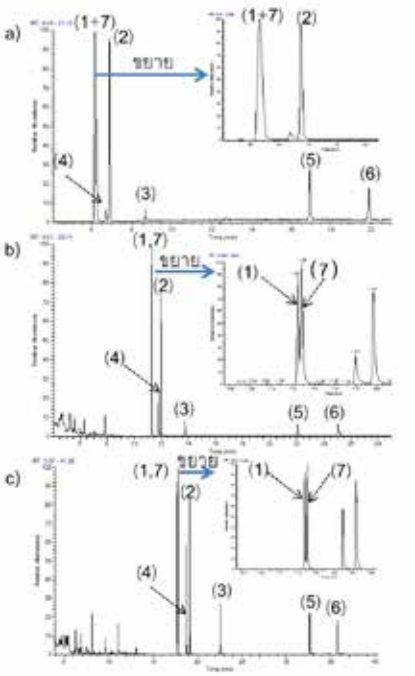
[a]ทดสอบด้วยวิธี Full scan1
[b]ทดสอบด้วยวิธี Full scan2
[c]ทดสอบด้วยวิธี Full scan3
[d]มวลของไอออนที่ให้ค่าสัญญาณสูงสุดของสารตัวนั้น
[e]ใช้ Library search (NIST/EPA/NIH mass spectral library version 2.0, 2011)

ด้วยวิธี Full scan3 แม้จะสามารถทำให้สารตัวที่ (6) ออกจากคอลัมน์ได้ แต่เมื่อพิจารณาเวลาในการทดสอบพบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ถึง 37 นาที (ตารางที่ 1) ดังนั้นเพื่อเร่งระยะเวลาในการชะสาร (5-6) ออกจากคอลัมน์ จึงได้ทดลองเพิ่มอุณหภูมิสูงสุดจาก 280°C เป็น 290°C ตามวิธี Full scan4 (ตารางที่ 1) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์จาก 80°C เป็น 290°C เท่าเดิม คือ 20 °C /min ผลการฉีดสารผสม (1-6) พบว่า อุณหภูมิสูงสุดที่เพิ่มขึ้นเป็น 290°C ทำให้วิธี Full scan4 สามารถแยกสาร (5) ออกจากคอลัมน์ได้ที่เวลา 20.5 นาที (รูปที่ 3a) ซึ่งเร็วกว่าเมื่ออุณหภูมิของสูงสุดของตู้อบคอลัมน์เป็น 280°C อยู่ 2.8 นาที ในขณะที่ระยะเวลาของการแยกสาร (1-4) ไม่ต่างจากเดิม อย่างไรก็ตามแม้วิธี Full scan4 จะมีเวลารวมในการวิเคราะห์เพียง 22.5 นาที แต่วิธีนี้ยังไม่สามารถพาสาร (6) ออกจากคอลัมน์ได้ ด้วยเหตุนี้วิธี Full scan5 (ตารางที่ 1) จึงถูกสร้างขึ้นโดยมีเป้าหมาย คือ การเพิ่มอุณหภูมิเริ่มต้นของตู้อบคอลัมน์จาก 80°C ไปเป็น 150°C เพื่อให้สาร (1-4) ถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วขึ้น และแม้อุณหภูมิสูงสุดของตู้อบคอลัมน์ถูกตั้งไว้ที่ 290°C เช่นเดียวกับวิธี Full scan4 แต่ขยายระยะเวลาการคงอุณหภูมิสูงสุดไว้จาก 10 นาที (Full scan4) เป็น 15 นาที (Full scan5) เพื่อให้มีเวลาเพียงพอที่สาร (6) จะออกจากคอลัมน์ได้ ซึ่งผลการทดสอบแยกสารผสม (1-6) ด้วยวิธี Full scan5 เป็นตามที่คาดการณ์ไว้ คือ สามารถแยกสาร (1-6) ได้ โดยเวลาที่สารแต่ละตัวถูกชะจากคอลัมน์เร็วกว่า (รูปที่ 3b) เมื่อเทียบกับแมสโครมาโทแกรมที่ได้จากการแยกด้วยวิธี Full scan4 (รูปที่ 3a)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าวิธี Full scan5 (ตารางที่ 1) จะสามารถแยกสารผสม (1-6) ได้ในเวลาเพียง 24 นาที แต่พบว่าเมื่อใช้วิธีดังกล่าวในการทดสอบแยกสารผสม (1-6) ที่มีการเติมสาร internal standard (7) ลงไปด้วยกลับพบว่า สาร (1) และ (7) จะออกมาที่เวลาเดียวกัน (รูปที่ 4a) ในขณะที่ เมื่อใช้วิธี Full scan6 (ตารางที่ 1) และ Full scan7 (ตารางที่ 1) จะสามารถแยกสาร (1) และ (7) จากกันได้มากกว่า (รูปที่ 4a และ 4c) แม้เวลารวมในการทดสอบจะนานกว่า ดังนั้นด้วยการใช้โหมด full scan เพียงอย่างเดียวมีข้อจำกัดในการแยก สาร (1) และ (7) ด้วยเหตุนี้ SIM mode ของ GC-MS จึงถูกนำมาใช้ เนื่องจากโหมดนี้สามารถเลือกวัดมวลของไอออนที่ต้องการได้ และเนื่องจากสาร (7) หรือ benzophenone-D10 เป็นสารไอโซโทป (isotope) ของเบนโซฟีโนน (1) ที่ไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom, H: รูปที่ 1) ถูกแทนที่ด้วยดิวเทอเรียมอะตอม (deuterium atom, D รูปที่ 1) จำนวน 10 อะตอมทำให้น้ำหนักของโมเลกุลของสาร (7) มีค่า คือ m/z = 192 ซึ่งมากกว่าสาร (1) ที่มี m/z = 182 และความแตกต่างนี้ตรวจสอบได้ด้วยเครื่องแมสเปกโทมิเตอร์



รูปที่ 3 GC-MS โครมาโทแกรม ของการแยกสารผสม (1-6) ความเข้มข้น 100 mg/kg เมื่อใช้วิธี a) Full scan4 และ b) Full scan5



รูปที่ 4 GC-MS โครมาโทแกรมของการแยกสารผสม (1-7) ความเข้มข้น 10 mg/kg เมื่อใช้วิธี a) Full scan5, b) Full scan6 และ c) Full scan7

3.2 การศึกษาการแยกสารผสมเบนโซฟีโนน อนุพันธ์และสารมาตรฐานภายในด้วย GC-MS โดยใช้ SIM mode

เมื่อนำสภาวะอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ที่ได้จากวิธี Full scan5, Full scan6 และ Full scan7 (ตารางที่ 1) มาปรับใช้กับ SIM mode ของเครื่อง GC-MS จะได้เป็น วิธี SIM1 SIM2 และ SIM3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดย Mass list ของสาร (1-7) จากทั้ง 3วิธีจะถูกตั้งไว้เหมือนกันเพียงแต่แตกต่างกันที่ระยะเวลาในการเลือกวัดมวลของไอออนเพื่อให้สอดคล้องกับเวลาที่สาร (1-7) ออกจากคอลัมน์ และเพื่อศึกษาว่าการเกิด co-elution ของสาร (1) และ (7) เมื่ออุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ใช้ตามวิธี Full scan5 ของ SIM1 (ตารางที่ 2) จะส่งผลต่อการทดสอบหาปริมาณเบนโซฟีโนนในสารสกัดตัวอย่างกระดาษหรือไม่ จึงได้ทดลองสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานผสม (1-6) และสาร (7) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารละลายมาตรฐานภายในด้วยวิธี SIM1, SIM2 และ SIM3 (ตารางที่ 2) แล้วนำกราฟมาตรฐานที่ได้จากทั้งสามวิธี ไปใช้ในการหาปริมาณเบนโซฟีโนน (1) จากสารสกัดตัวอย่าง 1 พบว่าแม้สมการของกราฟมาตรฐานที่ได้จากทั้งสามวิธีจะมีค่าความชัน (slope) ต่างกันเล็กน้อย แต่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน (Correlation coefficient), r^2 > 0.995 (ตารางที่ 5) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธี SIM1 ซึ่งพีกของสาร (1) และ (7) ออกมาที่เวลาใกล้เคียงกันมาก (6.15 และ 6.11 นาที ตามลำดับ) และไม่สามารถแยกได้เมื่อใช้ Full scan5 แต่กราฟมาตรฐานของสาร (1) ที่สร้างเมื่อให้อัตราส่วนพื้นที่พีกของสาร (1) และ (7) เป็นแกน Y และ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบนโซฟีโนนเป็นแกน X จากการทดสอบด้วย GC-MS วิธี SIM1 มีความเป็นเส้นตรง (r^2 = 0.9992) เช่นเดียวกับเมื่อใช้วิธี SIM2 (r^2 = 0.996) และ SIM3 (r^2 = 0.9984) (ตารางที่ 5) ซึ่งเป็นวิธีที่สาร (1) และ (7) ไม่เกิด co-elution และยังพบว่าผลของการหาปริมาณเบนโซฟีโนน (1) จากสารสกัดตัวอย่าง 1 ที่มีปริมาณเบนโซฟีโนน (1)ในปริมาณที่สูงมาก เมื่อนำมาทดสอบด้วย วิธี SIM1 SIM2 และ SIM3 ได้ค่าเฉลี่ยของสารเบนโซฟีโนน (1) คือ 425.9, 430.8 และ 445.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{critical}$ = 5.1432 > F_{cal} = 0.3223) เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Anova : single factor โดยโปรแกรม Microsoft Excel

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบการสร้างกราฟมาตรฐานของเบนโซฟีโนน (1) เมื่อทดสอบโดย GC-MS ด้วยวิธี SIM1 SIM2 และ SIM3

Conc. Benzophenone (1) (mg/L)	Peak area ratio of (1) to (7)		
	SIM1	SIM2	SIM3
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0440	0.1049	0.1203	0.1088
0.1062	0.0750	0.0584	0.0618
0.2395	0.5633	0.5969	0.5839
0.5566	1.3257	1.3603	1.3389
0.8543	2.0712	2.1427	2.1554
1.1315	2.8155	2.8567	2.9365
Slope	2.4539	2.5111	2.547
Correlation coefficient, r^2	0.9992	0.9996	0.9984

จะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิค IDMS โดยเลือกใช้สาร benzophenone-D10 เป็นสารมาตรฐานภายในร่วมกับวิเคราะห์ด้วย GC-MS (SIM1) ที่ใช้เวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ คือ 24 นาที นั้น สามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารเบนโซฟีโนน (1) ที่เกิดการ co-elution ร่วมกับสารมาตรฐานภายใน (7) และกราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง อีกทั้งเมื่อนำกราฟที่ได้ไปใช้หาปริมาณเบนโซฟีโนนในสารสกัดตัวอย่างที่ 1 พบว่า ค่าที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวิธี SIM2 และ SIM3 ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ด้วย GC-MS นาน 29 และ 41 นาที ตามลำดับ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ รวม 6 ชนิด (1-6) ด้วยเทคนิค GC-MS ร่วมกับเทคนิค IDMS ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือ สภาวะที่อุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ตั้งไว้ตามวิธี Full scan5 (ตารางที่ 1)แต่เลือกวัดไอออนด้วยตามวิธี SIM1 (ตารางที่ 2)

3.3 การหาปริมาณสาร (1-6) ในตัวอย่างกระดาษตัวอย่างที่ 2-4 ด้วยสภาวะที่เหมาะสมของ GC-MS ที่ศึกษาได้

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค GC-MS ที่ศึกษาได้มาทดสอบแยกสารสกัดตัวอย่างกระทงกระดาษอบขนม จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 2-4, รูปที่ 2) ที่ปัจจุบันยังไม่มีมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของประเทศไทยในการกำหนดคุณภาพของกระดาษที่ใช้ในการอบขนมเหล่านี้ ผลการทดสอบจากการเปรียบเทียบผลของ GC-MS ที่ได้ระหว่างสารสกัดตัวอย่างที่ 2-4 เทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร (1-6) ช่วงความเข้มข้น 0.05- 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ($r^2 > 0.990$) พบเพียงการปนเปื้อนของสาร (1) ในตัวอย่างที่ 4 (กระทงสีน้ำตาล) ปริมาณ 0.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่านั้น โดยมีค่าเฉลี่ยของค่าคืนกลับของสาร (1) คือ ร้อยละ 91.1 (เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิลกรัมต่อลิตร) ซึ่งค่านี้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดที่ระบุไว้ใน AOAC Peer-Verified methods, 1998 ที่กำหนดให้ร้อยละของค่าคืนกลับของสารที่ระดับความเข้มข้น 1-10 ppm ควรอยู่ในช่วย 80-110%) [9] และเมื่อพิจารณาค่าคืนกลับของสาร (2), (4), และ (6) ที่มีค่าเท่ากับ 97.3, 98.6 และ 102.4 ตามลำดับ สารทั้งสามตัวนี้ก็มีค่าคืนกลับอยู่ในเกณฑ์การยอมรับเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าการทดสอบสารทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าวมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ ส่วนในกรณีของค่าเฉลี่ยของค่าคืนกลับของสาร (3) และ สาร (5) ซึ่งมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 119.5 และ 142.2 แม้จะอยู่เกินเกณฑ์การยอมรับ แต่ไม่กระทบต่อผลการออกรายงานเนื่องจากในตัวอย่างที่ศึกษาไม่พบสารดังกล่าว

ตารางที่ 6 สรุปผลการทดสอบตัวอย่างสาร (1-6) ในตัวอย่างกระดาษที่ 2-4 ด้วยเทคนิค GC-MS:SIM1

substances	ตัวอย่างที่ 2		ตัวอย่างที่ 3		ตัวอย่างที่ 4		ค่าเฉลี่ย recovery (%)
	Conc. (mg/kg)	recovery (%)	Conc. (mg/kg)	recovery (%)	Conc. (mg/kg)	recovery (%)	
(1)	ไม่พบ	107.4	ไม่พบ	65.9	0.94	100.2	91.1
(2)	ไม่พบ	120.1	ไม่พบ	72.1	ไม่พบ	99.7	97.3
(3)	ไม่พบ	156.3	ไม่พบ	90.0	ไม่พบ	112.4	119.5
(4)	ไม่พบ	114.6	ไม่พบ	73.34	ไม่พบ	107.9	98.6
(5)	ไม่พบ	175.6	ไม่พบ	114.1	ไม่พบ	138.8	142.2
(6)	ไม่พบ	133.8	ไม่พบ	68.5	ไม่พบ	105.0	102.4

4. สรุป (Conclusion)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ GC-MS เพื่อแยกสารผสมเบนโซฟีโนน (1) และอนุพันธ์ (2-6) พบว่าเมื่อใช้ benzophenone-D10 (7) ทำหน้าที่เป็นสารมาตรฐานภายใน และใช้โหมดการวิเคราะห์ของ GC-MS เป็นแบบ SIM mode โดยเลือกการวิธี SIM1 และตั้งอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ตามวิธี Full scan5 สามารถแยกสารผสมเบนโซฟีโนนและอนุพันธ์ (1-6) ได้ภายใน 24 นาที สามารถสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิดโดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน (Correlation coefficient), $r^2 > 0.995$ และยังได้นำสภาวะที่ศึกษาได้ไปทดสอบหาปริมาณสาร(1-6) จากสารสกัดตัวอย่างกระดาษสัมผัสอาหาร จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งผลการทดสอบพบเพียงการปนเปื้อนของสารเบนโซฟีโนนในกระทงขนมอบ (ตัวอย่างที่ 4) ในปริมาณ 0.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกระดาษ (%recovery = 91)

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่อง “การสำรวจสารอินทรีย์ต้องห้ามในวัสดุสัมผัสอาหารประเภทกระดาษเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค” สนับสนุนทุนวิจัยโดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ

6. เอกสารอ้างอิง (References)

[1] RHODES, M.C., et al. Carcinogenesis studies of benzophenone in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology.* 2007, 5, 843–851.

[2] THE EUROPEAN PAPER AND BOARD FOOD PACKAGING CHAIN. *Industry guideline for the compliance of paper and board materials and articles for food contact* [online]. 2012 [viewed 26 June 2013]. Available from: http://www.cepi.org/system/ files/public/documents/publications/foodcontact/2012/Industry%20guideline-updated2012final.pdf

[3] CASTLE, L., et al. Migration studies from paper and board food packaging materials. Part 2. Survey for residues of dialkylamino benzophenone UV-cure ink photoinitiators. *Food Additives and Contaminants.* 1997, 14, 45-52.

[4] JOHNS, S.M., et al. Studies on Functional Barriers to Migration 1 Transfer of Benzophenone from Printed Paperboard to Microwaves Food. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* 1995, 91, 69-73.

[5] SARGENT, M., et al. *Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS).* Cambridge : The Royal Society of Chemistry. 2002, pp. 1-49.

[6] VAN HOECK, E., et al. Analysis of benzophenone and 4-methyl benzophenone in breakfast cereals using ultrasonic extraction in combination with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS^n). *Analytica Chimica Acta.* 2010, 663, 55-59.

[7] VAN DEN HOUWE, K., et al. Evaluation of the migration of 15 photo-initiators from cardboard packaging into Tenax® using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Additives & Contaminants: Part A.* 2014, 31, 767–775.

[8] SAESAENGSEERUNG, N. Comparison of solvent and techniques for extraction of benzophenone from paper intended to come into contact with foodstuffs. *Bulletin of Applied Sciences.* 2016, 5, 97-102.

[9] TECHNICAL DIVISION ON REFERENCE MATERIALS OF AOAC INTERNATIONAL. *Standard format and guidance for AOAC standard method performance requirement documents* [online]. 2011. [viewed 26 January 201]. Available from: http://stakeholder.aoac.org/SPIFAN/SMPR_Guidelines_v13.pdf

คำแนะนำในการส่งต้นฉบับ
วารสารผลงานวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
Bulletin of Applied Sciences

บทความที่ส่งตีพิมพ์จะต้องไม่เคยตีพิมพ์หรืออยู่ในระหว่างการรอพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ในวารสารอื่น บทความที่เสนอมาเพื่อตีพิมพ์อาจเขียนเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษก็ได้ แต่บทคัดย่อต้องมีทั้งสองภาษา ทั้งนี้บทความทุกเรื่องจะได้รับการพิจารณาตรวจแก้จากผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาที่เกี่ยวข้อง และกองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจแก้ไขต้นฉบับและพิจารณาตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลัง

ความรับผิดชอบ

บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารผลงานวิชาการกรมวิทยาศาสตร์บริการ ถือเป็นผลงานทางวิชาการ และเป็นความเห็นส่วนตัวของผู้เขียน ไม่ใช่ความเห็นของกรมวิทยาศาสตร์บริการ หรือกองบรรณาธิการ ผู้เขียนต้องรับผิดชอบต่อบทความของตน และบทความที่ตีพิมพ์ในเล่มนี้ไม่เคยพิมพ์ในวารสารใดมาก่อน และจะไม่นำส่งไปเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารอื่นภายใน 60 วัน

การเตรียมต้นฉบับและการส่งต้นฉบับ

❍ **ชื่อเรื่อง**: ชื่อเรื่องต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตัวอักษร Cordia New ขนาด18 ตัวหนา จัดวางข้อความชื่อเรื่องตรงกึ่งกลางหน้ากระดาษ โดยชื่อเรื่องภาษาอังกฤษเฉพาะคำขึ้นต้น ให้พิมพ์ตัวใหญ่

❍ **ชื่อผู้วิจัย ผู้วิจัยร่วม**: ชื่อผู้วิจัย ผู้วิจัยร่วม ต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตัวอักษร Cordia New ขนาด 12 ตัวปกติ จัดวางข้อความชื่อผู้วิจัย ผู้วิจัยร่วมกึ่งกลางหน้ากระดาษ ใช้เลข 1.2.3....โดยยกกำลังแสดงตรงชื่อ และเป็นเลขเดียวกันเพื่อแสดงที่อยู่ และe-mail address.

ตัวอย่าง

อรวรรณ ปิ่นประยูร[1*], กรรณิการ์ บุตรเอก[2**]

Orawan Pinprayoon[1*] , Kannika Butraek[2**]

[1]กรมวิทยาศาสตร์บริการ

[2]ศูนย์ประสานงานกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำภูมิภาค ภาคใต้

[*] E-mail address: porawan@dss.go.th

[**] Corresponding author. E-mail address: kannika.b@most.go.th

❍ **บทคัดย่อ** (Abstract): บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตัวอักษร Cordia New ขนาด14 ตัวปกติ เนื้อหาในคัดย่อ ควรระบุวัตถุประสงค์ ผลการวิจัย และบทสรุปโดยย่อ

❍ **คำสำคัญ** (Keywords): คำสำคัญต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ระบุคำสำคัญหรือวลีสั้นๆ จำนวน 3-5 คำ คำที่ 1, คำที่ 2, คำที่ 3 ตัวอักษร Cordia New ขนาด 12 ตัวปกติ

❍ **เนื้อเรื่อง** แบ่งเป็นส่วนต่างๆดังนี้

1. **บทนำ (Introduction)**: หัวข้อบทนำ ตัวอักษร Cordia New ขนาด 16 ตัวหนา จัดชิดขอบด้านซ้าย หัวข้อย่อย ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 ตัวหนา เนื้อหา ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 ตัวปกติ

2. **วิธีการวิจัย (Experimental)**: หัวข้อวิธีการวิจัย ตัวอักษร Cordia New ขนาด 16 ตัวหนา จัดชิดขอบด้านซ้าย หัวข้อย่อย ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 ตัวหนา เนื้อหา ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 ตัวปกติ

3. **ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)**: หัวข้อผลและวิจารณ์ ตัวอักษร Cordia New ขนาด 16 ตัวหนา จัดชิดขอบด้านซ้าย หัวข้อย่อย ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 ตัวหนา เนื้อหา ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 ตัวปกติ

4. **สรุป** (Conclusion): หัวข้อสรุป ตัวอักษร Cordia New ขนาด16 ตัวหนา จัดชิดขอบด้านซ้าย เนื้อหา ตัวอักษร Cordia New ขนาด14 ตัวปกติ

5. **กิตติกรรมประกาศ** (Acknowledgement): หัวข้อกิตติกรรมประกาศ ตัวอักษร Cordia New ขนาด16 ตัวหนา จัดชิดขอบด้านซ้าย เนื้อหา ตัวอักษร Cordia New ขนาด14 ตัวปกติ

6. **เอกสารอ้างอิง** (References): การอ้างอิงเอกสารให้ใช้ระบบเรียงตามตัวเลข ใส่หมายเลขในวงเล็บเหลี่ยม [ ] เรียงตามลำดับการอ้างอิงในเรื่อง เอกสารอ้างอิงทุกฉบับจะต้องมีการอ้างอิงหรือกล่าวถึงในบทความ

ตัวอย่าง

[1] AKGUL, M. and A. TOZLUOGLU. Alkaline-ethanol pulping of cotton stalks. *Scientific Research and Essays.* 2010, 5(10), 1068-1074.

[2] STADELMAN, W. J. and O. J. COTTERILL. *Egg Science and Technology.* 4th ed. New York : Food Produce Press, 1990, 591 p.

[5] TECHNICAL DIVISION ON REFERENCE MATERIALS OF AOAC INTERNATIONAL. *Standard format and guidance for AOAC standard method performance requirement documents* [online]. 2011. [viewed 26 January 2017]. Available from: http://stakeholder.aoac.org/SPIFAN/SMPR_Guidelines_v13.pdf

❍ **ตาราง** (Table) **และรูป** (Figure) : ตัวอักษร Cordia New ขนาด 12 ตัวปกติ

- ตาราง : ให้ระบุลำดับที่ของตาราง หัวตารางให้จัดชิดขอบด้านซ้าย ชื่อตารางให้อยู่ด้านบนของตาราง
- รูป : ให้ระบุลำดับที่ของรูป คำบรรยายรูปภาพให้อยู่ใต้รูปภาพ และจัดกึ่งกลางคอลัมน์

❍ **การส่งต้นฉบับ**

1. ส่งต้นฉบับทางไปรษณีย์ ส่งต้นฉบับจำนวน 1 ชุด และสำเนาจำนวน 2 ชุด พร้อมไฟล์ข้อมูลมาที่
   กองบรรณาธิการวารสารวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ (Bulletin of Applied Sciences)
   สำนักงานวารสาร สำนักงานเลขานุการกรม
   ฝ่ายประชาสัมพันธ์ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
   เลขที่ 75/7 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
2. ส่งต้นฉบับทางไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
   e-mail : bulletin@dss.go.th, udomlak@dss.go.th
3. ส่งต้นฉบับทางเว็บไซต์ได้ที่ URL : http://bas.dss.go.th