



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์สำหรับโครมาโทกราฟีบนชั้นงาน
ของไหลขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์เตตระไฮคลีนในน้ำเสีย

โดย

รศ. ดร. อรพินท์ เจียรถาวร

15 กรกฎาคม 2559

สัญญาเลขที่ RSA5580019

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์สำหรับโครมาโทกราฟีบนชิ้นงาน
ของไหลขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์เตตระไฮดรีนในน้ำเสีย

โดย รศ.ดร. อรพินท์ เจียรถาวร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยของโครงการนี้ พร้อมทั้งขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ผ่านทางสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การสมทบการสนับสนุนงบประมาณในครั้งนี้

งานวิจัยในครั้งนี้จักสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากไม่ได้รับการร่วมมือในการทำงานอย่างดียิ่งจากนิสิตในที่ปรึกษาทั้งในระดับปริญญาเอกและปริญญาโท อันได้แก่ นางสาววิมลรัตน์ อินศวร นางสาววิสาชะ ชุณหกรณ์ นางสาวพัชรา ขาวหมตจต นายคมสันต์ ขวัญเมือง และนางสาวศุภกาญจน์ สุประดิษฐาภรณ์ ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาขอแสดงความขอบคุณและซาบซึ้งใจต่อนิสิตทุกคนในที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานที่ให้การสนับสนุนการวิจัยได้แก่ Prof. Jonathan Sweedler ผู้ให้เครื่องตรวจวัด laser induced fluorescence (LIF) Prof. Harry J. Whitlow ผู้ให้ความช่วยเหลือ การสนับสนุนและให้ความรู้ในด้านการติดตั้งลำแสงใหม่ของ LIF การประมวลผล และการสร้างชิ้นงานของไหลขนาดเล็กจากวัสดุต่างๆ เช่น แก้ว PTFE และอื่นๆ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศร สิงขรัตน์ ผู้ให้การสนับสนุนในการสร้างชิ้นงานจาก PDMS ดร.รุ่งเรือง พัฒนากุล ผู้ให้ความช่วยเหลือในการสร้างหน้ากากสำหรับการสร้างชิ้นงาน นอกจากการสนับสนุนทางตรงแล้วผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนทางอ้อมและกำลังใจจากเพื่อนร่วมงานทั้งจากหน่วยงานภายในและภายนอกอันได้แก่ ดร. แฟร์ดาร์ มาเหล็ม คุณพีรพงษ์ สุนทรเดชะ

นอกเหนือจากนี้ผู้วิจัยยังขอแสดงความขอบคุณต่อคณะกรรมการประเมินจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัยสำหรับข้อแนะนำ และการสละเวลาให้ความคิดเห็นเพื่อให้งานวิจัยดียิ่งๆ ขึ้นไป

ยังมีเพื่อน และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้อย่างครบถ้วนในที่นี้ที่คอยให้กำลังใจและการสนับสนุนทางอ้อมผ่านบุคคลและผ่านนิสิต ผู้วิจัยขอขอบพระคุณท่านทั้งหลายเป็นอย่างยิ่งมา ณ ที่นี้

รองศาสตราจารย์ ดร. อรพินท์ เจียรถาวร

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5580019

ชื่อโครงการ โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์สำหรับโครมาโทกราฟีบนชิ้นงานของไหลขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์เตตระไฮคลินในน้ำเสีย

นักวิจัย: รศ.ดร. อรพินท์ เจียรถาวร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : fsciopec@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างช่องการไหลในชิ้นงานขนาดเล็กซึ่งทำจากวัสดุหลากหลายชนิดได้แก่ พอลิไดเมทิลไซลอกเซน (polydimethylsiloxane) หรือ PDMS พอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethylene) หรือ PTFE แก้วบอโรซิลิเกต เทคนิคการสร้างชิ้นงานมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่ทำให้เกิดช่อง และการกัดกร่อนที่แตกต่างกันและช่องการไหลที่มีขนาดแตกต่างกัน การสร้างชิ้นงานจากวัสดุ PDMS ทำโดยการหล่อของเหลวพอลิเมอร์บนต้นแบบที่มีการพิมพ์ ลวดลายของช่องการไหล เนื่องจากวัสดุ PTFE มีความแข็งมากการสร้างชิ้นงานจึงต้องสร้างจากการใช้ ไอออนพลังงานสูงยิงไปบนหน้ากากที่เป็นลวดลายช่องการไหล ส่วนวัสดุที่ทำจากแก้วสามารถสร้าง ได้จากการนำแผ่นหน้ากากลวดลายมาประกบแก้วและกัดกร่อนร่องด้วยสารเคมี เนื่องจากภาชนะ บรรจุที่แตกต่างกันทำให้การสังเคราะห์โมโนลิทซิลิกาและซิลิกาอินทรีย์มีความแตกต่าง จึงต้องมีการ ปรับเปลี่ยนสูตรและวิธีการทดลองให้เหมาะสมกับภาชนะเช่นท่อแก้วคาพิลลารีขนาดเล็กซึ่งมีช่องการ ไหลคล้ายคลึงกับช่องการไหลของชิ้นงานขนาดเล็ก ในการทดลองได้ทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาในท่อแก้วคาพิลลารี โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ในช่องการไหลของชิ้นงานขนาดเล็ก ทำการ ปรับเปลี่ยนสูตรการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 และโมโนลิทพอลิเมอร์ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการเกิดความแข็งตัวที่รวดเร็วของของเหลวสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ทำให้ไม่สามารถทำการสังเคราะห์ได้ในท่อคาพิลลารีหรือช่องการไหลขนาดเล็กได้ จึงได้ทำการสังเคราะห์ใน หลอดฉีดยาขนาดเล็กเพื่อทำการดูดซับสารเตตระไฮคลิน

ในการประยุกต์ใช้งานอื่นๆ ของโมโนลิทที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นในท่อแก้วคาพิลลารีหรือช่องการ ไหลขนาดเล็กได้แก่การนำไปใช้เป็นตัวดูดซับสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฮาเลต โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 และพอลิเมอร์ในการดูดซับสารประกอบเตตระไฮคลิน และการแยกสารประกอบเอมีน chlorphenilamine และวิตามินบี 2 ในช่องการไหลขนาดเล็กที่มีโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8

คำหลัก: โมโนลิท ซิลิกาอินทรีย์ การสกัด โครมาโทกราฟี ชิ้นงานขนาดเล็ก

Abstract

Project Code : RSA5580019

Project Title : Organic-silica monolith for chromatography on a microfluidic chip for tetracycline determination in waste water

Investigator : Assoc. Prof. Orapin Chienthavorn Kasetsart University

E-mail Address : fsciopc@ku.ac.th

Project Period : 3 years

In this research, a flow channel was fabricated in a microchip made of various types of materials, such as polydimethylsiloxane (PDMS), polytetrafluoroethylene (PTFE), and borosilicate glass. Fabrication techniques depended on a type of material, size of the channel, and erosion/corrosion activity. PDMS microfluidic chip was made by casting a polymer liquid mixture on a master mold patterned for a microflow channel. Because PTFE is a very strong solid, the channel must then be created by bombarding the material through the mask pattern with high-energy ions. A channel on a borosilicate glass chip was made by attaching a patterned mask on the glass sheet and then etching it with corrosive chemicals. Synthesis in different containers gave different structures of silica and organic silica monolithic material, it therefore needed to change the formulation and modify the fabrication method to suit the containers, such as channel in a microchip, capillary tubing with a similar flow channel as that of microchip, and a syringe. Several experiments were conducted, such as synthesis of monolithic silica in a capillary, C8 silica monolith in a microchannel, optimization of formulation of C18 organic silica monolith and polymer monolith. However, due to a rapid solidification of formulation liquid for C18 monolith synthesis, the fabrication in either a capillary or microchannel was not possible. C18 organic silica monolith was therefore synthesised in a small syringe for tetracycline adsorption.

Some applications of our synthetic monolith were phthalate adsorption by using silica monolith in a capillary, C18 organic silica monolith and polydivinylpyrrolidone polymer monolith for tetracycline adsorption from waste water, C8 organic silica monolith in a microchannel for the separation of amine compounds, chlorphenilamine and vitamin B2.

Keywords : Monolith, organic silica, extraction, chromatography, microfluidic chip

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ในชั้นงานของไหลขนาดเล็กเพื่อจุดประสงค์ในการทำ

- ตัวดูดซับสำหรับการทำการ clean up และการทำสารละลายคลีนให้เข้มข้นขึ้นจากน้ำเสีย
- ในการเป็นคอลัมน์สำหรับ HPLC ในการหาปริมาณเตตระฮัยดรอล

เพื่อสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาในช่องการไหลขนาดเล็กเพื่อจุดประสงค์ในการใช้งานดังนี้

- เป็นตัวดูดซับสำหรับการทำการ clean up สารปนเปื้อน
- ในการเป็นคอลัมน์สำหรับ HPLC ในการหาปริมาณสารปนเปื้อน

2. วิธีการทดลอง

การดำเนินงานทดลองวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

2.1 การสร้างชั้นงานของไหลขนาดเล็ก

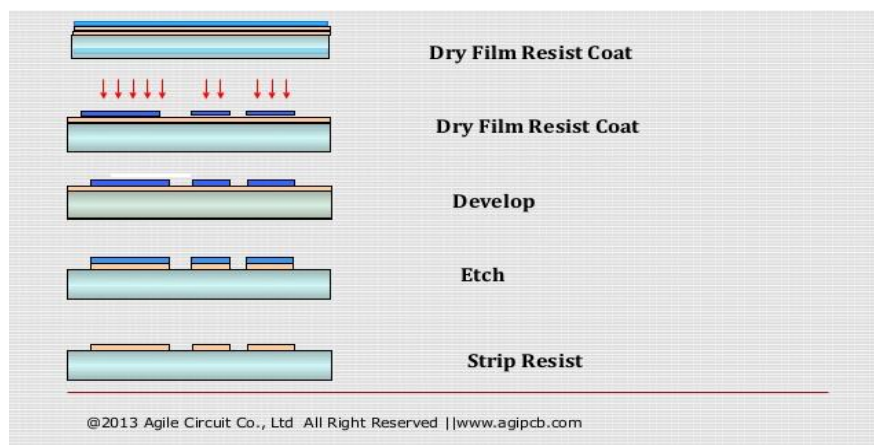
เนื่องจากวัสดุที่นำมาสร้างชั้นงานของไหลขนาดเล็กมีหลายประเภท เช่น PDMS PTFE และกระจก ดังนั้นกระบวนการสร้างชั้นงานจึงมีความแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุเป็นหลัก ในการวิจัยครั้งนี้ได้สร้างชั้นงานของไหลขนาดเล็กจาก PDMS และ PTFE ดังจะได้อธิบายต่อไปนี้

2.1.1 การสร้างชั้นงานของไหลขนาดเล็กจากพอลิไดเมทิลซิลอกเซน

PDMS เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาทางเคมีทำให้เกิดของเหลวพอลิเมอร์แล้วจึงทำให้เกิดการแข็งตัวในภายหลัง การทดลองจึงมีความจำเป็นต้องทำเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือมีการสร้างแม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปชั้นงาน และการสำเนาสร้างชั้นงาน

2.1.1.1 การสร้างแม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปชั้นงานด้วยแผ่นลายวงจรพิมพ์ (Printed Circuit Board: PCB)

การเตรียมรูปหล่อชั้นงานด้วยแผ่นลายวงจรพิมพ์ PCB ซึ่งเป็นชั้นทองแดงบนแผ่นพลาสติกอีพ็อกซี (epoxy) โดยใช้ Dry film ซึ่งเป็นฟิล์มไวต่อแสง UV เป็นตัววาดลวดลาย ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและสามารถสร้างลวดลายขนาดเล็กได้ เริ่มจากการตัดแผ่น PCB ให้ได้ขนาดที่ต้องการ นำมาขัดด้วยกระดาษทรายเบอร์ 600 กับเบอร์ 1,000 ตามลำดับ เพื่อเตรียมผิวหน้าให้มีความเรียบ ตัดขนาดของ Dry film ให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่น PCB เล็กน้อยวางลงบนแผ่น PCB รีดด้วยแถบความร้อนเพื่อให้แผ่น Dry film แนบสนิทไปกับแผ่น PCB อย่างสมบูรณ์ นำฟิล์มที่ทำการวาดลวดลายแล้ววางบนแผ่น PCB ทำการฉายแสง UV ที่ระยะห่าง 20 เซนติเมตร เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาล้างน้ำยา (Developer) ซึ่งเป็นสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกไป นำไปแช่ในสารละลายของ FeCl_3 ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดเพื่อกำจัดทองแดงส่วนที่ไม่ต้องการ จะได้เส้นลวดลายตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปล้างส่วนที่เป็น Dry film ออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)



2.1.1.2 การสำเนาสร้างชิ้นงานของไหลขนาดเล็กด้วย PDMS

ทำโดยการผสม PDMS (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, Midland, MI, USA) ที่อัตราส่วน 10:1 และเอาฟองอากาศออกจาก PDMS ด้วยระบบสุญญากาศประมาณ 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง โดยสังเกตปริมาณฟองที่อยู่เหนือผิวหน้าของพอลิเมอร์ จากนั้นนำพอลิเมอร์เทลงบนแบบลายทองแดง โดยพยายามเทให้เกิดฟองน้อยที่สุด นำไปทำให้แข็งตัวด้วยความร้อนที่ 70 องศาประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งขึ้นอยู่กับความหนาของชั้นพอลิเมอร์ที่เทลงบนแบบ เมื่อแน่ใจว่าพอลิเมอร์แข็งตัวสมบูรณ์แล้วค่อยๆ ลอก PDMS ออกจากแบบลายทองแดง จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูความเรียบของผนัง นำพอลิเมอร์ที่เกิดจากการลอกออกไปประกบกับพอลิเมอร์ชนิดเดียวกันที่เคลือบบางอยู่บนกระจกซึ่งผ่านการให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-5 นาทีจนเกือบแข็งตัวสมบูรณ์ และนำไปวางภายใต้สุญญากาศ จะได้ชิ้นงานของไหลขนาดเล็กที่มีผนังที่ 4 ด้านเป็น PDMS ที่มีความยืดหยุ่นจึงนำไปให้ความร้อนอีกครั้งที่ 70 องศาเป็นเวลา 30 นาที

ชิ้นงานของไหลขนาดเล็ก PDMS ที่เสร็จสมบูรณ์แล้วต้องนำมาทดสอบการรั่วซึมโดยต่อเข้ากับท่อคาพิลลารีชนิดแก้วซิลิกาที่ต่ออยู่กับปั๊ม จากนั้นทำการฉีดตัวทำละลายเมทานอลเข้าในช่องการไหล เมื่อต้องการเก็บรักษาให้ปิดหัวและท้ายของท่อคาพิลลารีที่ต่ออยู่กับชิ้นงานทั้งสองด้านด้วย silicon rubber และเก็บไว้ในตู้เย็น

2.1.2 การสร้างชิ้นงานของไหลขนาดเล็กจากพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน

ในการศึกษาการสร้างชิ้นงานครั้งนี้เกิดขึ้นเนื่องจากชิ้นงานที่สร้างด้วยวัสดุประเภท PDMS เมื่อใช้กับตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์จะเกิดการพองตัวเมื่อใช้ในระยะเวลานาน ซึ่งมีปัญหากับความคงทนของชิ้นงาน พอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE) หรือ เทฟลอน (Teflon) จึงเป็นอีกวัสดุหนึ่งที่นำมาปรับใช้ในงานวิจัย เนื่องจากอะตอมของไฮโดรเจนที่ล้อมรอบอะตอมของคาร์บอนทั้ง 4 ถูกแทนที่ด้วยฟลูออรีน ทำให้โครงสร้างของมอนอเมอร์มีความสมมาตรและมีความแข็งแรงมาก ทนต่อสารละลายอินทรีย์ได้สูง เหมาะแก่การนำมาพัฒนาเป็นอุปกรณ์ของไหลระดับไมโครเพื่อการวิเคราะห์ในเชิงเคมี การทดลองแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ การ

สร้างหน้ากากสำหรับสร้างช่องการไหลขนาดเล็ก การสร้างช่องการไหลขนาดเล็กด้วยการใช้เครื่องเร่งอนุภาค 1.7 MV Tandetron และการสร้างชิ้นงานด้วยความร้อน

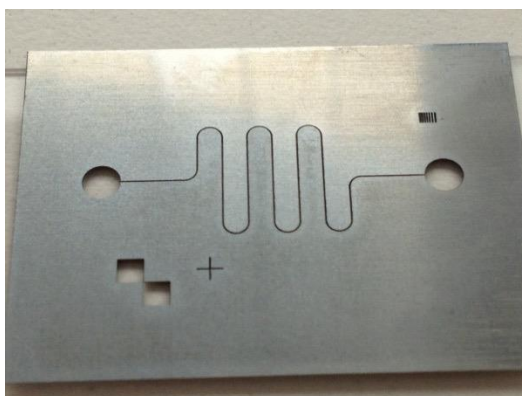
2.1.2.1 การสร้างหน้ากากสำหรับสร้างช่องการไหลขนาดเล็กลงบนผิวชิ้นงาน

การสร้างช่องการไหลขนาดเล็กระดับไมโครลงบนชิ้นงานประเภท PTFE ต้องใช้เทคนิคพิเศษของลำแสงพลังงานสูงของออกซิเจน (MeV oxygen-ion beam) เพื่อให้ช่องการไหลมีความลึกขนาด 50 ไมครอน และมีความกว้างขนาด 50-1000 ไมครอน ซึ่งขึ้นอยู่กับการออกแบบแผ่นหน้ากาก (Mask) ในงานทดลองใช้เลเซอร์ความร้อนสูงยังเป็นลวดลายตามที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Illustrator (Ai) หรือ AutoCAD ตามความละเอียดของงาน ลงบนแผ่นหน้ากากโมลิบดีนัม (Mo) ความละเอียดต่ำสุดที่ลำแสงเลเซอร์สามารถทำได้คือ 10 ไมครอน

2.1.2.2 การสร้างช่องการไหลขนาดเล็กด้วยเทคนิคลำไอออนออกซิเจนระดับเมกะอิเล็กตรอนโวลท์

งานวิจัยนี้ได้เลือกเทคนิคลิโทกราฟี (lithography) ที่ใช้ลำไอออนพลังงานระดับเมกะอิเล็กตรอนโวลท์ (MeV) เพื่อใช้ในการสร้างลวดลาย 3 มิติบนชั้น PTFE ลำออกซิเจนที่มีพลังงานระดับ MeV จะวิ่งเข้าสู่วัสดุในแนวตรงและลึกเพื่อทำให้เกิดลวดลาย และด้วยเทคนิคนี้จะทำให้สามารถสร้างชิ้นงานที่มีอัตราส่วนระหว่างความลึกต่อความกว้างของลวดลายมีค่าสูง และได้ผนังของช่องขนาดไมโครที่มีความเรียบซึ่งตรงตามลักษณะของการใช้ในงานวิจัยการแยกสารทางเคมี

ในงานวิจัยเริ่มจากการสร้างแผ่นหน้ากากโมลิบดีนัม (Mo mask) เพื่อเป็นแบบในการบันทึกลวดลาย 3 มิติลงบนชั้นผิวของชิ้นงาน PTFE ที่มีความหนา 50, 100, 1000 ไมครอนตามลำดับ กำหนดให้ลำออกซิเจนที่มีพลังงาน 3 MeV กราดลงบนหน้ากากโมลิบดีนัมที่วางอยู่หน้าชิ้นงานด้วยโปรแกรมควบคุมในระยะเวลาที่คำนวณตามความลึกที่ต้องการ (อยู่ในช่วง 2-4 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มของลำแสงต่อความหนาของชิ้นงาน) ชิ้นงานที่ปรากฏลวดลาย 3 มิติ จะนำมาทำความสะอาดก่อนเข้าสู่กระบวนการประกอบเป็นอุปกรณ์ของไหลระดับไมครอนในขั้นตอนต่อไป โดยมีรูปแบบของแผ่นหน้ากาก (mask) สำหรับช่องการไหลที่กำหนดแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 รูปแบบของแผ่นหน้ากาก (mask) ที่มีช่องการไหลกว้าง 50 ไมครอน

2.1.2.3 การสร้างชิ้นงานโดยใช้ความร้อน

ขั้นตอนในการผลิตอุปกรณ์ของไหลระดับไมครอนในงานวิจัยนี้ ใช้หลักความร้อนและการขยายตัวของวัสดุโลหะในการกดทับชิ้นงาน PTFE ที่มีช่องระดับไมโครให้กลายเป็นอุปกรณ์ของไหล ในงานวิจัยเริ่มจากการทำความสะอาดพื้นผิวของแผ่นชิ้นงานที่มีการบัดกรีกลดลาย 3 มิติ เรียบร้อยแล้วด้วยไอโซโพรพานอลและอะซิโตน ทำให้แห้งปราศจากความชื้นด้วยการผ่านไนโตรเจน แผ่นชิ้นงานจะถูกวางบนแผ่น PTFE ที่ต้องการประกบ นำไปวางไว้ระหว่างแผ่นสแตนเลส 2 แผ่น ความหนาแผ่นละ 1.5 เซนติเมตร การขยายตัวของวัสดุโลหะจะเป็นไปตามค่าสัมประสิทธิ์การขยายตัวเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 327 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) ของ PTFE ทำให้ชิ้นของ PTFE เกิดการเปลี่ยนสถานะ และยึดติดกันระหว่างชิ้นงานกลายเป็นของไหลระดับไมครอน

2.1.3 การสร้างชิ้นงานของไหลขนาดเล็กจากกระจก

เหตุผลที่เลือกกระจกขึ้นมาสร้างชิ้นงานของไหลระดับไมครอนเนื่องจากกระจกมีความทนทานต่อการทำงานกับตัวทำละลายอินทรีย์สูง ช่วยเพิ่มอายุในการทำงานของชิ้นงานให้นานขึ้น การทดลองแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ การสร้างลายบนแผ่นฟิล์ม การสร้างช่องการไหลขนาดเล็กด้วยวิธีการทางเคมี และการสร้างชิ้นงานด้วยความร้อน

2.1.3.1 การสร้างลวดลายของช่องการไหลบนแผ่นกระจก

ลวดลายที่ใช้จะถูกออกแบบโดยใช้โปรแกรม Illustrator (Ai) หรือ AutoCAD ตามความละเอียดของงาน และสั่งพิมพ์ลงบนแผ่นฟิล์มที่มีความหนาระดับหนึ่งเพื่อป้องกันการโค้งงอของแผ่นฟิล์ม ทำความสะอาดผิวหน้าแผ่นกระจกด้วย Piranha cleaning solution และทำการเคลือบกระจกที่ทำความสะอาดแล้วด้วยของเหลวไวแสง (Positive photoresist) ด้วยการเหวี่ยงความเร็วสูง (Spin coating) จากนั้นให้ความร้อน 70 องศาเซลเซียสของเหลวไวแสงจะเกิดการแข็งตัว วางแผ่นฟิล์มที่ออกแบบไว้บนชั้นของสารไวแสงที่แข็งตัวแล้ว โดยหันด้านหมึกพิมพ์แนบกับชั้นของสารไวแสงเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างชั้นน้อยที่สุดเพื่อป้องกันการบานออกของแสง UV ทับแผ่นกระจกใสที่ด้านบนของแผ่นฟิล์มเพื่อป้องกันการโค้งงอของแผ่นฟิล์มอีกชั้นหนึ่ง ทำการฉายแสง UV ที่ระยะห่าง 20 เซนติเมตรเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการล้างสารไวแสงออกจะได้ลวดลายของช่องการไหลที่ต้องการ

2.1.3.2 การสร้างช่องการไหลขนาดเล็กด้วยวิธีทางเคมี

การสร้างช่องการไหลด้วยวิธีทางเคมี เลือกใช้ HF เนื่องจากวัสดุเป็นกระจก นำกระจกที่สร้างลวดลายเสร็จเรียบร้อยแล้วลงในสารละลาย HF ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำการกวนเป็นระยะเพื่อให้กระจกสัมผัสกับสารละลายอย่างทั่วถึงเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง นำกระจกที่ทำการกัดเป็นช่องการไหลเรียบร้อยแล้วลงในสารละลาย developer ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง KOH 4 กรัมและ H_3BO_3 1 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร

2.1.3.3 การสร้างชิ้นงานด้วยความร้อน

นำกระจกที่ได้ช่องการไหลขนาดเล็กตามที่ต้องการแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อทำการปรับผิวหน้า นำประกบกับกระจกอีกชั้นเพื่อให้เกิดการปิดของช่องของไหลอย่างสมบูรณ์ นำชิ้นงานเข้าเตาเผาอุณหภูมิสูง 650 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง แล้วให้คายความร้อนอย่างช้าๆ จะได้ชิ้นงานที่สมบูรณ์

2.2 การสังเคราะห์โมโนลิท

2.2.1 การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกา

การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาทำการปรับเปลี่ยนสูตรการสังเคราะห์ (formulation) โดยการทำให้ในหลอดปิดขนาดเล็ก และท่อคาพิลลารี โดยสูตรการสังเคราะห์ที่เหมาะสมคือส่วนผสมของยูเรีย 0.09 กรัม 0.01 M กรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร polyethylene glycol 0.088 กรัมและ tetramethoxysilane 0.4 มิลลิลิตร ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันและนำไปใส่ฟองอากาศออก จากนั้นนำไปใส่ในท่อคาพิลลารี และปิดปลายทั้งสองของท่อ นำไปอบที่ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง เพิ่มอุณหภูมิเป็น 120 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง จึงทำให้เย็นลง ล้างโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้ในท่อคาพิลลารีด้วยเมทานอลและทำให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.2.2 การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์

ในการสังเคราะห์ซิลิกาโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 และ C18 ทำโดยการปรับเปลี่ยนสูตรการสังเคราะห์ (formulation) อย่างหลากหลายโดยการทำให้ใน ท่อคาพิลลารี ช่องการไหลของชิ้นงานขนาดเล็ก และหลอดฉีดยาขนาดเล็กที่ปิดสนิท โดยแบ่งการทำการสังเคราะห์เป็น 2 แบบคือ

การสังเคราะห์โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ด้วยวิธีการของ sol-gel โดยเริ่มจากการผสมสารละลาย Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 90 ไมโครลิตร และ n-octyltriethoxysilane (C8-TEOS) 50 ไมโครลิตร methanol 180 ไมโครลิตร กรดไฮโดรคลอริก 0.5 M 10 ไมโครลิตร และน้ำ 10 ไมโครลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงเติมสารละลาย dodecylamine 10 ไมโครลิตร ทำการ pretreat ที่ผนังท่อคาพิลลารี หรือ ผนังท่อในระบบการไหลขนาดเล็กที่ทำจากวัสดุ PDMS ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้นำของเหลวผสมที่เตรียมไว้ใส่เข้าในท่อแก้วคาพิลลารี จากนั้นนำท่อคาพิลลารีหรือระบบการไหลขนาดเล็กที่มีของเหลวสังเคราะห์โมโนลิทเข้าตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างท่อคาพิลลารีหรือช่องการไหลในระบบการไหลขนาดเล็กด้วยเอทานอล (ethanol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจึงนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 48 ชั่วโมง

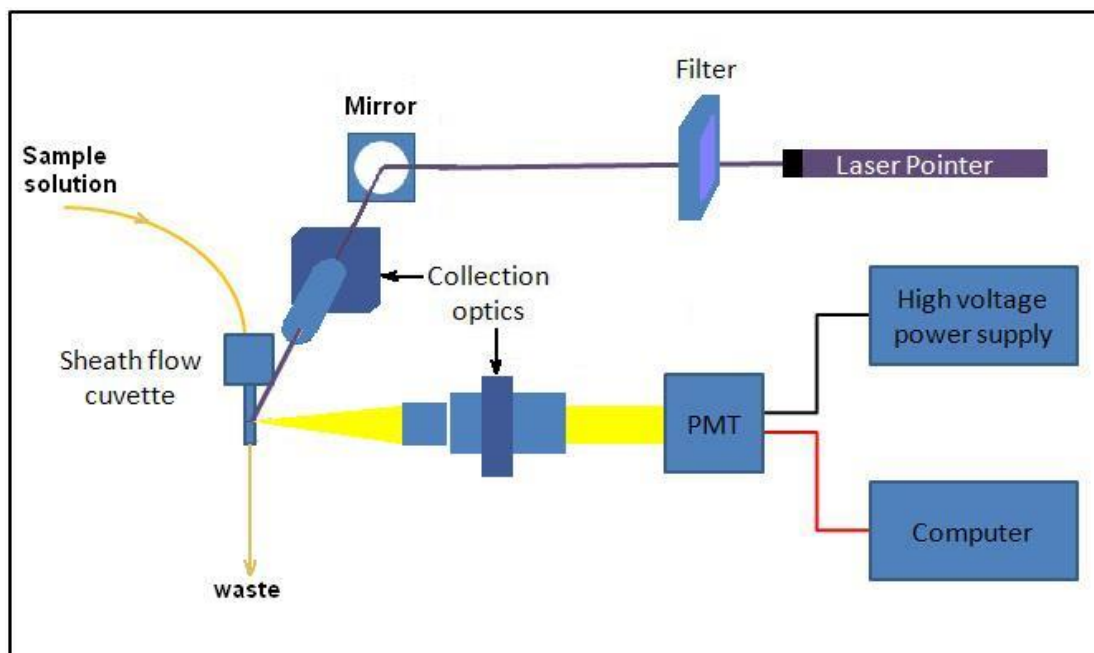
การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 เริ่มจากการผสมของเหลว C18 tetramethyl orthosilicate (C18-TMOS) 50 ไมโครลิตร tetramethyl orthosilicate (TMOS) 50 ไมโครลิตร MPTMS 20 ไมโครลิตร เมทานอล 150 ไมโครลิตร เอทานอล 130 ไมโครลิตร และกรดไฮโดรคลอริก 0.5 M 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงเติม สารละลาย dodecylamine 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้ว เติมน้ำปราศจากไอออน 10 ไมโครลิตร ทำการ pretreat ที่ผนังท่อแก้วคาพิลลารี หรือ ผนังของช่องการไหลในชิ้นงาน PDMS ขนาดเล็ก ด้วยสารละลาย sodium hydroxide จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้นำของเหลวผสมที่เตรียมไว้ใส่เข้าในท่อแก้วคาพิลลารี หรือช่องการไหลในชิ้นงานขนาดเล็ก จากนั้นนำท่อคาพิลลารีหรือชิ้นงานขนาดเล็กที่มีของเหลวสังเคราะห์โมโนลิทเข้าตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้างท่อแก้วคาพิลลารีหรือช่องการไหลของชิ้นงานขนาดเล็กด้วย เอทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจึงนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 48 ชั่วโมง

2.2.3 การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดพอลิเมอร์พอลิไดไวนิลเบนซีนไวนิลไพโรลิโดน (Polydivinylbenzene-co-N-divinylpyrrolidone)

โดยการผสม dibenzoyl peroxide จำนวน 32 มิลลิกรัม และ vinylpyrrolidone 40 ไมโครลิตร และ divinylbenzene 320 ไมโครลิตร ให้เข้ากันในขวดขนาดเล็ก จากนั้นเติม dodecanol 840 ไมโครลิตร และ cyclohexanol 1200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมปั่น จากนั้นทำการเอาฟองแก๊สออกโดยใช้ ultrasonic bath เทสารละลายผสมในหลอดฉีดยาพลาสติกที่มีเยื่อแก้วอยู่ปลายเพื่อให้อากาศละลายอยู่ในหลอด ปิดหลอดและนำหลอดดังกล่าวเข้าอบที่ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จะเกิดเป็นของแข็งโมโนลิท นำออกจากตู้อบและล้างหลอดที่บรรจุโมโนลิทด้วยเมทานอล นำไปอบที่ 40 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง.

2.3 การจัดการระบบเครื่องตรวจวัด laser induced fluorescence

ระบบ laser induced fluorescence ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ซึ่งโดยทั่วไปนั้นมักใช้หลอดอาร์กอน แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้การใช้แหล่งกำเนิดแสง laser พลังงานต่ำลงและราคาถูกลงซึ่งคือ laser pointer ชิ้นส่วนอื่นๆ ต่อมาได้แก่ เลนส์เชิงแสง (optical lens) เซลล์ที่สารตัวอย่างผ่านแบบ sheath flow (sheath flow cell) และหลอด photomultiplier (PMT) เพื่อการตรวจวัดสัญญาณ แผนผังแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แผนผังแสดงระบบ laser induced fluorescence

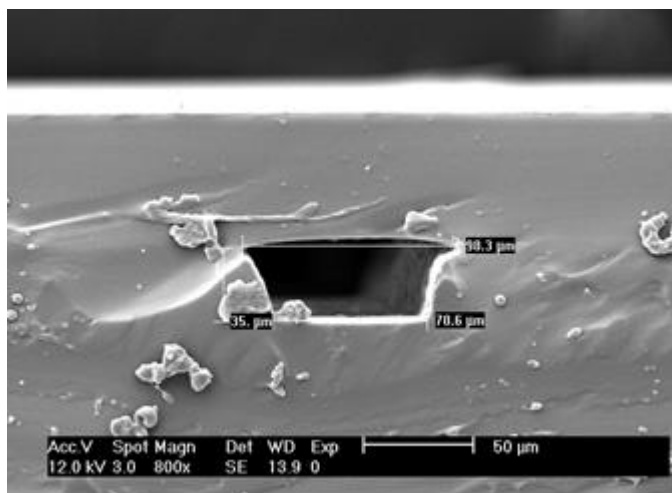
แหล่งกำเนิดแสง laser pointer นี้มีกำลัง 50 มิลลิวัตต์ ใช้สารกึ่งตัวนำ GaN (gallium nitride) ให้แสงสีน้ำเงินอมม่วงที่ 405 นาโนเมตร แหล่งกำเนิดแสงนี้ต่ออยู่กับอุปกรณ์แปลงไฟจากกระแสสลับเป็นกระแสตรงขนาด 150 มิลลิวัตต์ เพื่อให้ความต่างศักย์ 3.0 โวลต์ ลำแสงสีน้ำเงินถูกจัดให้สะท้อนบนกระจก UV ในแนวตั้งฉากกับกลุ่มเลนส์รวมแสง (Newport, Irvine, CA, USA) ซึ่งรวมแสงไปที่ตรงกลางของ sheath flow cuvette กลุ่มเลนส์รวมแสงอีกกลุ่มหนึ่งทำหน้าที่รวมสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมาเข้าสู่หลอด photomultiplier (PMT) (HC-135-01, Hamamatsu, Middlesex, NJ). ในการควบคุมและประมวลผลทำโดยใช้โปรแกรมที่เขียนโดย LabVIEW 7.1 (National Instruments, USA) ทำให้สัญญาณสามารถปรากฏได้ทันที แต่อย่างไรก็ตามได้มีการปรับเปลี่ยนการประมวลผลด้วยความช่วยเหลือของ Prof H.J. Whitlow และมีการปรับปรุงอยู่เสมอเนื่องจากสภาวะแวดล้อมทำให้ต้องมีการปรับตั้งแนวการเดินทางของแสงใหม่อยู่บ่อยครั้ง

3. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

3.1 ผลการสร้างชิ้นงานของไหลขนาดเล็ก

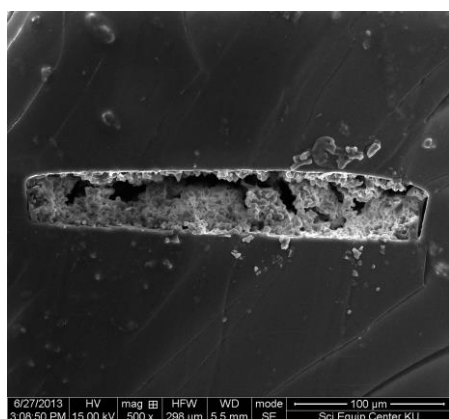
3.1.1 ผลการสร้างชิ้นงาน PDMS

ภายหลังจากการสร้างชิ้นงาน PDMS ได้นำไปดูภาคตัดขวางของช่องการไหลของ PDMS โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) แสดงดังรูปที่ 3 เป็นที่สังเกตว่าผนังของช่องการไหลมีลักษณะเรียบและเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าโดยมีความกว้างประมาณ 70 - 100 ไมครอนและมีความลึก 35 ไมครอน

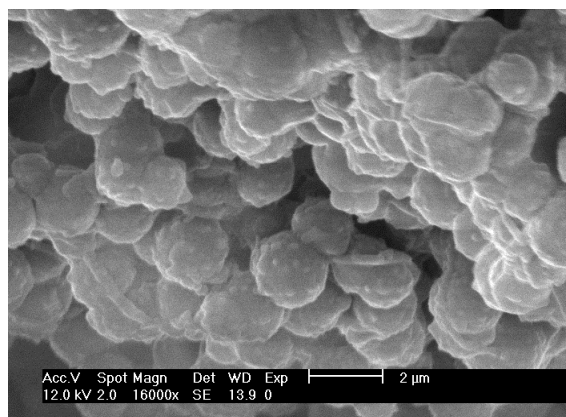


รูปที่ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของภาคตัดขวางของช่องการไหล

เป็นที่สังเกตว่าไม่ใช่ทุกๆ ชิ้นงานของ PDMS ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาทำการสังเคราะห์โมโนลิทภายในช่อง ดังนั้นทุกๆ ชิ้นงานที่นำมาทำการสังเคราะห์ต่อจึงจำเป็นต้องทำการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และทดสอบการไหลด้วยน้ำ ชิ้นงานที่สามารถใช้การได้ก็ต้องไม่ให้แรงดันย้อนกลับเมื่อมีการปั๊มน้ำให้ไหลผ่าน เมื่อนำชิ้นงานมาทำการสังเคราะห์โมโนลิทต่อเช่นเดียวกับการสังเคราะห์โมโนลิทในท่อคาพิลลารี ดังที่กล่าวแล้วในหัวข้อ 2.2.2 ผลการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ภายในช่องการไหลแสดงดังรูปที่ 4



(A)



(B)

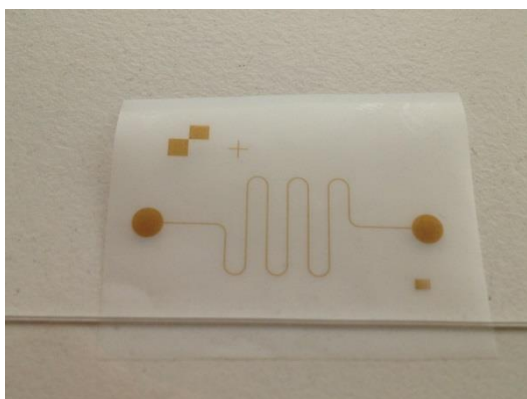
รูปที่ 4 ภาพจาก SEM ของ (A) ภาคตัดขวางของช่องการไหลที่มีบรรจุด้วย (B) โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8

การต่อชิ้นงานช่องการไหลขนาดเล็กเข้ากันกับระบบการไหลและการตรวจวัดด้วย LIF โดยให้โมบายเฟสไหลโดยการปั๊มด้วย syringe หรือ reciprocating pump (LC-10ADVB, Shimadzu, Japan) ซึ่งต่อกับ injection valve และท่อคาพิลลารีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 10 เซนติเมตร ซึ่งมีปลายข้างหนึ่งต่อกับชิ้นงานช่องการไหล ที่ปลายอีกด้านของทางออกของช่องการไหลต่ออยู่กับท่อคาพิลลารีขนาดเท่าเดิมอีกอันหนึ่งที่มีปลายที่ลอกเอา polyimide ออกและต่ออยู่กับ sheath flow-cell ของระบบ LIF ตำแหน่งของท่อซิลิกาที่ปราศจาก polyimide ต้องจัดวางให้อยู่ในตำแหน่งกลางของ quartz cuvette ขนาด 1×1×20

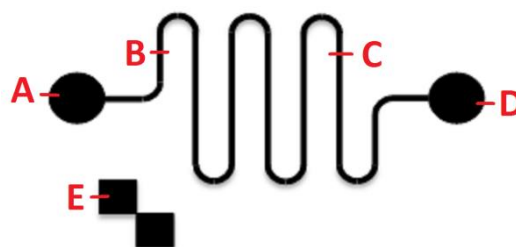
มิลลิเมตร การไหลของน้ำที่ทำเป็น sheath flow ด้านนอกโดยให้น้ำไหลตามแรงโน้มถ่วงของโลกโดยมีความเร็ว 1 มิลลิเมตรต่อวินาที

3.1.2 ผลการสร้างรูปหล่อชิ้นงาน PTFE ด้วยวิธีการใช้ลำแสงพลังงานสูง

หลังจากการฉายรังสี ช่องการไหลของ PTFE ในทุกๆ ชิ้นงานจะมีสีน้ำตาลอ่อนแสดงดังรูปที่ 5 (A) โดยสาเหตุคาดว่าเกิดจากปฏิกิริยาของออกซิเจนที่ยิงกับอะตอมของคาร์บอนใน PTFE ซึ่งโดยปกติแล้วลำไอออนของออกซิเจนจะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจนและคาร์บอน ได้คาร์บอนไดออกไซด์ที่หลุดออกมาจากการชน ส่งผลให้เกิดช่องการไหลที่ชัดเจน คุณภาพของช่องการไหลภายหลังการสร้างรูปแบบสามารถสังเกตได้จากรูปที่ 6 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นและการปลดปล่อยแก๊สสามารถยืนยันได้จากภาพจากกล้องจุลทรรศน์ซึ่งแสดงดังภาพที่ 7 โดยจะเห็นผิวหยาบเป็นรูปร่างส่วนในบริเวณฐานของช่องการไหลของ PTFE ซึ่งเกิดจากการชนของออกซิเจนกับผนัง PTFE

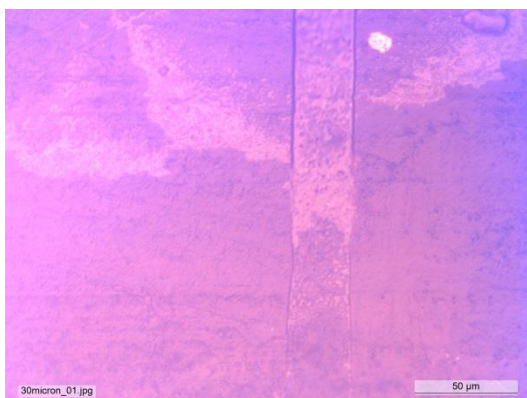


(A)

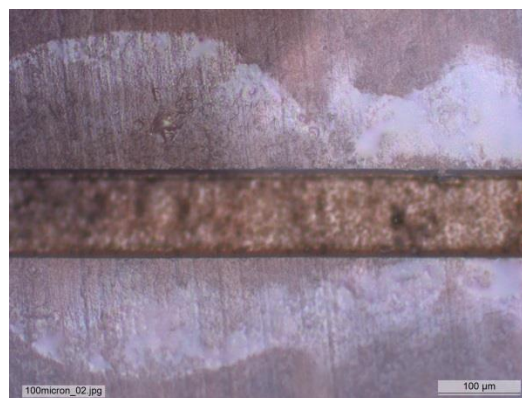


(B)

รูปที่ 5 แผ่น PTFE (A) ภายหลังการฉายรังสี และ (B) ตำแหน่งของการวัดขนาดของช่องการไหลโดยในเครื่อง profilometer

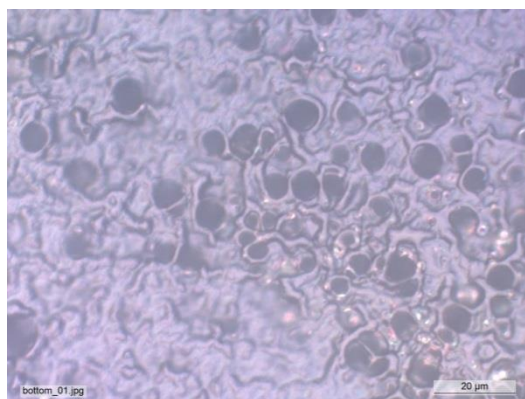


30 ไมครอน

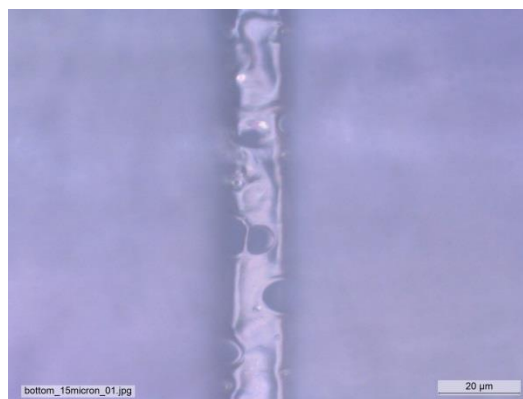


100 ไมครอน

รูปที่ 6 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ภายหลังการยิงแสงของช่องการไหลขนาด 30 และ 100 ไมครอน



(A)



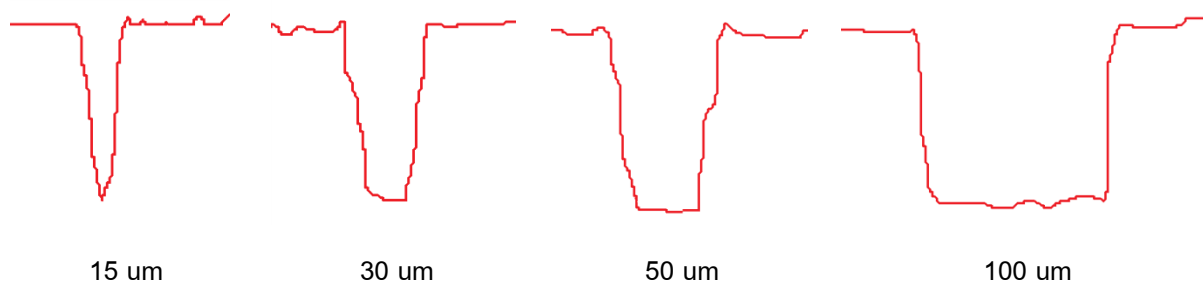
(B)

รูปที่ 7 ภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์พื้นฐานของช่องการไหลในทุกชั้นงานที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (A) ที่มีลักษณะที่ถูกล้างของออกซิเจนชั้น และพื้นฐานของช่องการไหลขนาด 15 ไมครอน (B).

ค่า Ion fluence คำนวณได้จากการวัดกระแสของไอออนที่หักลบค่ากระแสอิเล็กตรอนแล้ว โดยความสม่ำเสมอของการฉายรังสีสามารถวัดได้โดยการทำ magnetic scanning ทัวบริเวณพื้นที่ที่ถูกรังสีขนาด 2×3.9 ตารางเซนติเมตรซึ่งได้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด โดยมีการปรับ fluence เพื่อให้ลำรังสีสามารถส่องผ่านชั้นงาน PTFE ในบริเวณที่ต้องการได้อย่างทั่วถึง ความลึกและความกว้างของแต่ละช่องการไหลสามารถวัดได้โดยใช้เครื่อง profilometer และค่าของ fluence และ flux ที่ใช้สำหรับความกว้างของแต่ละ channel ได้แสดงเปรียบเทียบกันดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความลึกและความกว้างของแต่ละช่องการไหลภายหลังจากการฉายลำรังสีออกซิเจน ที่ตำแหน่งต่างๆ ตามรูปที่ 5 (B)

ขนาดของ ช่องของ Mask (μm)	A (μm)	B (μm)		C (μm)		D (μm)	E (μm)	Fluence (ions/cm ²)
	ความ ลึก	ความ ลึก	ความ กว้าง	ความ ลึก	ความ กว้าง	ความ ลึก	ความ ลึก	
100	14.5	11.3	108.6	13.2	110.6	13.64	14.6	3.70×10^{15}
50	3.9	4.17	55.3	4.63	54.3	4.5	5.2	4.58×10^{14}
30	3.5	4.8	38.2	6.1	31.2	4.8	4.3	5.94×10^{14}
15	7.0	5.12	25.14	7.0	28.16	7.5	7.3	1.29×10^{15}



รูปที่ 8 รูปแบบของช่องที่ได้จากเครื่อง Alpha-Step 500 surface profiler

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความกว้างของแต่ละช่องการไหลเมื่อวัดโดยใช้เครื่อง Alpha-Step 500 profiler และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ขนาดของช่อง ของ Mask (μm)	B (μm)		C (μm)	
	profiler	กล้องจุลทรรศน์	profiler	กล้องจุลทรรศน์
100	108.6	108.6	110.6	105.1
50	55.3	54.8	54.3	53.4
30	38.2	32.8	31.2	31.2
15	25.14	18.7	28.16	20.3

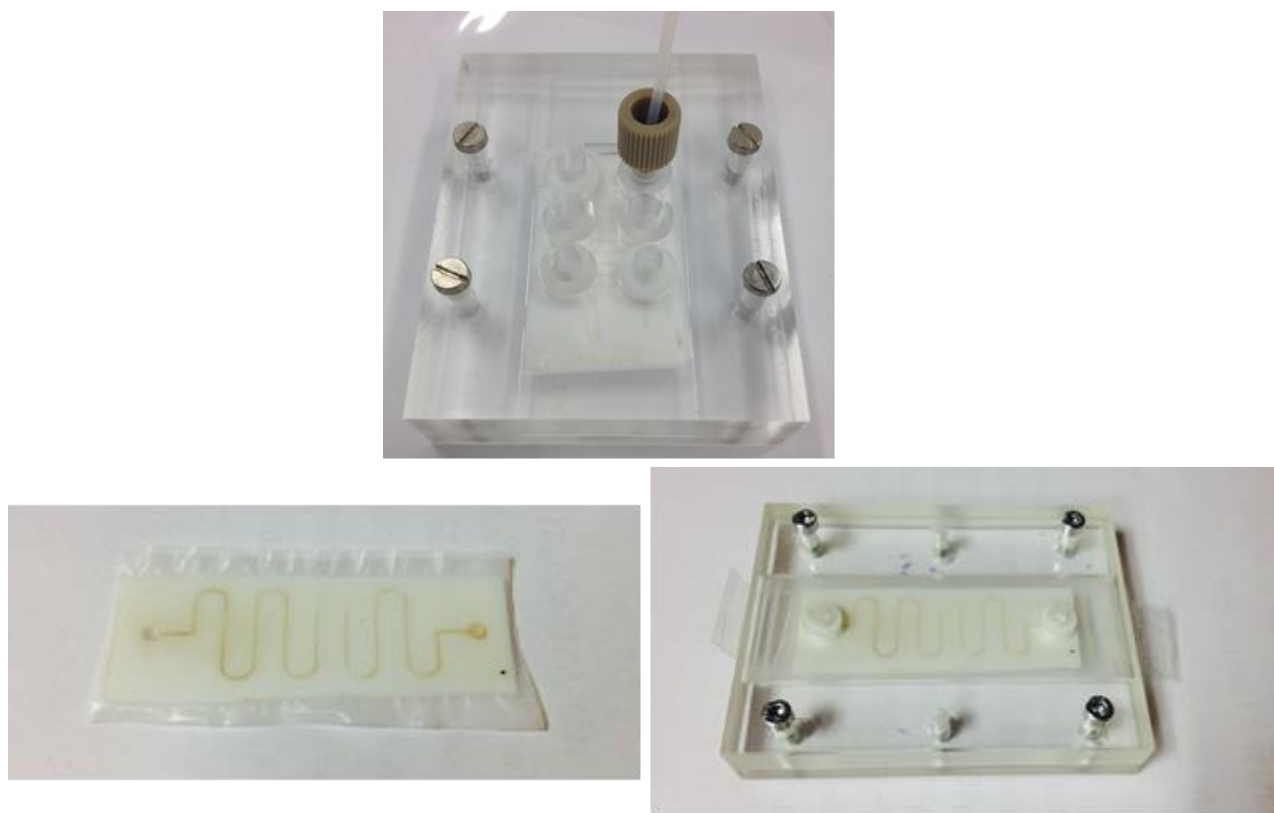
สามารถสรุปได้ว่าการทำการสร้างรูปแบบช่องการไหลบน PTFE โดยใช้ลำไอออนของออกซิเจนทำให้ช่องการไหลมีความตรงแม้ว่าเมื่อดูจากภาคตัดขวางของช่องการไหลและตรวจสอบโดยการใช้เครื่อง profilometer จะพบว่าด้านล่างมีความแคบมากกว่าด้านบนก็ตาม ช่องการไหลที่ได้นี้มีลักษณะค่อนข้างตรงและมีผนังขรุขระซึ่งเกิดจากฟองแก๊สในปฏิกิริยาระหว่างลำแสงออกซิเจนและคาร์บอนที่ผิวของวัสดุ PTFE

ภายหลังจากการฉายแสงด้วยลำไอออนแล้ว จึงนำแผ่นชิ้นงานไปล้างฝุ่นผงด้วยไอโซโพรพานอลและอะซีโตน นำไปทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน นำแผ่นชิ้นงาน PTFE ที่ต้องการประกบกันวางระหว่างแผ่นแก้วโดยมีแท่นโลหะประกบด้วยน็อตและสกรูดังรูปที่ 9 นำแท่นโลหะที่ประกบชิ้นงานนี้ไปให้ความร้อนที่ 327 องศาจะเกิดการประกบกันอย่างสนิท



รูปที่ 9 แท่นโลหะเพื่อการทำการประกบแผ่นชิ้นงาน PTFE

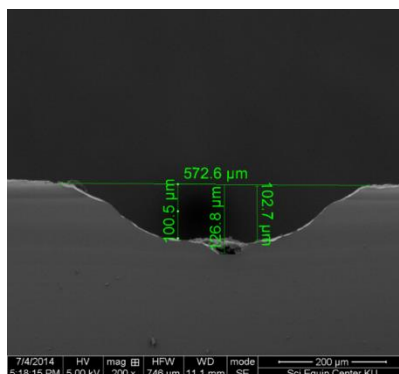
ทำการทดสอบการไหลโดยต่อเข้ากับแท่นประกบ PMMA และต่อช่อง reservoir ของชิ้นงาน PTFE เข้ากับท่อ PEEK ทำการไหลโดยฉีดน้ำผ่าน



รูปที่ 10 แสดงชิ้นงานช่องการไหลขนาดเล็กของ PTFE เมื่อประกบเป็นระบบ

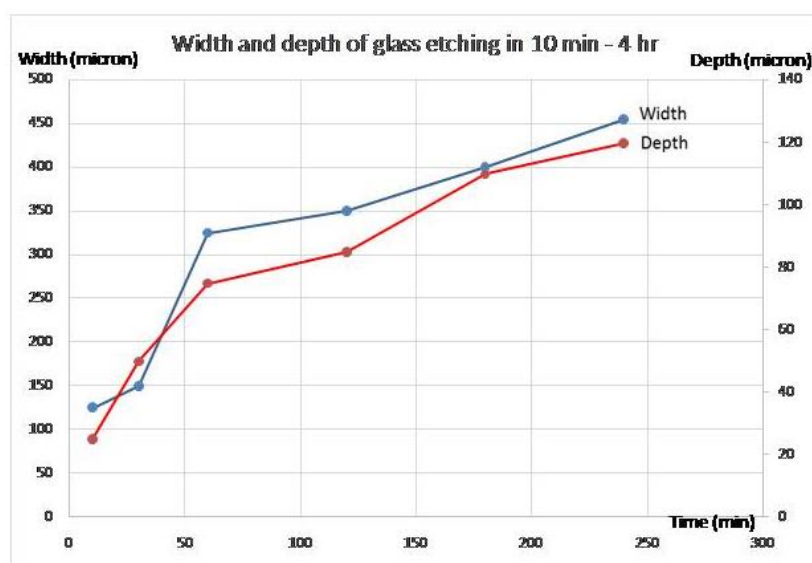
3.1.3 ผลการสร้างชิ้นงานของไหลขนาดเล็กจากกระจก

ผลการสร้างช่องการไหลบนแผ่นกระจกด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ของกรดไฮโดรฟลูออริก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความกว้างและความลึกของช่องขนาดเล็กที่สร้างขึ้นมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ลักษณะของช่องการไหลบนแผ่นกระจกด้วยวิธีการทางเคมี

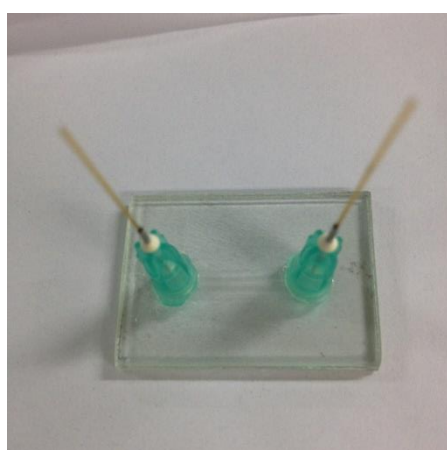
โดยความกว้างและความลึกของกระจกขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของกรดไฮโดรฟลูออริก ดังแสดงในกราฟ



รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้าง ความลึกและระยะเวลาในการกัดกระจกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของกรดไฮโดรฟลูออริก

การประกบกระจก ความสมบูรณ์ในการประกบกระจกขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ น้ำหนักที่กดทับต่อหน่วยพื้นที่ และระยะเวลาในการให้ความร้อน จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้งานคือ 650 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และตั้งการลดอุณหภูมิแบบช้าเพื่อป้องกันการหดตัวอย่างรวดเร็วของกระจก

ภายหลังจากการประกบกระจก จึงทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกา จากนั้นทำการต่อกับท่อคาพิลลารีและอุปกรณ์อื่นๆ เพื่อการทดสอบการไหลแสดงดังรูปที่ 13



(A)



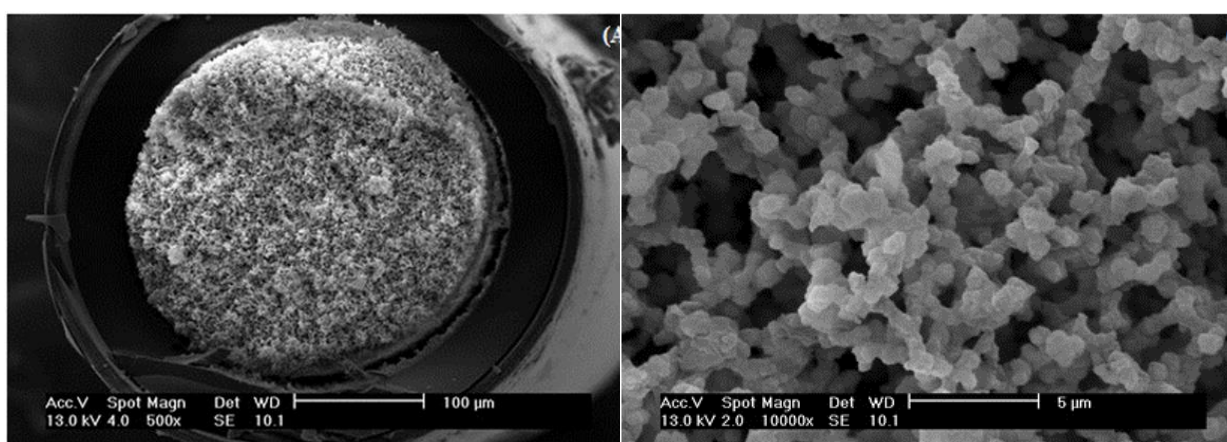
(B)

รูปที่ 13 ชิ้นงานช่องการไหลขนาดเล็กชนิดแก้ว (A) ก่อนและ (B) หลังการสังเคราะห์โมโนลิทภายในช่องการไหลขนาดเล็ก

3.2 ผลการสังเคราะห์โมโนลิท

3.2.1 ผลการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกา

เมื่อทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาในช่องการไหลของท่อคาพิลลารีขนาดเล็กด้วยวิธีการในข้อ 2.1.1 และนำไปตรวจสอบโครงสร้างพื้นฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ได้ผลดังรูปที่ 14 และ 15 พบว่าโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้เป็นโมโนลิทที่มีขนาดเม็ดทรงกลมต่อเนื่องที่ 1 ไมโครเมตรและมีรูพรุนขนาดใหญ่ (macropore) ที่ประมาณ 5 ไมโครเมตร เมื่อนำไปทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิสูงโดยการทำ thermal gravimetric analysis พบว่าสามารถทนทานได้ถึง 600 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการแตกของพันธะในโครงสร้างโมโนลิท



รูปที่ 14 ภาพโมโนลิทชนิดซิลิกาในท่อคาพิลลารี ขนาด 0.32 มิลลิเมตรเมื่อทำการส่องด้วย SEM

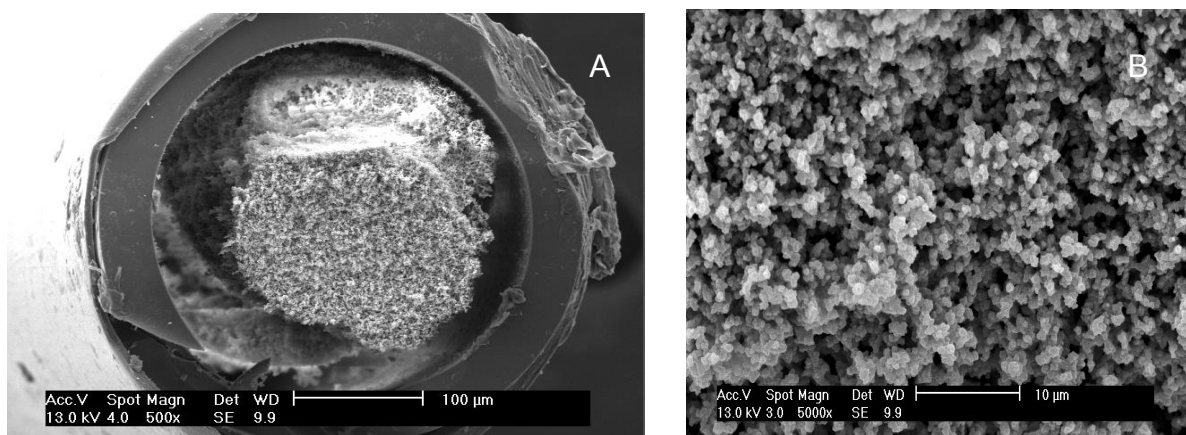
รูปที่ 15 โครงสร้างที่เป็นเม็ดทรงกลมต่อเนื่องของโมโนลิท ชนิดซิลิกาเมื่อทำการขยายภาพ

3.2.2 การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์

3.2.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกาโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8

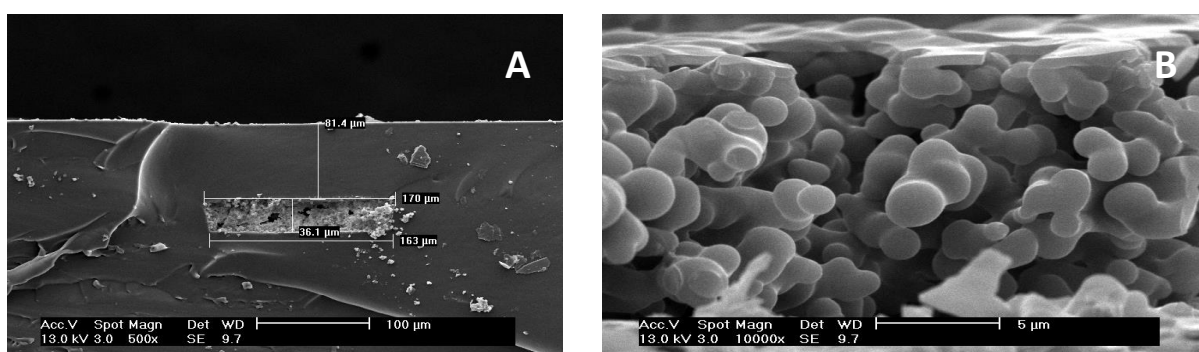
การสังเคราะห์ซิลิกาโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ในช่องการไหลของท่อคาพิลลารี

จากการสังเคราะห์ โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ขึ้นภายในช่องการไหลของท่อคาพิลลารี ด้วยสูตรและวิธีการดังกล่าวในข้อ 2.1.2 ข้างต้นเมื่อนำไปทดสอบเพื่อดูโครงสร้างของโมโนลิทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ได้ผลดังรูปที่ 16(A) พบว่าขนาดของอนุภาคโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 1-2 ไมโครเมตร และลักษณะโครงสร้างที่ได้มีการเชื่อมต่อกันอย่างต่อเนื่อง มีรูพรุนในปริมาณที่สูง และมีขนาดสม่ำเสมอ แต่ปัญหาที่เกิดจากการสังเคราะห์คือเกิดการหลุดตัวของโครงสร้างโมโนลิทอย่างมากเมื่อสังเคราะห์ในท่อคาพิลลารี ดังรูปที่ 1A เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้จาก Yan และคณะ (2006) พบว่ามีขนาดที่ใกล้เคียงกับการทดลองที่มีการตีพิมพ์ของ Yan และคณะ (2006) ซึ่งสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ได้มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร



รูปที่ 16 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของโมนอลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ที่สังเคราะห์ภายในท่อคาพิลลารี

การสังเคราะห์โมนอลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ในช่องการไหลของชิ้นงานระบบการไหลขนาดเล็ก เมื่อทำการสังเคราะห์โมนอลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ด้วยสูตรและวิธีการดังกล่าวในข้อ 2.1.2 ในช่องการไหลของชิ้นงานระบบการไหลขนาดเล็ก ซึ่งมีขนาดของช่องดังรูป 17A และนำไปหาขนาดของอนุภาคและโครงสร้างด้วย SEM พบว่าโมนอลิทที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะดังรูปที่ 17 พบว่าขนาดอนุภาคของโมนอลิทอยู่ในช่วง 2-3 ไมโครเมตรและลักษณะโครงสร้างที่ได้แตกต่างจากการสังเคราะห์โมนอลิทซิลิกาอินทรีย์ C8 ในท่อคาพิลลารีและโครงสร้างที่ได้ในช่องการไหลเป็นโครงสร้างที่มีรูพรุนน้อย โครงสร้างมีขนาดอนุภาคที่ไม่สม่ำเสมอ แตกต่างจากโครงสร้างของโมนอลิทในท่อคาพิลลารี



รูปที่ 17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของโมนอลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ที่สังเคราะห์ภายในช่องการไหลของระบบการไหลขนาดเล็ก

3.2.2.1 การสังเคราะห์ซิลิกาโมนอลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18

การสังเคราะห์โมนอลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ในเบื้องต้นมีความจำเป็นต้องทำการปรับเปลี่ยนสูตรและวิธีการสังเคราะห์ให้เหมาะสมเช่นเดียวกัน เนื่องจากปัญหาสำคัญที่พบจากการทดลองหลายครั้งคือสูตรการสังเคราะห์เดียวกันนี้ไม่สามารถใช้ได้กับภาชนะบรรจุทุกรูปแบบ ตัวอย่างเช่นโมนอลิทที่สังเคราะห์ในภาชนะหลอดปิดขนาดเล็ก (eppendorf) จะไม่สามารถนำมาใช้ได้เมื่อนำมาสังเคราะห์ใส่ในท่อคาพิลลารี หรือในช่องการไหลขนาดเล็ก นอกจากนี้ในระหว่างการหากระบวนการสังเคราะห์ปัญหาที่มักเกิดขึ้น

คือการแตกหักและการเกิดช่องว่างระหว่างโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้และภาชนะบรรจุ ปัญหาดังกล่าวลดลงเมื่อภาชนะบรรจุมีขนาดเล็กลงเช่นท่อคาพิลลารีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 320 ไมครอน แต่เนื่องจากโมโนลิทที่สังเคราะห์นี้ต้องการนำไปใช้ในด้านการศึกษาสารปนเปื้อนจากน้ำ ดังนั้นจึงต้องใช้ภาชนะที่ใหญ่ขึ้น โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่บรรจุในหลอดดูดพลาสติก polypropylene ขนาดเล็กโดยใช้เทคนิค sol-gel

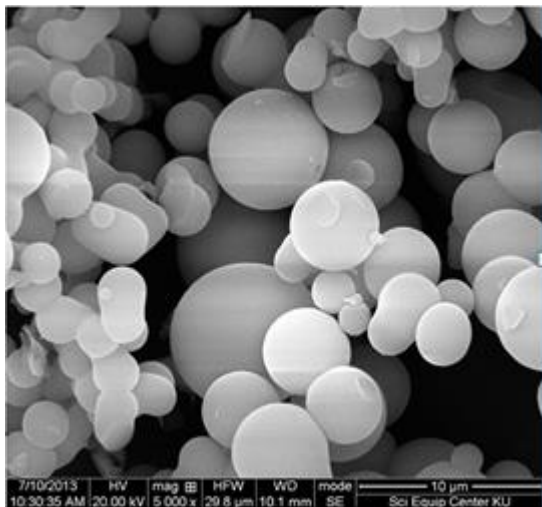
เทคนิคการทำ sol-gel เป็นการผสมระหว่างเฟส 2 เฟสที่แตกต่างกันคือของเหลวเฟสที่มีขี้ผึ้งและของเหลวเฟสที่ไม่มีขี้ผึ้ง เมื่อสองเฟสผสมกันแล้วจะเกิดของเหลวขุ่นที่เรียกว่า emulsion ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเฟสที่ไม่มีขี้ผึ้งจะเริ่มมีการแข็งตัวและปล่อยเฟสที่มีขี้ผึ้งให้หลุดออกจากระบบที่แข็งตัวนั้น ของแข็งที่เกิดขึ้นจึงมีลักษณะที่เป็นรูพรุน ในการทดลองจึงต้องมีพิจารณาสารที่ใช้ในของเหลวทั้ง 2 เฟสนั้น ในเฟสของเหลวที่มีขี้ผึ้งจึงเลือก เมทานอล กรดไฮโดรคลอริกและน้ำปราศจากไอออน ส่วนเฟสของเหลวที่ไม่มีขี้ผึ้งจึงได้เลือก TMOS and C18-TMOS การสังเคราะห์เพื่อให้ได้ขนาดของเม็ดที่เล็กและมีความสม่ำเสมอ จึงได้ทำการสังเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอน โดย

ขั้นตอนที่ 1 ทำการสังเคราะห์คลัสเตอร์ของโมโนลิท (monolithic cluster) ใน polypropylene centrifuge tube โดยมีสูตรการสังเคราะห์ที่เหมาะสมคือส่วนผสมของเมทานอล กรดไฮโดรคลอริก 0.5 M 0.7 มิลลิลิตร tetraethoxysilane (TEOS) 3.2 มิลลิลิตร และ C18-TEOS 0.8 ไมโครลิตร ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในหลอด centrifuge ปิดปากหลอดให้สนิท เนื่องจาก C18-TEOS และ TEOS มีพื้นฐานเดียวกันคือ TEOS ดังนั้นอัตราส่วนระหว่าง C18-TEOS และ TEOS จึงเป็นปัจจัยในการควบคุมปริมาณค่า carbon loading ของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18

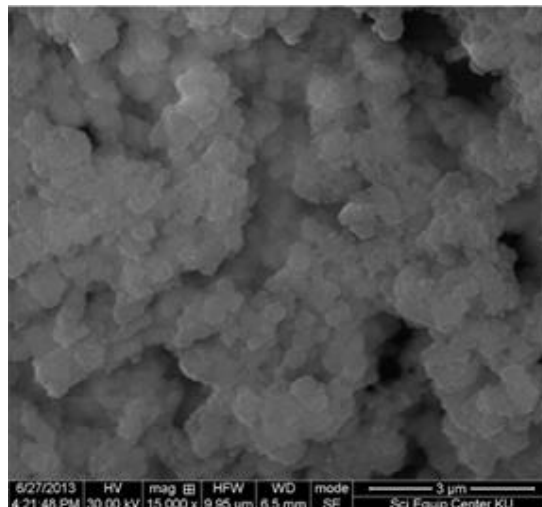
ส่วนที่สำคัญที่สุดคือการปรับอัตราส่วนระหว่างปริมาณเฟสของเหลวที่มีและไม่มีขี้ผึ้ง โดยมีเมทานอลทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายช่วยในการลดความแตกต่างของขี้ผึ้งระหว่างสองเฟส เมทานอลที่เติมควรมีปริมาณที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนทั้งสองเฟสซึ่งส่งผลถึงคุณลักษณะเฉพาะของโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้ ถ้าเติมเมทานอลต่ำกว่าค่าปริมาตรที่เหมาะสมจะทำให้ความแตกต่างของขี้ผึ้งระหว่างสองเฟสสูง ตามที่กล่าวข้างต้นว่าในระหว่างการผสมจะเกิด emulsion ซึ่งคือหยดน้ำมันเล็กๆ แขนงลอยอยู่ในเฟสที่มีขี้ผึ้ง เมื่อความแตกต่างระหว่างสองเฟสสูงหยดน้ำมันเล็กๆ ซึ่งคือเฟสของเหลวที่ไม่มีขี้ผึ้งจะเกิดการรวมตัวกัน ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นในตอนท้ายคือขนาดเม็ดของโมโนลิทมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 18(A)) หรือในกรณีที่แย่ที่สุดคือเฟสของเหลวทั้งสองเกิดการแยกกันอย่างสมบูรณ์ ทำให้การทดลองล้มเหลวไม่เกิดโครงสร้างของแข็งโมโนลิท

ในทางตรงกันข้าม ถ้าปริมาตรของเมทานอลสูงกว่าปริมาตรที่เหมาะสม ความแตกต่างระหว่างขี้ผึ้งของเฟสของเหลวทั้งสองน้อย แรงผลักดันระหว่างเฟสทั้งสองไม่มากพอที่จะทำให้หยดน้ำมันเล็กๆ ที่แขวนลอยอยู่คงความเป็นทรงกลมได้ ผลลัพธ์คือโครงสร้างที่เกิดขึ้นเป็นโมโนลิทโครงแข็งที่ไม่มีเป็นเม็ดทรงกลมต่อเนื่อง ซึ่งจะเป็นรูปร่างใดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาตรของเมทานอล ยิ่งไปกว่านั้นถ้าเพิ่มปริมาตรของเมทานอลต่อไปอีกจะทำให้เกิดโมโนลิทที่เป็นแผ่นบางซ้อนกันคล้ายใบไม้ซ้อนกัน ในกรณีที่แย่ที่สุดคือเฟสของเหลวที่ไม่มีขี้ผึ้งกระจายทั่วไปในของเหลวผสมจนของผสมเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นคือโครงสร้างโมโน

ลิทที่เกิดขึ้นเกือบจะไม่มีรูพรุน (รูปที่ 18(B)) แต่อย่างไรก็ตามถ้าต้องการทราบความแตกต่างสามารถดูโดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)



(A)



(B)

รูปที่ 18 ภาพโครงสร้างโมโนลิทที่เกิดขึ้นเมื่อปริมาตรของเมทานอลที่เติมน้อยกว่า (A) และมากกว่า (B) ปริมาตรที่เหมาะสม

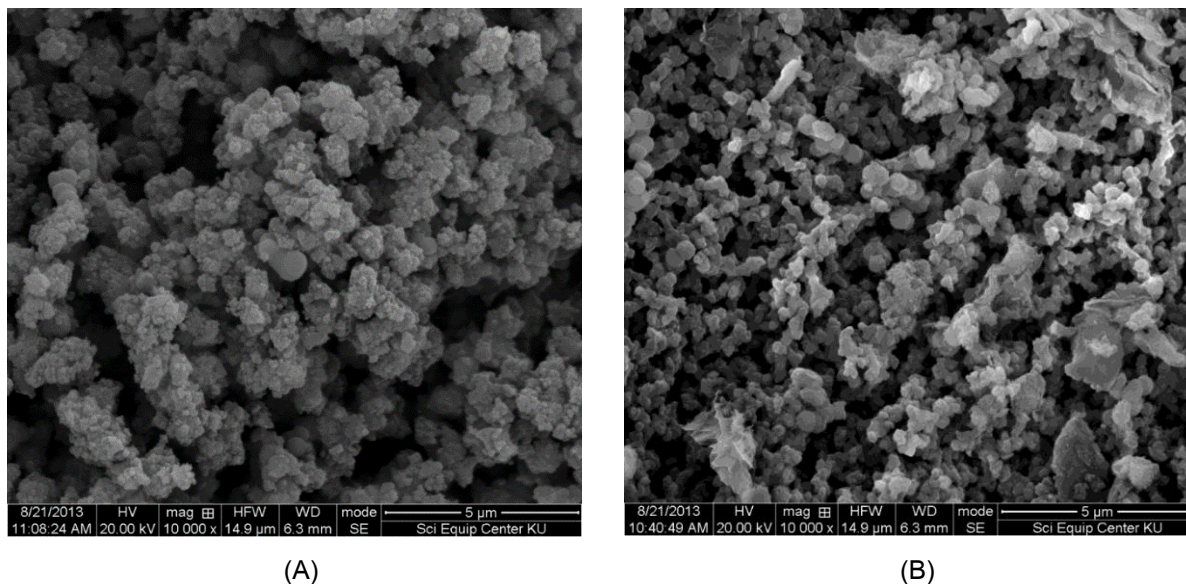
พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้มีค่าอัตราส่วน 1:1 หรือในการทดลองนี้ใช้เมทานอล 4.0 มิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิและแรงที่ใช้ในการปั่นผสมก็มีความสำคัญอย่างมากในการสังเคราะห์โมโนลิท

หลังจากผสมสารทุกตัวแล้ว จึงนำหลอดภาชนะไปอบที่ 60 องศาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ hydrolysis และ condensation ด้วยกรดและความร้อนทำให้เกิดเป็นกลุ่มที่แพร่กระจายของคอลลอยด์ในของเหลวผสมนั้น ยิ่งปริมาณของคอลลอยด์มากยิ่งทำให้การกระจายของขนาดเม็ดของโมโนลิทดี แต่อย่างไรก็ตามในการสังเคราะห์โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ต้องระวังในการเกิดคอลลอยด์ที่มีความหนาแน่นสูงที่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทำให้เกิดโครงร่างโมโนลิทอย่างรวดเร็ว เพราะในปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดโครงร่างโมโนลิทอย่างรวดเร็วเกินไป เมื่อค่อยๆ เติมน-dodecylamine 0.1 มิลลิลิตรเป็นตัวเร่งลงไปผิวของของเหลวผสม จะเกิดการปกคลุมด้วยของแข็ง ทำให้หยดของ n-dodecylamine ถัดมาไม่สามารถกระจายตัวผ่านลงไปในพื้นที่ล่างของของเหลวผสม ผลที่ได้คือเกิดเป็นชั้นของของแข็งที่ผิวของของเหลวผสม นอกจากนี้ยังมีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะอื่นๆ ของโมโนลิทเช่น ความชุ่มหรือใสของเม็ดของแข็ง ความเป็นรูพรุนของโมโนลิทอีกด้วย จากนั้นนำไปอบต่อที่ 40 องศาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงทำให้เย็นลง

เมื่อได้ของแข็งโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ แล้ว จึงนำของแข็งโมโนลิทไปแตกและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้ได้คลัสเตอร์ของโมโนลิท ซึ่งคลัสเตอร์นี้เองที่ระบุขนาดโครงขนาดใหญ่โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 จากนั้นทำการสังเคราะห์ซ้ำด้วยเทคนิค sol-gel เช่นเดียวกันในขั้นตอนที่ 2

ขั้นตอนที่ 2 ซังคลัสเตอร์ของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ที่บดแล้วจำนวน 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฉีดยา polypropylene ที่มี glass wool อุดไว้ที่ปลายหลอด เพื่อป้องกันการหลุดร่วงของคลัสเตอร์ของโมโนลิท นำหลอดฉีดยานี้ไปต่อเข้ากับชุดเครื่อง solid phase extraction ซึ่งต่อกับปั๊มเพื่อใช้ในการดูดสาร ผสมของ สูตรการสังเคราะห์ที่ 2 ที่มีเมทานอล 400 ไมโครลิตร กรดไฮโดรคลอริก 0.5 M 20 ไมโครลิตร น้ำ 20 ไมโครลิตร C18-TEOS 20 ไมโครลิตร และ TEOS 180 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันในหลอดปิดขนาดเล็ก นำหลอดปิดนั้นไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เทของเหลวนี้ลงในหลอดฉีดยาที่บรรจุโมโนลิท จากนั้นเติม n-dodecylamine ลงไปจำนวน 10 ไมโครลิตร เพื่อให้เกิดการแข็งตัว ภายหลังการสังเคราะห์ในขั้นตอนนี้คลัสเตอร์จากขั้นตอนแรกจะเกิดการเชื่อมต่อกันด้วยของแข็ง อัตราส่วนระหว่างปริมาณของคลัสเตอร์ และของเหลวที่เติมลงไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นที่ 2 ขึ้นอยู่กับขนาดของคลัสเตอร์ ถ้าปริมาตรของเหลวมากเกินไปจะเกิดการอุดตันจับตัวกันแน่นของคลัสเตอร์ของโมโนลิท แต่ถ้าน้อยเกินไปจะไม่เกิดของแข็งเชื่อมต่อกันระหว่างคลัสเตอร์ทำให้เกิดการแตกออกได้ง่าย

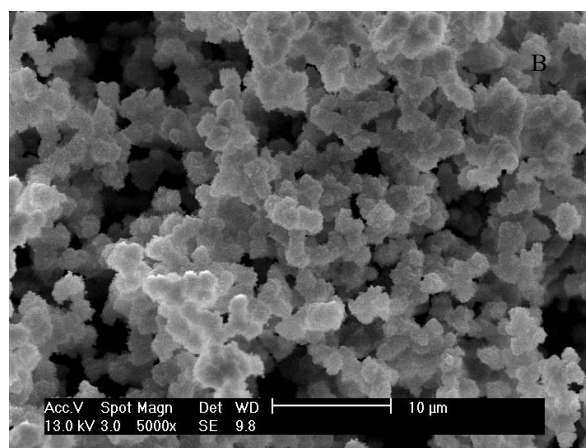
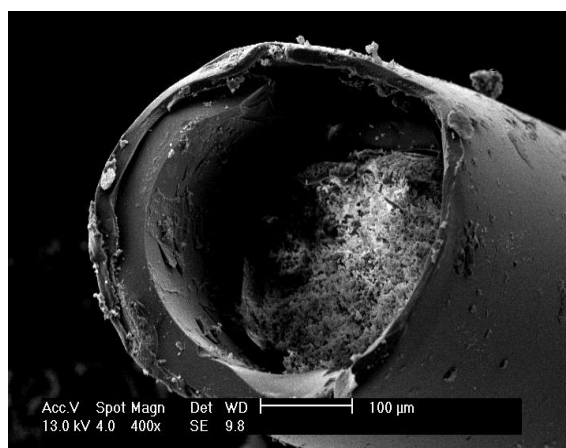
โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่ได้นี้เมื่อนำไปตรวจสอบโครงสร้างพื้นฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ได้ผลดังรูปที่ 19 พบว่าโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้เป็นโมโนลิทที่มีขนาดเม็ดทรงกลมต่อเนื่องที่มีขนาด 0.25 ไมโครเมตรหรือ 250 นาโนเมตร และมีรูพรุนขนาดใหญ่ (macropore) ที่ประมาณ 2 ไมโครเมตร เรียกว่าอยู่ในระดับขนาดนาโน ดังนั้นจึงจัดได้ว่าเป็นโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่มีขนาดเล็กที่สุดที่ยังไม่มีการบันทึกในรายงาน นอกจากนี้แล้วยังเห็นได้ชัดว่าไม่เกิดการแตกตัวและไม่มีความว่างระหว่างโมโนลิทและภาชนะบรรจุ



รูปที่ 19 โครงสร้างโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 (A) ก่อนและ (B) หลังผ่านกระบวนการสังเคราะห์อีกครั้ง

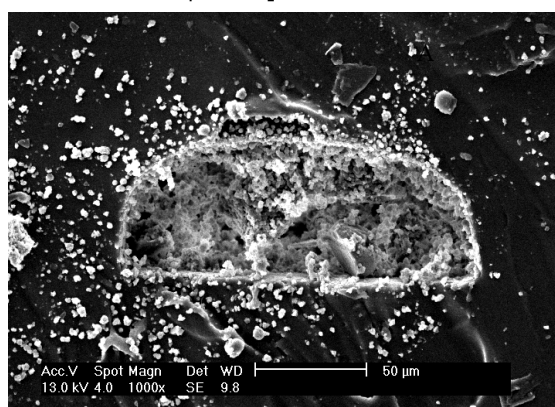
การสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ผลการสังเคราะห์โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ด้วยสูตรและวิธีการดังกล่าวในข้อ 2.1.2 เมื่อนำไปทดสอบเพื่อดูโครงสร้างของโมโนลิทที่สังเคราะห์ขึ้น

ภายในท่อคาพิลลารีโดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ได้ผลดังรูปที่ 21 พบว่าโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์ได้โดยวิธี sol-gel ได้โมโนลิทที่มีลักษณะเป็นโครงสร้างต่อเนื่องขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 2-3 ไมโครเมตร โครงสร้างที่ได้มีลักษณะการเกาะกลุ่มแบบหลวม มีช่องว่างระหว่างกลุ่มโครงสร้างสูง



รูปที่ 20 แสดงภาพถ่ายจากเครื่อง SEM ของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์ภายในท่อคาพิลลารี

ในภาพถ่าย SEM ของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ในช่องการไหลของระบบการไหลขนาดเล็ก ดังรูปที่ 21 พบว่ารูปร่างของภาพตัดขวางของช่องการไหลในระบบการไหลขนาดเล็ก PDMS แสดงดังรูปที่ 21(A) และที่กำลังขยายที่สูงขึ้นเพื่อดูโครงสร้างของโมโนลิทภายในช่องการไหล พบว่าโครงสร้างของโมโนลิทแตกต่างจากในท่อคาพิลลารี และโครงสร้างมีการเกาะกลุ่มหนาแน่นมาก ขนาดรูพรุนระหว่างโครงสร้างน้อย และขนาดของอนุภาคอยู่ที่ประมาณ 2-3 ไมโครเมตร (รูปที่ 21(B))



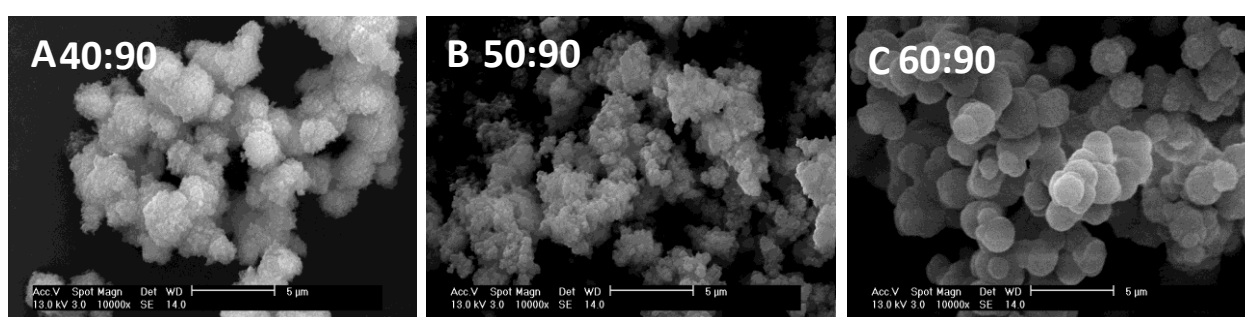
รูปที่ 21 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์ภายในช่องของระบบการไหลขนาดเล็กที่ทำจาก PDMS

จากการสังเคราะห์โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 เพื่อให้มีขนาดเล็กเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการแยกและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกที่ดี จึงได้ทดลองปรับสัดส่วนระหว่างสารตั้งต้น 2 ชนิดคือสัดส่วน

ระหว่าง C18-TMOS ต่อ TMOS ดังตารางที่ 3 โดยให้สัดส่วนของสารเคมีอื่นๆ ในการสังเคราะห์ที่มีปริมาตรคงที่

ตารางที่ 3 สัดส่วนระหว่าง C18-TMOS/TMOS ในการสังเคราะห์โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18

สูตร	A	B	C
C18-TMOS (ul)	40	50	60
TMOS (ul)	90	90	90
C18-TMOS/TMOS Ratio	0.44	0.56	0.67



รูปที่ 22 ภาพถ่ายจาก SEM ของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์โดยปรับสัดส่วนของ C18-TMOS/TMOS อัตราส่วน 40:90 (A), 50:90 (B), และ 60:90 (C)

จากรูปที่ 22 พบว่าการเพิ่มปริมาณ C18-TMOS ทำให้นาด ลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของโมโนลิทแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยที่ปริมาตรของ C18-TMOSเท่ากับ 60 ไมโครลิตร โมโนลิทมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ที่สุดและโครงสร้างเกาะกันแน่น แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วนปริมาตรที่ได้ในทุกขนาดของโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้ยังมีการหดตัวที่สูง

3.2.3 ผลการสังเคราะห์โมโนลิทพอลิเมอร์ชนิดพอลิไดไวนิลเบนซีนไวนิลไพโรลิโดน

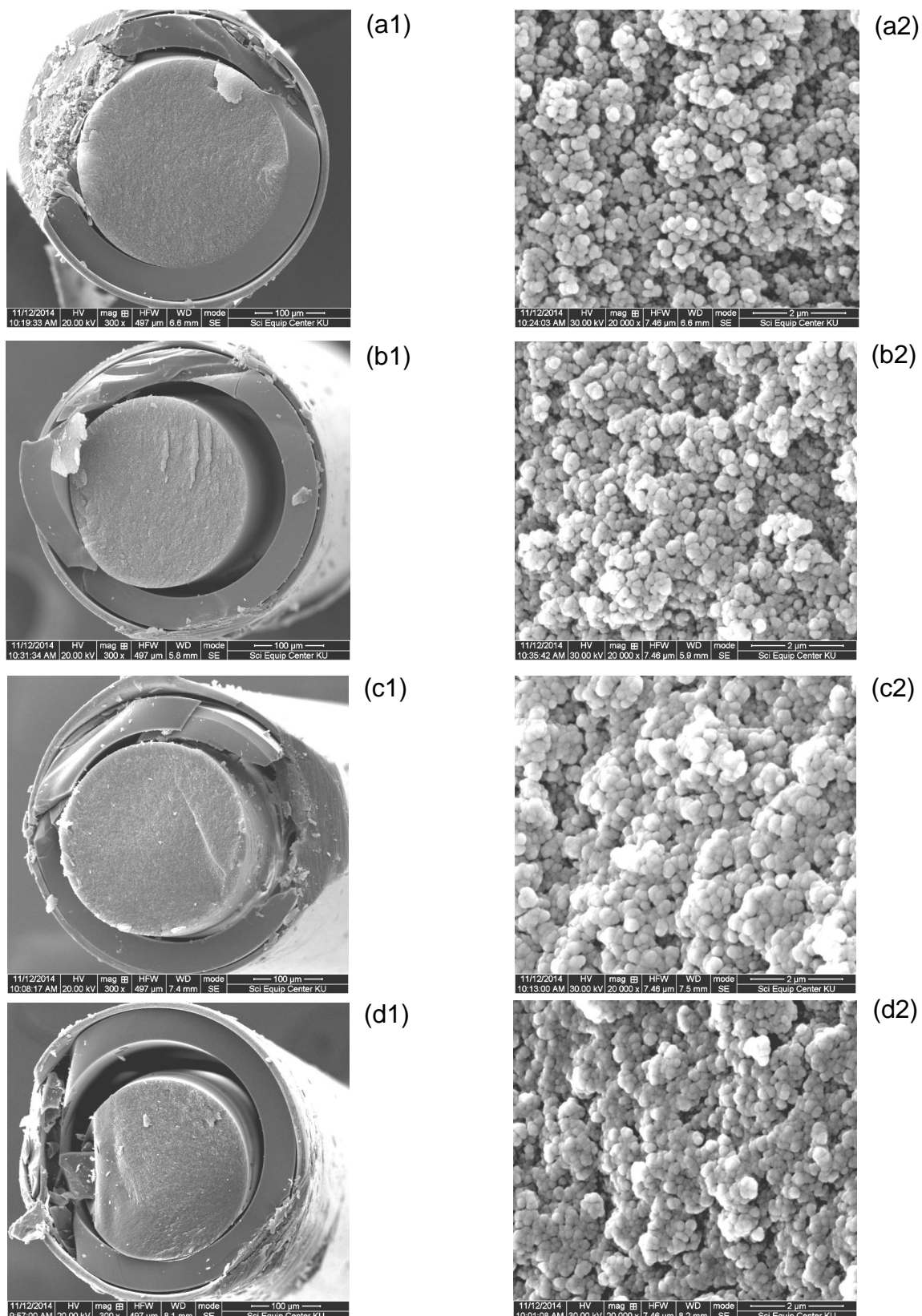
เมื่อทดสอบการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดพอลิไดไวนิลเบนซีนไวนิลไพโรลิโดน (poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)) ในท่อแก้วคาพิลลารี โดยสารละลายที่ใช้ในการเตรียมนี้เกิดจากการผสมระหว่าง dibenzoyl peroxide, 1-vinyl-2-pyrrolidone, divinylbenzene, dodecanol และ cyclohexanol ซึ่งได้ปรับเปลี่ยนมาจากสูตรที่รายงานโดย Huang (Huang et al., 2009) ซึ่งสังเคราะห์โมโนลิทดังกล่าวเคลือบบนแท่งแม่เหล็กสำหรับการปั่นเพื่อการสกัด (stir bar sorptive extraction) แต่อย่างไรก็ตามในการเริ่มต้นการสังเคราะห์นี้เนื่องจากในสูตรดั้งเดิมของ Huang มีการใช้ azobisisobutyronitrile (AIBN) ในการเป็นสารเริ่มต้น แต่เนื่องจากไม่สามารถนำสารดังกล่าวเข้าประเทศได้จึงได้มีการปรับเปลี่ยนสูตรเป็น dibenzoyl peroxide สำหรับทุกๆ สูตรการสังเคราะห์ การปรับเปลี่ยนสูตรต่างๆ แสดงดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สูตรการสังเคราะห์โมโนลิทที่ปรับเปลี่ยนจากสูตรของ Huang

สูตร	ส่วนผสมของ monomer (% โดยน้ำหนัก)		ส่วนผสมในการทำพอลิเมอร์ (% โดยน้ำหนัก)	
	Divinylbenzene	1-vinyl-2 pyrrolidone	ส่วนผสมของ monomer	Porogen
1	90	10	30	70
2	85	15	30	70
3	80	20	30	70
4	75	25	30	70
5	70	30	30	70
6	65	35	30	70
7	85	15	25	75
8	85	15	35	65
9	85	15	40	60
10	85	15	45	55
11	85	15	50	50

ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากสูตรที่ 1 5 และ 9 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่ามีการสร้างสัณฐานคล้ายคลึงกันดังรูปที่ 23 โดยมีรูพรุนขนาดเล็กที่ผิวบนเม็ดที่ต่อเชื่อมโยงกัน และมีโพรงเป็นรูขนาดใหญ่ต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าให้ของเหลวไหลผ่านได้โดยยาก ผลผลิตที่ได้จากสูตรอื่นให้โครงสร้างที่แน่นหนากว่าจึงทำให้เกิดการอุดตันในท่อแก้วคาพิลลารี และยังทำให้เกิดการหดตัวอย่างมาก

โดยรวมแล้วผลการสังเคราะห์โมโนลิทที่ได้จากการปรับเปลี่ยนสูตรของ Huang มีโครงร่างที่หนาแน่น ซึ่งเนื่องมาจากอัตราส่วนของ divinylbenzene ที่สูงดังแสดงในสูตรที่ 1 ถึงสูตรที่ 11 ของตารางที่ 4 โครงสร้างดังกล่าวไม่เหมาะนำมาใช้ในการประยุกต์ใช้งานในครั้งนี้ จึงจำเป็นต้องทำการปรับสูตรโครงสร้างใหม่ให้เหมาะสม เพื่อให้สะดวกต่อการทำการปรับเปลี่ยนสูตร ร้อยละโดยน้ำหนักจึงได้ถูกเปลี่ยนเป็นร้อยละโดยปริมาตร และได้ทำการทดลองโดยมีลำดับสูตรที่ได้มีการปรับเปลี่ยนไปแสดงดังในตารางที่ 5 โดยมีการเพิ่ม dibenzoyl peroxide ขึ้นจากเดิมเป็น 8 มิลลิลิตรมิกวเว้นในสูตรที่ 20 ซึ่งใช้ dibenzoyl peroxide เพียง 4 มิลลิลิตรเพื่อดูผลของสารเริ่มต้นที่มีต่อโครงสร้างของผลิตภัณฑ์



รูปที่ 23 ภาพจากอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของวัสดุโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์จากสูตรที่ 1 (a1 และ a2) สูตรที่ 5 (b1 และ b2) สูตรที่ 9 (c1 และ c2) และสูตรที่ 11 (d1 และ d2)

ตารางที่ 5 การปรับเปลี่ยนสูตรของการสังเคราะห์โมโนลิท

สูตร	Divinylbenzene (μL)	1-vinyl-2 pyrrolidone (μL)	Cyclohexanol (μL)	Dodecanol (μL)
12	324	18	378	42
13	162	36	378	42
14	162	18	756	42
15	162	18	378	84
16	24	18	378	84
17	162	206	190	42
18	80	70	300	150
19	80	10	300	210
20	162	18	378	42
21	80	20	300	200
22	50	50	300	200
23	50	50	250	250
24	20	80	200	300
25	10	80	210	300
26	50	50	200	200
27	10	50	200	140
28	45	45	310	200

เมื่อได้มีการปรับเปลี่ยนจากสูตรที่ 1 เป็นสูตรที่ 12 จนถึงสูตรที่ 15 โดยมีการเติมสารตั้งต้นแต่ละตัวลงไป 2 เท่า การเพิ่มมอนอเมอร์เช่น divinylbenzene ในสูตรที่ 12 และ 1-vinyl-2 pyrrolidone ในสูตรที่ 13 ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กมากและรูพรุนขนาดเล็กซึ่งทำให้เกิดการอุดตันในท่อคาพิลลารี การเพิ่มตัวทำละลายที่เป็นสารทำให้เกิดรูพรุนหรือ porogen เช่น cyclohexanol และ dodecanol ทำให้โมโนลิทที่เกิดการหดตัวมากขึ้นดังแสดงในสูตรที่ 14 และ 15 จนแยกและหลุดออกมาจากผนังของท่อคาพิลลารีเมื่อมีการล้างด้วยเมทานอล ในสูตรที่ 16 มีการลด divinylbenzene เพื่อลดความมีขี้ของโมโนลิทโดยเพิ่ม dodecanol เพื่อคงอัตราส่วนของความมีขี้ในสารละลายและเพื่อป้องกันการอุดตันของโมโนลิท แต่ผลผลิตโมโนลิทที่ได้ยังคงหดตัว ดังนั้นในสูตรที่ 17 จึงเพิ่ม 1-vinyl-2-pyrrolidone เพื่อให้ความมีขี้ของโมโนลิทเพิ่มขึ้น แต่โมโนลิทที่ได้ก็ยังคงอุดตันภายในท่อคาพิลลารี เช่นเดียวกับการเพิ่มทั้ง 1-vinyl-2-pyrrolidone และ dodecanol พร้อมกันแต่ลด divinylbenzene ลงในสูตรที่ 18 วัสดุที่ได้เกิดการอุดตัน ส่วนในสูตรที่ 19 ได้มีการปรับเพื่อลดมอนอเมอร์ลงทำให้เกิดวัสดุที่ได้มีโครงสร้างที่สมบูรณ์และไม่มีการหดตัว แต่อย่างไรก็ตามมีการปรับเปลี่ยนสูตรต่อไปใน

สูตรที่ 20 เพื่อสังเกตผลของสารตั้งต้น initiator โดยใช้เพียง 4 มิลลิกรัมโดยคงอัตราส่วนของมอนอเมอร์และตัวทำละลายที่ทำให้เกิดรูพรุนเช่นเดียวกับสูตรที่ 1 แต่ผลที่ได้คือเกิดการอุดตันของโมโนลิท

เนื่องจากในการทดลองจะนำวัสดุที่สังเคราะห์ได้ไปทำการประยุกต์ใช้ในการดูดซับสารอันตรายที่ มีขั้วจึงจำเป็นต้องเพิ่มความมีขั้วของวัสดุโมโนลิทที่ใช้ในการสกัด สูตรที่ 19 จึงมีการปรับเปลี่ยนอีกครั้งเพื่อเพิ่มสารมอนอเมอร์ที่มีขั้วดังแสดงในสูตรที่ 21-28 แต่อย่างไรก็ตามผลการสังเคราะห์ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากโมโนลิทยังคงเกิดการอุดตันและหลุดตัวในท่อคาพิลลารี นอกจากนี้ยังไม่เกิดพอลิเมอร์ขึ้นเมื่อเปลี่ยนสูตรไปตามสูตรที่ 24 และ 25 เนื่องจากปริมาณของ divinylbenzene ที่เป็นสารตั้งต้นหลักในการเกิดเป็นพอลิเมอร์ที่ลดลงมากเกินไป ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าสูตรที่ 19 มีความเหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์วัสดุโมโนลิทเป้าหมาย เป็นที่สังเกตว่าในบรรดาสูตรต่างๆ อัตราส่วนของ 1-vinyl-2-pyrrolidone ในสูตรที่ 19 น้อยที่สุดและมีอัตราส่วนมอนอเมอร์ผสมต่ำที่สุด โครงสร้างหลักที่ได้จึงเป็น polydivinylbenzene นอกเหนือจากส่วนผสมของสารที่ทำให้เกิดรูพรุน ภายหลังการล้างและทำให้แห้ง อัตราส่วนของ polydivinylbenzene และ polyvinylpyrrolidone ในโครงสร้างโมโนลิทเมื่อประมาณการแล้วอยู่ที่ 88:12 เมื่อความหนาแน่นของ polydivinylbenzene และ polyvinylpyrrolidone เท่ากับ 0.93 และ 1.043 ตามลำดับ

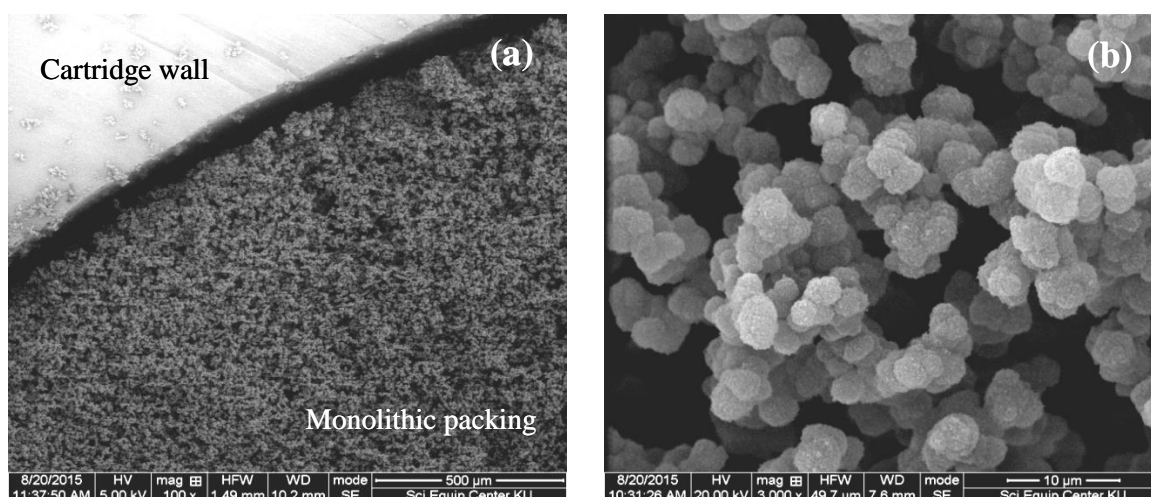
การสังเคราะห์โมโนลิทชนิด poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) นั้นมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น 3 กระบวนการ ในขั้นเริ่มต้นจะเกิดการสลายตัวของ dibenzoyl peroxide และเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระหรือ free radical ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นของปฏิกิริยา จากนั้นอนุมูลอิสระนั้นจะทำปฏิกิริยากับ divinylbenzene และ vinylpyrrolidone ซึ่งเป็นมอนอเมอร์ที่ตำแหน่งพันธะคู่ในขั้นตอนการแผ่พอลิเมอร์ (propagation) และพันธะจะถูกสร้างต่อเนื่องไปเรื่อยๆ เพื่อเกิดเป็นพอลิเมอร์ในขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นโครงสร้างพอลิเมอร์เกิดการควบแน่นด้วยตัวเองเกิดเป็นเม็ดที่ต่อเนื่องกันซึ่งแยกออกมาจาก cyclohexanol และ dodecanol ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของปฏิกิริยา การให้ความร้อนที่ 70 องศาจึงเป็นการทำให้สารเริ่มต้นสลายตัวและเกิดขั้นตอนการสร้างพอลิเมอร์ ที่อุณหภูมินี้ cyclohexanol และ dodecanol ที่ใช้เป็นสารทำให้เกิดรูพรุนด้วยจะเกิดการระเหยออกไปทำให้เกิดช่องว่างที่เรียกว่า macropore

ขณะที่มีการปรับสภาวะของการสังเคราะห์เพื่อให้เหมาะสมต่อสารละลายผสมของแต่ละสูตรก่อนการเทลงในหลอดฉีดยาพบว่าในระหว่างการผลิตโดยใช้เครื่องผสม vortex mixer เกิดฟองอากาศขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการแตกของโมโนลิทในหลอดในภายหลัง จึงแก้ไขปัญหาโดยใช้ ultrasonic bath เพื่อลดฟองอากาศ ทำให้สามารถลดการแตกของโมโนลิทลงได้

ในการทำงานนี้ช่วงเวลาที่ให้ของการเกิดโครงสร้างพอลิเมอร์ของแต่ละ batch คือ 12 ชั่วโมง แต่สำหรับการทำให้ batch ใหญ่เกิดความสมบูรณ์จึงได้ขยายระยะเวลาออกไปเป็น 24 ชั่วโมง และเมื่อได้ขยายระยะเวลาการทำให้เกิดโครงสร้างพอลิเมอร์ออกไปเป็น 24 ชั่วโมงแล้ว จึงได้ทดลองลดระยะเวลาปฏิกิริยาการ

สังเคราะห์เป็น 12 ชั่วโมงแต่อย่างไรก็ตามพบว่าผลผลิตที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ซึ่งเกิดเป็นเพียงส่วนผสมที่เป็นของเหลวขุ่น ดังนั้นเวลาของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่ดีที่สุดจึงเป็น 24 ชั่วโมง

โครงร่างของโมโนลิทชนิด poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) ที่สังเคราะห์ได้จากสูตรที่ 19 เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแล้วพบว่าแสดงดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของโมโนลิทชนิด poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) (a) ในหลอดฉีดยา และ (b) ภาพขยายที่แสดงโครงสร้างโมโนลิทที่เป็นเม็ดทรงกลมต่อเนื่อง

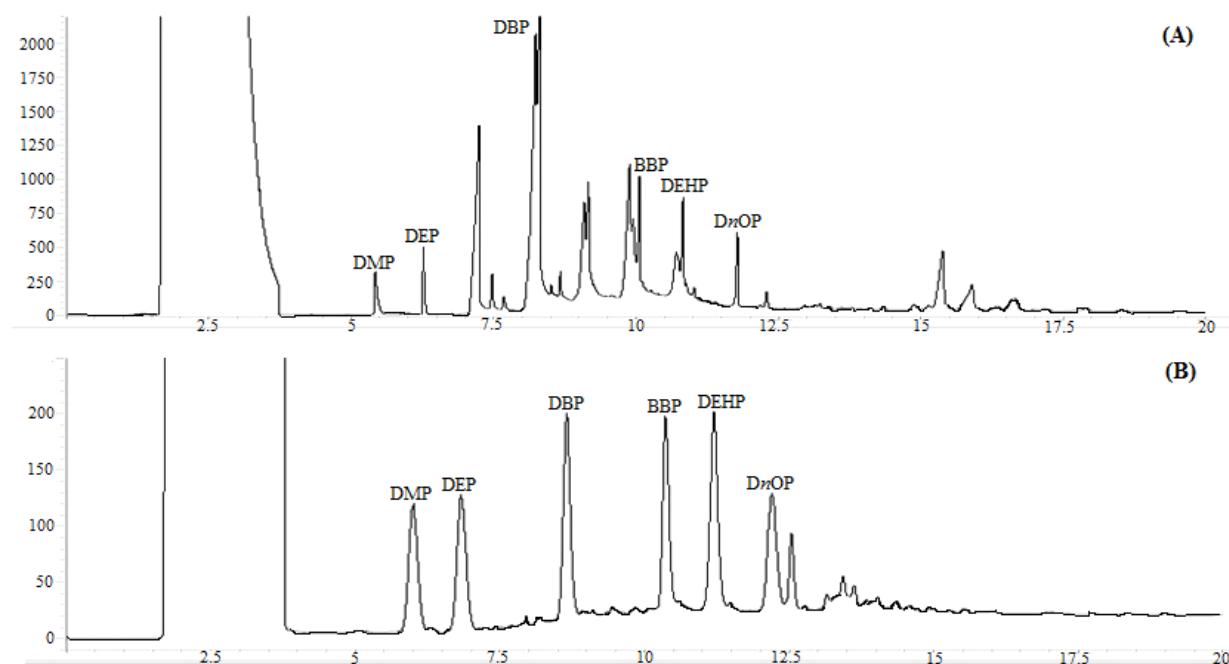
จากรูปที่ 24 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงถึงว่าไม่มีช่องว่างระหว่างโมโนลิทชนิด poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) และผนังของหลอดฉีดยา และวัสดุที่สังเคราะห์ได้นี้มีโครงสร้างที่ต่อเนื่องกันโดยมีรูพรุนขนาดใหญ่ ยืนยันถึงความเป็นวัสดุโมโนลิทที่มีเม็ดทรงกลมเล็กต่อเนื่องกันที่มีขนาดเม็ดประมาณ 2.8 ไมครอนและมีขนาด macropore ประมาณ 12 ไมครอน

4. การประยุกต์ใช้งานและการศึกษาทางโครมาโทกราฟี

4.1 การประยุกต์ใช้งานโมโนลิทชนิดซิลิกาในการดูดซับ

เมื่อได้ทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาในท่อการไหลขนาดเล็กแบบคาพิลลารี และได้นำมาทดสอบการดูดซับสารในตระกูลทาเลต (phthalate) อันได้แก่ dimethylphthalate (DMP), diethylphthalate (DEP), dibutylphthalate (DBP), butylbenzylphthalate (BBP), diethylhexylphthalate (DEHP) และ di-n-octyl phthalate (DnOP) ซึ่งเป็นสารที่ก่อมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม พบว่ามีความสามารถในการดูดซับและเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นก็สามารถคายการดูดซับได้ดี ดังนั้นจึงได้นำโมโนลิทชนิดซิลิกาที่สังเคราะห์ในท่อคาพิลลารีมาทำการทดสอบกับคอลัมน์ 5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane ประเมินหาความร้อนได้สูงหรือที่ในทาง

การคำที่ใช้ในงานนี้คือ ZB5-HT ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนา 0.25 ไมครอน และนำไปใช้ในการดักจับไขมันและสารอื่นๆ ซึ่งเป็นเมทริกซ์ปนเปื้อน (matrix) ที่สกัดจากหอยสองฝา และทำการวิเคราะห์สารในกลุ่มทาเลตในหอยสองฝา พบว่าโมโนลิทชนิดซิลิกาที่สังเคราะห์ในท่อแก้วคาพิลลารี สามารถดักจับทั้งสารกลุ่มทาเลตและเมทริกซ์ปนเปื้อนที่มาจากหอยได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากหอยที่เติมสารประกอบทาเลตลงไป นำไปฉีดในเครื่อง GC ที่ต่อกับคอลัมน์วิเคราะห์ เมื่อไม่มีการใช้ตัวดูดซับโมโนลิท (A) และมีการใช้ตัวดูดซับโมโนลิท (B)

แม้ว่าฟีกที่เกิดขึ้นเมื่อมีการใช้โมโนลิทในการดูดซับจะมีลักษณะที่เตี้ยกว่าและกว้างกว่าฟีกที่เกิดขึ้นเมื่อไม่มีการใช้โมโนลิท ทั้งนี้เนื่องจากตัวดูดซับโมโนลิทชนิดซิลิกาสามารถแสดงตัวเป็นเฟสคงที่ซับและคายสารออกมา แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าพื้นที่ฟีกที่ได้ของสารกลุ่มทาเลตจากผลการทดลองของทั้งสองโครมาโทแกรมมาเปรียบเทียบโดยการทำการทดสอบทางสถิติ t-test พบว่ามีค่าพื้นที่ฟีกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อให้ความร้อนสูงขึ้นสารกลุ่มทาเลตสามารถหลุดออกมาจากตัวดูดซับโมโนลิทโดยที่เมทริกซ์ปนเปื้อนดังกล่าวยังอยู่บนโมโนลิท และเมื่อนำตัวดูดซับโมโนลิทชนิดซิลิกาก่อนและหลังทำการดูดซับเมทริกซ์ปนเปื้อนมาทำการตรวจภาพโครงสร้างด้วยวิธีการของ SEM อีกครั้งพบว่า โมโนลิทที่ผ่านการดูดซับมีสารปกคลุมอยู่อย่างเห็นได้ชัด จากการค้นพบนี้จึงได้นำมาสู่ความเป็นไปได้ในการนำโมโนลิทชนิดซิลิกาดังกล่าวมาใช้งานได้จริงในทางปฏิบัติ เพื่อความรวดเร็วในการวิเคราะห์สารปนเปื้อนกลุ่มทาเลตจากสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบความแม่นยำของการฉีดซ้ำพบว่ามีความแม่นยำของพื้นที่ฟีกที่ระหว่างร้อยละ 0.12-3.67 ในขณะที่ความแม่นยำของโมโนลิทในท่อคาพิลลารีต่างชิ้นงานมีค่าร้อยละ 3.03-4.88 (ตารางที่ 6) แสดงถึง

ความน่าเชื่อถือได้ของสารสังเคราะห์โมนิโทชนิดซิลิกาในแต่ละครั้ง นอกจากนี้โมนิโทชนิดซิลิกาที่ได้สังเคราะห์ขึ้นนี้มีความสามารถในการใช้งานซ้ำได้ถึง 6 ครั้งก่อนที่จะทิ้งไปและมีการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 6 การทำดีดสารประกอบทาเลตซ้ำ เมื่อใช้ท่อคาพิลลารีดูดซับชนิดโมนิโทชนิดซิลิกาเดียวกันและต่างกัน

สารประกอบ	การทำซ้ำเมื่อใช้ท่อคาพิลลารีดูดซับ <u>เดียวกัน</u>		การทำซ้ำเมื่อใช้ท่อคาพิลลารีดูดซับ <u>ต่างกัน</u>	
	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของพื้นที่	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของเวลาคง	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของพื้นที่	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของเวลาคง
	พีก	ค่า (t_R)	พีก	ค่า (t_R)
DMP	3.67	0.24	4.80	2.10
DEP	0.12	0.16	4.77	1.79
DBP	2.73	0.09	3.03	1.76
BBP	3.30	0.11	4.88	1.04
DEHP	1.13	0.30	3.13	1.00
DnOP	1.23	0.37	4.41	1.16

เมื่อทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นในช่วง 0.01-20 ppm ของสารประกอบทาเลตแต่ละชนิดกับสัญญาณที่ได้จากแก๊สโครมาโทกราฟพบว่า มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่มี correlation coefficient ที่มากกว่า 0.99 สำหรับสารประกอบทาเลตทุกชนิดที่ทดสอบซึ่งถือว่าดีมาก นอกจากนี้ได้ทำการหาขีดจำกัดการวิเคราะห์ของสารประกอบทาเลตที่สามารถใช้ตัวดูดซับโมนิโทชนิดซิลิกาในท่อคาพิลลารีนี้ได้พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.0068-0.0296 ppm ของสารมาตรฐานทาเลต (ตารางที่ 7) หรือเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างที่สกัดได้จริงพบว่าอยู่ระหว่าง 0.11-0.71 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่างที่สกัดได้ ส่วนค่าการได้กลับคืน (Recovery) ของสารประกอบทาเลตอยู่ในช่วงร้อยละ 73-76 ที่ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และร้อยละ 80-86 ที่ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 10 นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำในวันเดียวกันพบว่ามีค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ร้อยละ 0.31-2.15 ความสามารถในการทำซ้ำในต่างวันกันมีค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ร้อยละ 3.58-5.35 ดังแสดงในตารางที่ 8

วิธีการที่ได้ทำการหาค่าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แล้วนี้ ได้นำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง ผลลัพธ์ที่ได้แสดงให้เห็นเชิงประจักษ์ของการนำวัสดุที่ค้นพบได้จากการวิจัยสามารถนำไปใช้ได้จริงในการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารจำพวกเนื้อสัตว์และที่เกี่ยวข้องกับตัวบ่งชี้ของสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 7 ขีดจำกัดการวิเคราะห์และร้อยละการได้กลับคืนของสารประกอบทาเลตเมื่อใช้ตัวดูดซับโมนอลิทชนิดซิลิกาในท่อคาพิลลารี

สารประกอบ	ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (ppm)	ร้อยละการได้กลับคืน \pm ร้อยละค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์	
		5 ppm	10 ppm
DMP	0.0068	72.82 \pm 7.61	81.24 \pm 5.39
DEP	0.0079	73.39 \pm 6.02	82.77 \pm 4.61
DBP	0.0095	72.77 \pm 7.81	80.07 \pm 4.08
BBP	0.0296	73.20 \pm 8.41	82.04 \pm 5.70
DEHP	0.0090	75.98 \pm 5.90	85.54 \pm 5.38
DnOP	0.0093	76.44 \pm 6.06	84.35 \pm 3.26

ตารางที่ 8 ค่าความเที่ยงแสดงโดยใช้ร้อยละค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของสารประกอบทาเลตเมื่อมีการทำการทดลองซ้ำในวันเดียวกัน (Intra-day) และต่างวันกัน (Inter-day)

สารประกอบ	ร้อยละค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์	
	การทดลองซ้ำในวันเดียวกัน	การทดลองซ้ำในต่างวันกัน
DMP	1.83	5.35
DEP	1.70	4.59
DBP	1.51	3.58
BBP	1.18	4.41
DEHP	2.15	5.01
DnOP	0.31	3.68

4.2 การประยุกต์ใช้งานโมนอลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ในการดูดซับสารประกอบเตตระซัยคลิน

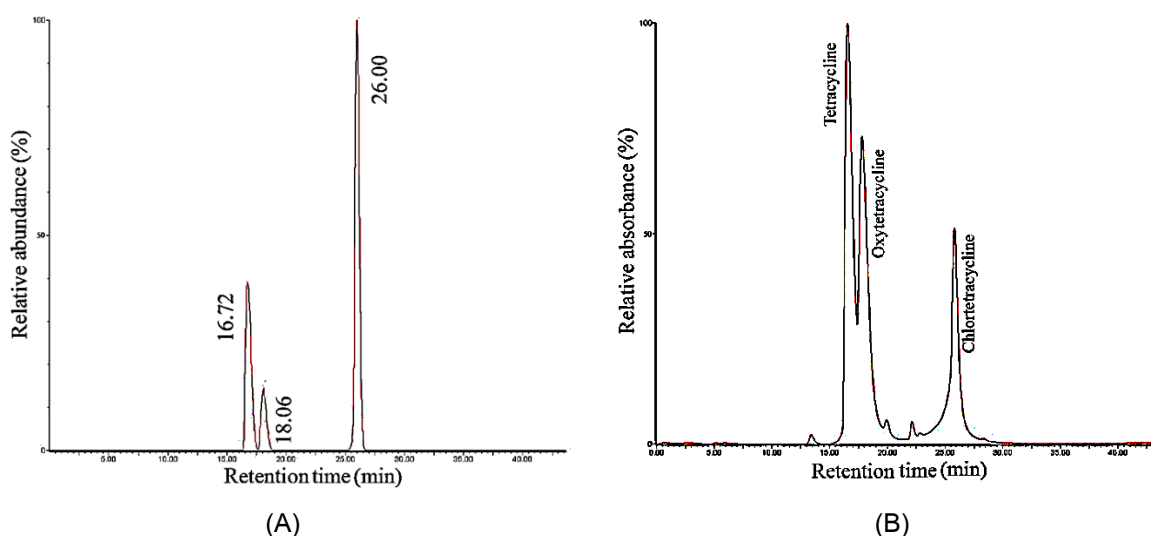
ในการทดลองครั้งนี้สารวิเคราะห์ที่เลือกใช้ในการทดลองคือสารกลุ่มเตตระซัยคลินซึ่งได้แก่ เตตระซัยคลิน ออกซีเตตระซัยคลิน (oxytetracycline) และคลอเตตระซัยคลิน (chlortetracycline) ก่อนที่จะนำสารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบการดูดซับจำเป็นต้องทำการทดลองวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดก่อนโดยเครื่องตรวจวัดที่เลือกคือ HPLC ที่ต่ออยู่กับ Time-of-Flight Mass Spectrometer (TOF-MS)

การวิเคราะห์สารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิค HPLC-TOF-MS

ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-TOF-MS เนื่องจาก HPLC เชื่อมต่อกับ MS ด้วยการใช้ interface คือ electrospray (ESI) ภายหลังจากความพยายามในการหา เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยกรดฟอร์มิก และเมทานอล ในอัตราส่วน 70:30 เนื่องจากกรดฟอร์มิกเพิ่มการเกิดการให้โปรตอนแก่สารวิเคราะห์และเมทานอลซึ่งมีแรงตึงผิวต่ำจะช่วยให้การพ่นของเหลวออกจาก nebulizer เพื่อให้เกิดละอองฝอยขนาดเล็กมากๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น

เมื่อทำการฉีดสารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดที่จำนวน 20 ไมโครลิตรเข้าไปในคอลัมน์ Kinetex ที่มีขนาด 50 mm x 4.6 mm และขนาดเม็ด 2.6 μm โดยให้ 30% เมทานอล-กรดฟอร์มิกเป็นเฟสเคลื่อนที่ใน isocratic mode ด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิเมตรต่อนาที ให้ความต่างศักย์ของคาพิลลารี 3500 V ความต่างศักย์ของ sample cone 100 V และอุณหภูมิของ desolvation 220 องศา พบว่าสารเตตระซัยคลิน ออกซิเตตระซัยคลิน และคลอเตตระซัยคลิน มีเวลาคงค้าง เท่ากับ 16.72, 18.06 และ 26.00 นาทีตามลำดับ และมวลเท่ากับ 444, 460 และ 478 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 26 (A) เนื่องจากเครื่อง HPLC ดังกล่าวได้ต่อยูกับเครื่องตรวจวัด UV จึงมีผลของโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องตรวจวัด UV แสดงดังรูปที่ 29 (B)

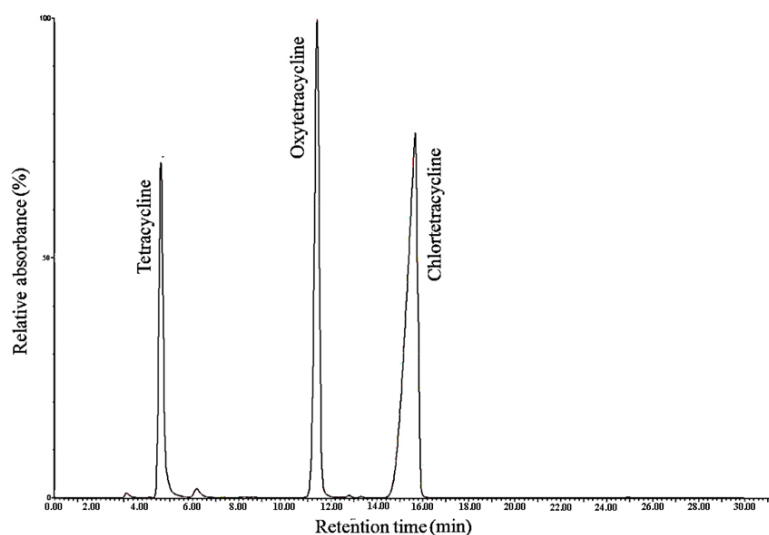
จะเห็นว่าสัญญาณที่ได้มาจากเครื่องตรวจวัด TOF-MS และ UV ของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากสภาพไวของเครื่องตรวจวัดที่มีต่อสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน การแยกระหว่างพีคของสารเตตระซัยคลิน และออกซิเตตระซัยคลินที่ไม่เกิดการแยกเมื่อใช้เครื่องตรวจวัด UV ดังรูปที่ 26 (B) เกิดขึ้นได้เมื่อสภาพไวลดลง ดังเช่นในโครมาโทแกรมรูปที่ 26 (A) แต่อย่างไรก็ตามสามารถสังเกตโดยรวมได้ว่าสภาพไวของเครื่องตรวจวัด UV ที่มีต่อสารทั้งสามชนิดดีกว่าเครื่องตรวจวัด TOF-MS ดังนั้นจึงได้ทำการปรับเปลี่ยน ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC-UV อีกครั้ง



รูปที่ 26 โครมาโทแกรมที่ได้จาก HPLC-TOF-MS (A) และ HPLC-UV (B) เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ 30% เมทานอล-กรดฟอร์มิก

การวิเคราะห์สารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิค HPLC-UV

เมื่อทำการฉีดสารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดที่จำนวน 20 ไมโครลิตรเข้าไปในคอลัมน์ Inersil ODS-4 ที่มีขนาด 150 mm x 4.6 mm และขนาดเม็ด 5 μm โดยให้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำและบัฟเฟอร์ที่ pH 6.5 ด้วยอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใน gradient mode โดยการเริ่มต้นด้วยการให้นาทีที่ศูนย์เป็นโมบายเฟสผสมระหว่างน้ำและบัฟเฟอร์ pH 6.5 ร้อยละ 30 จากนั้นเปลี่ยนเป็นร้อยละ 40 ในนาทีที่ 6 และเปลี่ยนเป็นร้อยละ 50 ในนาทีที่ 10 ให้คงที่จนถึงนาทีที่ 20 จึงเปลี่ยนเป็นร้อยละ 70 ในนาทีที่ 22 และให้คงที่ต่อไปอีก 5 นาที จนถึงนาทีที่ 27 จึงสิ้นสุด ส่วนเครื่องตรวจวัด UV ตั้งให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 360 นาโนเมตร ได้ผลของโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 27 พบว่าสารเตตระซัยคลิน ออกซีเตตระซัยคลิน (oxytetracycline) และคลอเตตระซัยคลิน (chlortetracycline) มีเวลาคงค้างเท่ากับ 4.61, 11.40 และ 15.67 นาทีตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้จากเครื่อง HPLC-TOF-MS นอกจากนี้ยังมีสภาพไวที่สูงกว่าเมื่อใช้เครื่องดังกล่าว



รูปที่ 27 โครมาโทแกรมที่ได้จาก HPLC-UV เมื่อใช้คอลัมน์ Inersil ODS-4 และเฟสเคลื่อนที่น้ำและบัฟเฟอร์ที่ pH 6.5 ใน gradient mode

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ของทั้งสองเทคนิคคือ HPLC-TOF-MS และ HPLC-UV มาเปรียบเทียบกันพบว่า HPLC-UV ให้ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (linear range) ได้ยาวกว่าและมีค่า regression ที่ดีกว่า HPLC-TOF-MS นอกจากนี้ขีดจำกัดการวิเคราะห์ของเครื่องมือ HPLC-UV มีค่าระหว่าง 68.2-70.6 ไมโครกรัม ต่อหนึ่งลิตร ค่าที่ได้นี้ต่ำกว่าค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิค HPLC-TOF-MS ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งหมายถึงว่าค่าที่ได้จากเครื่องมือ HPLC-UV ดีกว่าค่าที่ได้จากเครื่องมือ HPLC-TOF-MS ทั้งนี้เนื่องจากสภาพไวของการทำปริมาณวิเคราะห์สารในกลุ่มเตตระซัยคลินมีต่อเครื่องตรวจวัด UV สูงกว่าเครื่องตรวจวัด TOF-MS

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบระหว่างขีดจำกัดการวิเคราะห์ของสารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดเมื่อใช้เครื่องมือ HPLC-TOF-MS และ HPLC-UV

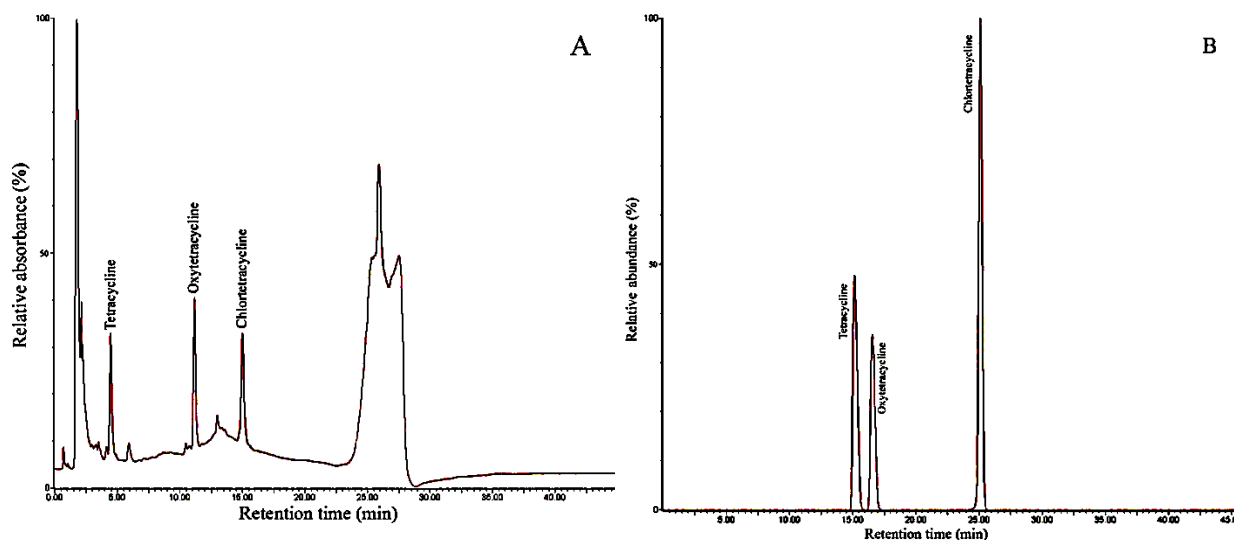
สารวิเคราะห์	ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (ug/L)	
	HPLC-TOF-MS	HPLC-UV
เตตระซัยคลิน (Tetracycline)	170	70.6
ออกซีเตตระซัยคลิน (Oxytetracycline)	550	69.3
คลอเตตระซัยคลิน (Chlortetracycline)	500	68.2

เมื่อนำโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์ได้ไปทำการทดสอบการดูดซับสารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิด ที่เติมลงไปในน้ำเสียสังเคราะห์ และทำการเปรียบเทียบกับตัวดูดซับชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่มีจำหน่ายทางการค้าพบว่ามีค่าการได้กลับคืน (Recovery) มีค่าร้อยละ 73-82 ค่าที่ได้นี้ค่อนข้างต่ำกว่าตัวดูดซับชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่มีจำหน่ายทางการค้า ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ร้อยละการได้กลับคืนของเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวดูดซับโมโนลิทซิลิกา C18 และตัวดูดซับ C18 ทางการค้า

ตัวดูดซับ	ร้อยละการได้กลับคืน		
	เตตระซัยคลิน	ออกซีเตตระซัยคลิน	คลอเตตระซัยคลิน
ตัวดูดซับโมโนลิทชนิดซิลิกา C18	76.46	72.55	81.69
ตัวดูดซับ C18 ทางการค้า	92.70	83.18	77.62

เมื่อนำค่าการได้กลับคืนได้ไปเปรียบเทียบกับร้อยละของปริมาณคาร์บอนที่อยู่บนตัวดูดซับของตัวดูดซับโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์เองและตัวดูดซับซิลิกาอินทรีย์ C18 ทางการค้าพบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 22.85 และ 17.03 ตามลำดับ จึงคาดว่าสารวิเคราะห์ทั้งสามชนิดมีความมีขั้วค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับตัวดูดซับโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สังเคราะห์ขึ้นได้จึงทำให้การดูดซับได้ไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อทำการตรวจวัดค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-TOF-MS พบว่ามีค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 0.11-0.71 มิลลิกรัมต่อน้ำเสียจริงหนึ่งลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับขีดจำกัดการวิเคราะห์ที่วัดโดย Batt *et al.* (2005) ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.03-0.19 มิลลิกรัมต่อน้ำเสียหนึ่งลิตร พบว่าสูงกว่าเล็กน้อย จึงเป็นที่สังเกตว่าการสกัดสารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิด จากน้ำเสียนั้นแม้ว่าจากการตรวจสอบวรรณกรรมพบว่ามีการใช้ตัวดูดซับซิลิกาอินทรีย์ C18 ในการสกัดจริงแต่นิยมใช้ Oasis HLB ที่ทำจากพอลิเมอร์ 2 ชนิดคือ divinylbenzene และ vinyl pyrrolidinone. เป็นตัวดูดซับมากกว่าซึ่งจะให้ผลที่ดีกว่าการใช้ตัวดูดซับซิลิกาอินทรีย์ C18



รูปที่ 28 โครมาโทแกรมของเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดที่เติมลงในน้ำเสีย นำไปสกัดด้วยตัวดูดซับโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 และทำการวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC-UV (A) และ HPLC-TOF-MS (B)

จากโครมาโทแกรมจะเห็นได้ว่าเมื่อวิเคราะห์สารวิเคราะห์ที่สกัดได้จากน้ำด้วย HPLC และใช้เครื่องตรวจวัดเป็น UV ที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนที่ 360 nm จะมีพีคของสารอื่นปนเปื้อนในการตรวจวัด แต่เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดเป็น TOF-MS จะปรากฏเป็นพีคของสารวิเคราะห์ที่แยกออกจากกัน ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพในการแยกมวลของเครื่อง TOF-MS ที่สูง แต่อย่างไรก็ตามสภาพไวของเครื่องตรวจวัด TOF-MS ที่ใช้อยู่นี้น้อยกว่าเครื่องตรวจวัด UV จึงไม่สามารถวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเครื่อง HPLC-TOF-MS ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กลุ่มสารเตตระซัยคลินต่อเมื่อสารวิเคราะห์มีความเข้มข้นสูงและต้องการความจำเพาะเจาะจงต่อสารมากกว่า แต่ในปัจจุบันนี้เราสามารถทำการวิเคราะห์กลุ่มสารเตตระซัยคลินได้ที่ความเข้มข้นที่ต่ำโดยใช้เครื่องมือ HPLC ที่ต่อยุ่กับ quadrupole time-of-flight MS หรือที่เรียกว่า HPLC-QToF-MS หรืออาจวิเคราะห์ในระดับที่ต่ำมากโดยใช้เครื่อง HPLC-triple quadrupole MS แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาสูงและไม่สามารถหาได้ในห้องปฏิบัติการที่ทำการทดลอง

4.3 การประยุกต์ใช้งานโมโนลิทชนิดพอลิเมอร์ในการดูดซับสารประกอบเตตระซัยคลิน

จากการที่สารกลุ่มเตตระซัยคลินสามารถให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ และโดยทั่วไปเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์มีสภาพไวที่สูงกว่าเครื่องตรวจวัด UV เมื่อทำการสกัดสารประกอบเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดแล้วจึงทำการวิเคราะห์ด้วยการใช้ HPLC ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากความแตกต่างของเครื่องมือและเพื่อให้ได้การแยกที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์สาร จึงต้องทำการหาสภาวะต่างๆ ของเครื่อง HPLC ใหม่อีกครั้ง

4.3.1 การหาสภาวะต่างๆ ของเครื่อง HPLC ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

ในการทดลองนี้ทำการแยกสารเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิด ด้วยคอลัมน์ ODS-3 ขนาด 150 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร และมีขนาดเม็ด 5 ไมครอน และมี demeclocycline เป็น internal standard และ

ต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 ประกอบด้วย sodium acetate 0.075 M, disodium ethylenediamine tetraacetate 0.025 M และ calcium chloride 0.035 M โดยที่ disodium ethylenediaminetetraacetate และ calcium chloride ใช้เพื่อป้องกันไอออนโลหะที่สามารถรบกวนการวิเคราะห์ และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากสารกลุ่มเตตระซัยคลิน สามารถเกิดเป็นสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะได้ (Maia *et al.* 2008, Pena *et al.* 2010).

พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต้องทำ gradient elution ของโมบายเฟสระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 ร้อยละ 70 และเมทานอลร้อยละ 30 โดยเริ่มต้นให้มีอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นในนาทีที่ 6 ลดสารละลายบัฟเฟอร์ลงเหลือร้อยละ 60 อีก 4 นาทีต่อมาลดสารละลายบัฟเฟอร์ลงเหลือร้อยละ 50 โดยให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปล่อยให้ 10 นาทีจึงเพิ่มสารละลายบัฟเฟอร์เป็นร้อยละ 70 ในเวลา 2 นาที และให้อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ผลจากโครมาโทแกรมของการฉีดสารเตตระซัยคลินที่มี internal standard มีค่า retention time ของสารเตตระซัยคลิน ออกซีเตตระซัยคลิน คลอเตตระซัยคลิน และ demeclocycline เท่ากับ 5.15, 14.62, 18.77 และ 16.30 นาที ตามลำดับ และสารทุกตัวแยกออกจากกันได้ดี

4.3.2 การหาความเหมาะสมของการสกัดด้วยโมโนลิทชนิดพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้และวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

1) ค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์

ในการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ของการสกัดสารกลุ่มเตตระซัยคลินทุกตัวในน้ำ โดยใช้ HPLC ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (HPLC-fluorescence) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และทำการเปรียบเทียบกับตัวดูดซับทางการค้าคือ Oasis HLB โดยให้การทดลองมีลักษณะเหมือนกัน

ในการหาค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์โดยการฉีดตัวอย่าง blank และทำการสกัดโดยใช้โมโนลิท poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) ที่สังเคราะห์ในหลอดจึดยาขนาดเล็กจำนวน 7 ครั้งและทำเช่นเดียวกันสำหรับ Oasis HLB จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีค ค่า SD และ 3SD มาคำนวณ ตามสูตร $y = y_B + 3SD$ พบว่าค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ของ สารเตตระซัยคลิน ออกซีเตตระซัยคลิน และ คลอเตตระซัยคลินของการสกัดด้วยโมโนลิทที่สังเคราะห์ และ Oasis HLB ทางการค้ามีค่าแสดงดังในตารางที่ 11 โดยในการสกัดนี้ใช้น้ำตัวอย่างเพียง 100 มิลลิลิตรและทำการสกัดให้เข้มข้นขึ้นจนเหลือ 1 มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบได้นำไปทดสอบค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์เมื่อใช้ HPLC-PDA พบว่าค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์เมื่อใช้เทคนิค HPLC ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีค่าต่ำกว่า (6.76 – 11.50 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในขณะที่ค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์เมื่อใช้ HPLC-PDA มีค่า 23.9-46.4 ไมโครกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้มีประสิทธิภาพที่ดีเทียบเท่าตัวดูดซับ Oasis HLB ทางการค้า แต่เป็นที่สังเกตว่าการไหลของน้ำเมื่อผ่านโมโนลิทดังกล่าวเกิดขึ้นได้ดีกว่า

ตารางที่ 11 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ของสารเตตระซัยคลินแต่ละตัวภายหลังการสกัดด้วยโมโนลิทที่สังเคราะห์ และ Oasis HLB ทางการค้าเมื่อใช้ HPLC ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

สารประกอบ	ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	
	วัสดุโมโนลิท	Oasis HLB
เตตระซัยคลิน	7.24	7.55
ออกซีเตตระซัยคลิน	11.50	9.14
คลอเตตระซัยคลิน	6.76	6.44

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ทำโดย Du *et al.* (2015) ซึ่งทำการศึกษาสารเตตระซัยคลิน ทั้ง 3 ชนิดพร้อมทั้ง doxycycline ในน้ำก๊อก น้ำจากแม่น้ำ จากบ่อ และจากฟาร์มโดยใช้เทคนิค HPLC ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ระหว่าง 1.5 - 3.3 ไมโครกรัมต่อลิตร แม้ว่าจะต่ำกว่าเล็กน้อยแต่ก็อยู่ในช่วงเดียวกันกับผลจากการทดลองนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับอีกงานหนึ่งที่ทำโดย Granados *et al.* (2005) ซึ่งได้ใช้ Oasis HLB เป็นตัวดูดซับแต่มีการใช้คอลัมน์วิเคราะห์ชนิด PLRP-S 100 A⁺ แทนคอลัมน์ซิลิกาอินทรีย์ C18 ได้ค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ระหว่าง 0.3 - 1.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่านี้ต่ำลงไปกว่าผลการวิเคราะห์จากการทดลองนี้ถึง 10 เท่าทั้งนี้เนื่องจากการเติมสารที่ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ซึ่งประกอบด้วยแมกนีเซียม ทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนซึ่งช่วยในการเพิ่มขีดความสามารถในการวิเคราะห์

2) ค่าการได้กลับคืน (Recovery)

ค่าการได้กลับคืนนี้เทียบเมื่อมีการสกัดน้ำตัวอย่างที่ผสมสารวิเคราะห์ทุกตัวรวม internal standard ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการสกัดน้ำจำนวน 100 มิลลิตร จำนวนอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลของการหาค่าการได้กลับคืนของเตตระซัยคลินแต่ละตัวแสดงดังในตารางที่ 12 พบว่า ค่าการได้กลับคืนของเตตระซัยคลินทุกตัวมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างตัวดูดซับโมโนลิทพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น (56.32 – 92.46 %) และตัวดูดซับ Oasis HLB ทางการค้า (57.04 – 91.37 %) ซึ่งยืนยันถึงประสิทธิภาพของการสกัดด้วยโมโนลิท

ตารางที่ 12 ค่าการได้กลับคืนของเตตระซัยคลินทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร

สารประกอบ	ร้อยละการได้กลับคืน \pm ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (RSD)		
	สารเตตระซัยคลิน	ออกซีเตตระซัยคลิน	คลอเตตระซัยคลิน
วัสดุโมโนลิทพอลิเมอร์สังเคราะห์	56.32 \pm 0.01	92.46 \pm 0.01	56.70 \pm 0.02
Oasis HLB	57.06 \pm 0.01	91.37 \pm 0.01	57.04 \pm 0.01

3) ค่าการทำซ้ำของการใช้โมโนลิทสังเคราะห์

ความสามารถในการทำซ้ำของการสังเคราะห์โมโนลิทใน batch เดียวกันหรือ repeatability และต่าง batch กันหรือ reproducibility สามารถดูได้จากการสกัดเทระชัยคลิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 100 มิลลิตรและผ่านน้ำตัวอย่างนี้ไปบนตัวดูดซับโมโนลิทที่ได้จากการสังเคราะห์ใน batch เดียวกันจำนวนไม่น้อยกว่า 3 ชั้นงานที่สังเคราะห์ใน batch เดียวกันและไม่น้อยกว่า 3 ชั้นงานต่าง batch กัน ผลการทดลองเมื่อดูจากค่าพื้นที่ฟีกของเตตระชัยคลินที่ได้และนำมาหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ แสดงดังในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ฟีกของเตตระชัยคลินที่ได้จากการสกัดด้วยการใช้โมโนลิทที่สังเคราะห์มาจาก batch เดียวกันและต่าง batch กัน

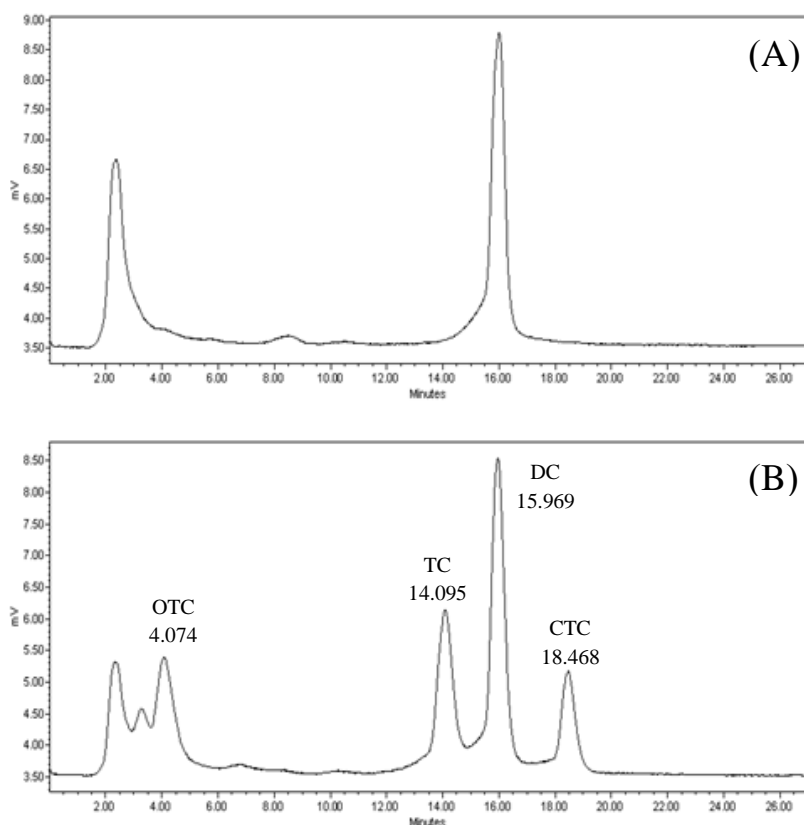
สารประกอบ	ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	
	batch เดียวกัน	ต่าง batch กัน
สารเตตระชัยคลิน	10.54	12.91
ออกซีเตตระชัยคลิน	6.72	8.71
คลอเตตระชัยคลิน	10.96	8.22

เมื่อนำค่าที่ได้ทั้งหมดไปเทียบกับ Horwitz ratio (HORRAT) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการทำซ้ำของวิธีการที่เป็นมาตรฐาน โดยดูจากจำนวนการทดลองและความเข้มข้น ค่า HORRAT ที่ยอมรับได้ต้องอยู่ในช่วงระหว่าง 0.5-2 สำหรับการทดลองนี้ค่า HORRAT ที่คำนวณได้จากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ batch เดียวกันและต่าง batch กัน มีค่า 0.96-1.56 และ 1.17-1.84 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงดังกล่าวจึงเป็นการยืนยันว่าโมโนลิทที่สังเคราะห์ได้มีความแน่นอนเชื่อถือได้หากนำมาใช้ในการสกัด

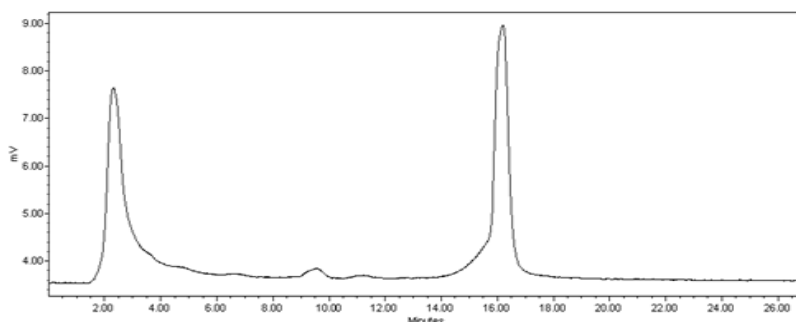
4.3.3 การประยุกต์ใช้กับน้ำตัวอย่างจริง

น้ำตัวอย่างที่ใช้ได้นำมาจากฟาร์มกุ้งในประเทศไทย โดยนำน้ำตัวอย่างมาเติมและไม่เติมเตตระชัยคลิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการสกัดโดยใช้โมโนลิทที่ทำการสังเคราะห์ในหลอดฉีดยาขนาดเล็ก จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลของโครมาโทแกรมที่ได้ไม่ปรากฏฟีกของสารวิเคราะห์ในน้ำตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเตตระชัยคลิน ดังแสดงในรูปที่ 29 (A) แต่อย่างไรก็ตามได้มีการทำการทดลองที่คล้ายคลึงกันแต่ใช้ตัวดูดซับ Oasis HLB ซึ่งผลโครมาโทแกรมไม่พบฟีกของสารวิเคราะห์เตตระชัยคลินทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 30

จากการทดลองนี้พบว่าในระหว่างการสกัดเตตระฮัยคลินจากน้ำตัวอย่างจริง เมื่อใช้ตัวดูดซับ Oasis HLB เกิดการอุดตันทำให้น้ำตัวอย่างไหลไม่สะดวก แม้ว่าจะใช้ปั๊มไฟในการดูดน้ำตัวอย่างและในที่สุดเกิดการอุดตันของสารแขวนลอยที่มากับน้ำที่ตัวดูดซับทำให้ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่สามารถไหลผ่านได้เพียงร้อยละ 80 ของปริมาตรน้ำที่ต้องการสกัด แต่ปรากฏการณ์เช่นนี้ไม่เกิดขึ้นเมื่อใช้โมโนลิทที่สังเคราะห์เป็นตัวดูดซับ

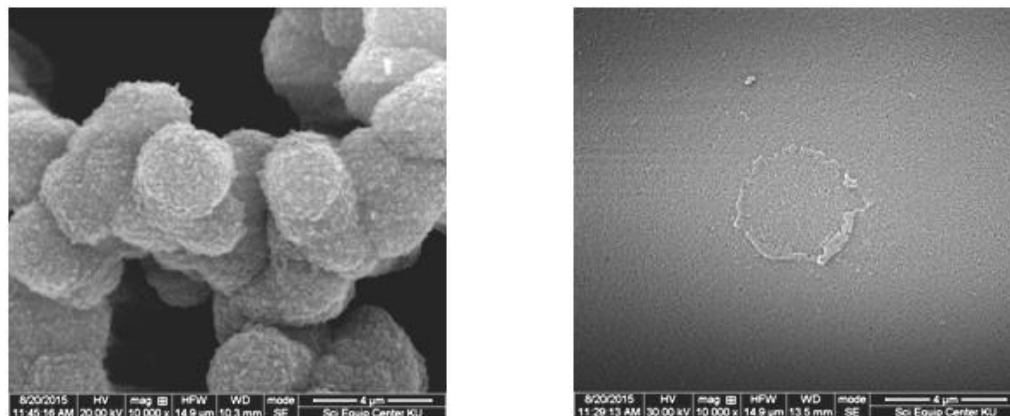


รูปที่ 29 โครมาโทแกรมของน้ำตัวอย่างที่ (A) ไม่มีการเติมเตตระฮัยคลินทั้ง 3 และ (B) มีการเติม และทำการสกัดด้วยตัวดูดซับโมโนลิท



รูปที่ 30 โครมาโทแกรมของน้ำตัวอย่างที่ (A) ไม่มีการเติมเตตระฮัยคลินทั้ง 3 และ (B) มีการเติม และทำการสกัดด้วยตัวดูดซับ Oasis HLB

และเมื่อนำตัวดูดซับ Oasis HLB มาทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้กำลังขยายเดียวกันแสดงดังรูปภาพที่ 31 พบว่าโมโนลิทที่สังเคราะห์มีขนาดเม็ดที่เล็กกว่าและมีพื้นผิวที่สูงกว่าตัวดูดซับทางการค้าซึ่งมีผิวที่เรียบ



รูปที่ 31 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้กำลังขยาย 10,000x เทียบกันระหว่าง (a) โมโนลิทชนิด poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) และ (b) ตัวดูดซับ Oasis HLB

เมื่อทำการหาค่าการได้กลับคืนเมื่อมีการเติมสารเตตระซัยคลินลงไปในน้ำตัวอย่างพบว่า เมื่อใช้โมโนลิทพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มีค่าร้อยละ 69.3-81.7 ในขณะที่เมื่อใช้ตัวดูดซับ Oasis HLB มีค่าการได้กลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 40.6-44.0 การได้กลับคืนที่ลดลงเนื่องจากการดูดตันของสารแขวนลอยและสิ่งเจือปนในน้ำ ซึ่งโดยทั่วไปน้ำที่มาจากฟาร์มกุ้งจะมีการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงกุ้งซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของแป้ง กากถั่วเหลือง ปลาป่นโดยมีเอนไซม์ สารกระตุ้นการเติบโต วัคซีนและสารอาหารรวมถึงไขมัน วิตามินและแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบ แม้ว่าจะทำการกรองน้ำจากฟาร์มกุ้งด้วยกระดาษกรองขนาด 11 ไมครอนแล้วยังมี humic acid เศษต่างๆ และสารแขวนลอยตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นในน้ำทำให้เกิดการดูดตันเมื่อทำการให้น้ำผ่านเป็นปริมาณมากได้ แต่เนื่องจากโมโนลิทมีโพรงต่อเนื่อง (flow through pore) ขนาดใหญ่กว่าจึงให้สารต่างๆ ดังกล่าวที่มีขนาดเล็กผ่านได้โดยไม่เกิดการดูดตัน

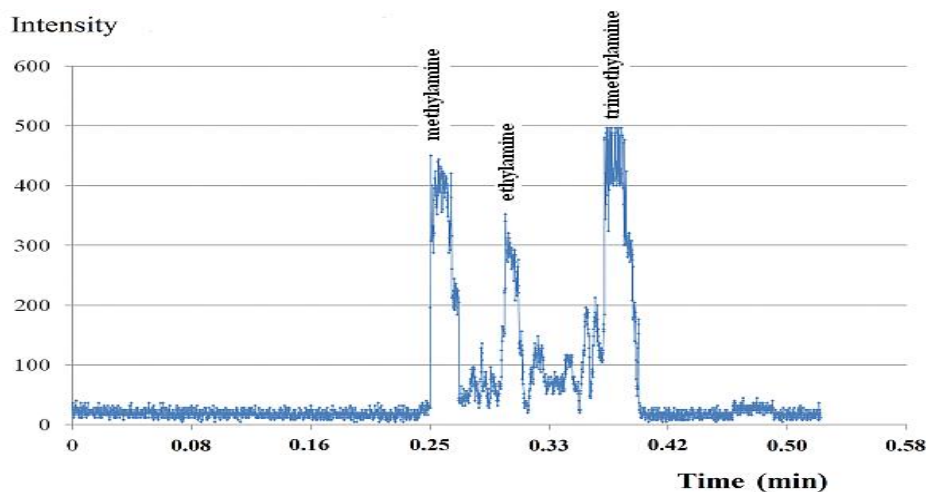
4.4 การประยุกต์ใช้งานโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 สำหรับโครมาโทกราฟีบนชั้นงานขนาดเล็ก

ทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ในช่องการไหลยาว 10 เซนติเมตรของระบบของไหลขนาดเล็กที่ต่ออยู่กับระบบการตรวจวัด LIF เพื่อทำการแยกสารประกอบในกลุ่มของ amine, chlorpheniramine และ riboflavin

4.4.1 การแยกสารประกอบเอมีน

ในช่องการไหลยาว 10 เซนติเมตรที่มีโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ของระบบการไหลขนาดเล็กที่ต่ออยู่กับระบบการตรวจวัด LIF สามารถทำการแยกสารประกอบเอมีนคือ methylamine, ethylamine, และ

trimethylamine โดยมีการทำเป็นอนุพันธ์ให้เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ก่อนการตรวจวัด สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการแยกคือ อัตราการไหลของโมบายเฟสที่เป็นเมทานอลบริสุทธิ์ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้เกิดแรงดันย้อนกลับวัดได้ประมาณ 300 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ผลของโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 26 และค่าพารามิเตอร์ของโครมาโทกราฟแสดงดังตารางที่ 14



รูปที่ 32 โครมาโทแกรมการแยกสารประกอบ methyl amine, ethyl amine และ trimethylamine ในระบบของไหลขนาดเล็กที่มีช่องการไหลบรรจุโมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8

ตารางที่ 14 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ทางโครมาโทกราฟของการแยกสารประกอบเอมีนในช่องการไหลยาว 10 เซนติเมตรของระบบการไหลขนาดเล็ก

พารามิเตอร์	Methylamine(1°)	Ethylamine(2°)	Trimethylamine(3°)
Retention time, t_R (นาที)	2.1784	2.7015	3.4055
พื้นที่พีค	34093.94	17930.43	45947.93
ความสูงของพีค	421.5851	293.5851	469.5851
ความกว้างของพีค (นาที)	0.3419	0.2595	0.4220
ความกว้างของพีคที่ครึ่งของความสูง (นาที)	0.1495	0.0112	0.2595
Dead time, t_0 (นาที)	0.005	0.005	0.005
Retention factor (k')	432.62	539.30	680.10
Tailing factor (TF)	5.0067	1.0790	1.8162
จำนวนเพลท (เพลท)	224.8986	600.4059	360.783
ความสูงของเพลท (เพลทต่อเมตร)	0.0446	0.0167	0.0277
Selectivity factor (α)	1.2407 (ระหว่างพีคที่ 1 และ 2)		1.2611 (ระหว่างพีคที่ 2 และ 3)

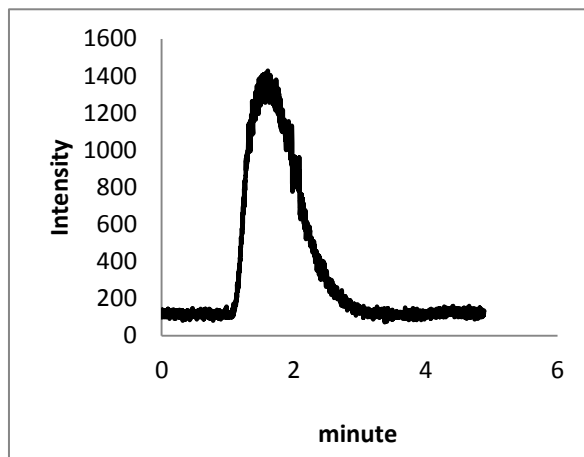
จากพารามิเตอร์ต่างๆ ของโครมาโทกราฟีในตารางที่ 1 เวลาที่ใช้ในการแยก methylamine, dimethylamine, trimethylamine คือน้อยกว่า 4 นาที ในขณะที่ค่า selectivity factor ที่คำนวณได้มีค่าที่ดีที่สุดคือ 1.21 (methylamine/ dimethylamine) และ 1.26 (dimethylamine/trimethylamine) จำนวนเพลทมีค่าค่อนข้างต่ำคือประมาณ 395 เพลทต่อ 10 เซนติเมตรสำหรับช่องการไหลขนาดกว้าง 70-100 ไมครอนหรือเฉลี่ยประมาณ 85 ไมครอน ลึก 35 ไมครอน เมื่อเทียบกับจำนวนเพลทของคอลัมน์ HPLC ปกติที่อาจสูงถึง 10,000 เพลทต่อ 10 เซนติเมตร ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการคำนวณความสามารถในการแยกสารเอมีนในช่องการไหลของโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C8 ที่สังเคราะห์ได้เทียบกับคอลัมน์ซิลิกาอินทรีย์ C8 ทั่วไปทางการค้าดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเนื่องจากจำนวนเพลทต่อปริมาตรที่สูงกว่าถึง 220 เท่า

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างช่องการไหลที่มีโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ที่สังเคราะห์และคอลัมน์ทั่วไปทางการค้า

ข้อมูลการคำนวณ	ช่องการไหลในระบบขนาดเล็ก	คอลัมน์ทั่วไป
จำนวนเพลท	395	10000
ความยาว (มิลลิเมตร)	10	10
พื้นที่หน้าตัด (ตารางมิลลิเมตร)	0.085x0.035 มิลลิเมตร	id. 4.6 มิลลิเมตร
	= 0.00298	= 16.63
ปริมาตรช่องการไหล (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	0.0298	166.26
จำนวนเพลทต่อปริมาตร (เพลทต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)	13277.31	60.15

4.4.2 การแยกสารประกอบคลอเฟนิรามีน (Chlorpheniramine)

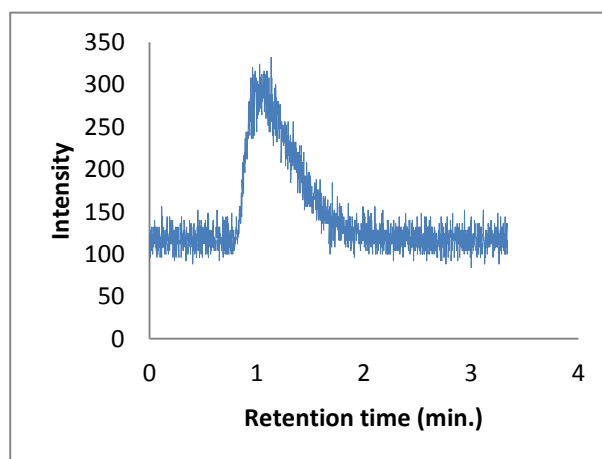
เมื่อทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ในช่องการไหลยาว 10 เซนติเมตรของระบบการไหลขนาดเล็กที่ต่ออยู่กับระบบการตรวจวัด LIF เพื่อทำการแยกและทำปริมาณวิเคราะห์สารประกอบ chlorpheniramine โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน chlorpheniramine เข้ายังระบบการไหลขนาดเล็ก และมีการทำเป็นอนุพันธ์ให้เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ก่อนการตรวจวัด ได้ผลของโครมาโทแกรมดังรูปที่ 33



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมของสารประกอบ chlorpheniramine ที่แยกบน ระบบของไหลโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C8 โดยมีเมทานอลเป็นโมบายเฟสที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

4.4.3 การแยกสารประกอบวิตามินบี 2 หรือ riboflavin

เมื่อทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C8 ในช่องการไหลยาว 10 เซนติเมตรของระบบการไหลขนาดเล็กที่ต่ออยู่กับระบบการตรวจวัด LIF เพื่อทำการแยกและทำปริมาณวิเคราะห์สารประกอบ riboflavin โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน riboflavin เข้ายังระบบการไหลขนาดเล็ก ได้ผลของโครมาโทแกรมดังรูปที่ 34

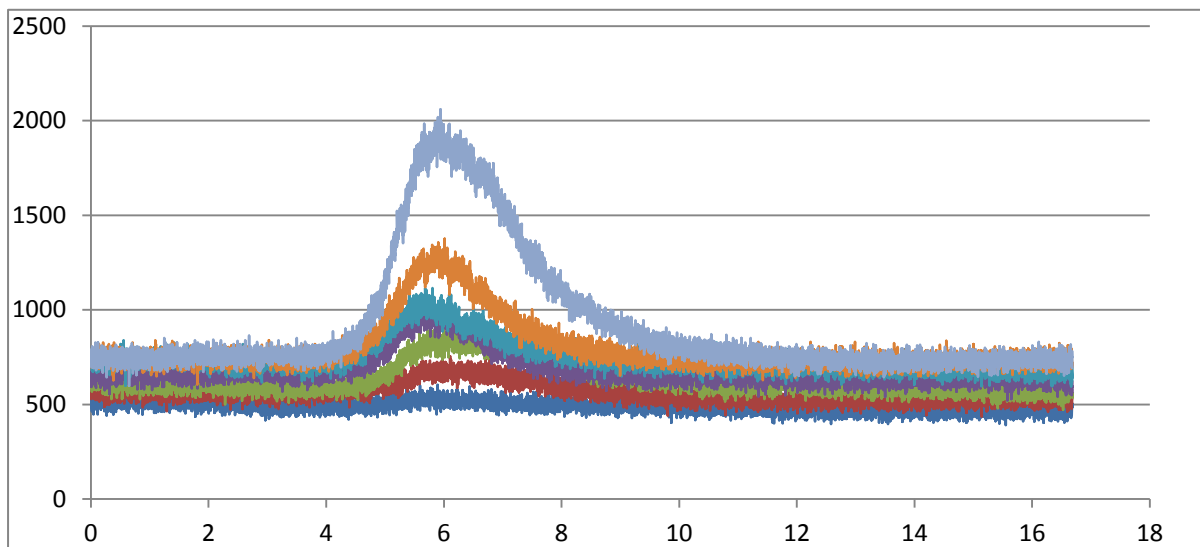


รูปที่ 34 โครมาโทแกรมของสารประกอบ riboflavin ที่แยกบน ระบบของไหลโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C8 โดยมีเมทานอลเป็นโมบายเฟสที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

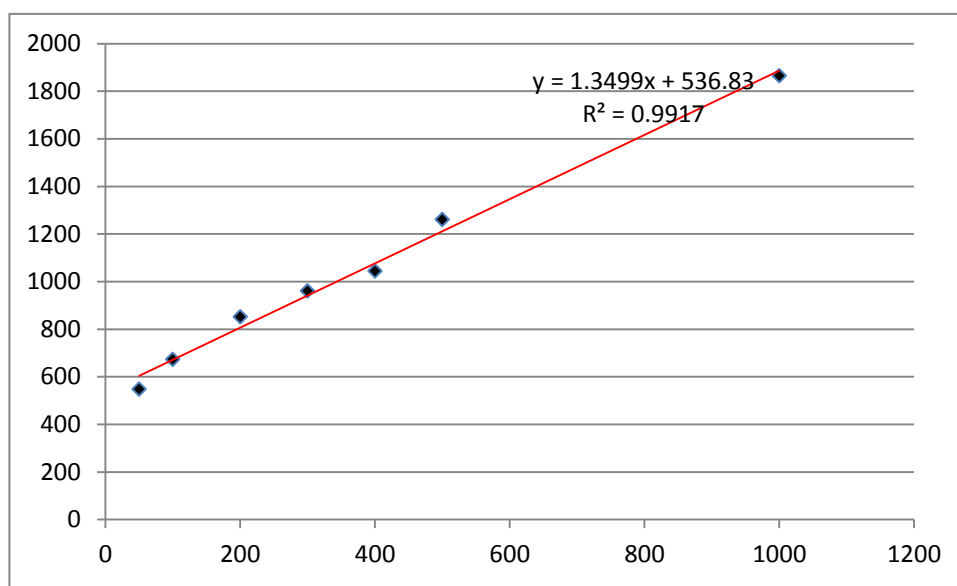
1) การสร้างกราฟมาตรฐาน

เมื่อนำโมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ C8 ที่สังเคราะห์ในช่องการไหลของชิ้นงานขนาดเล็กไปต่อเข้ากับระบบ LIF จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 50 100 200 300 400 500 และ 1000 ppm เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการหาความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในเม็ดยา ได้ผลการทดสอบสัญญาณของ LIF ที่ความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 35 และเมื่อนำมา

สร้างความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้น จะได้กราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่มีค่า $R^2 = 0.9917$ ดังรูปที่ 36



รูปที่ 35 พีคความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 50-1000 ppm ตามลำดับ



รูปที่ 36 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2

2) ผลการทดสอบการวิเคราะห์วิตามินบี 2 ในเม็ดยา

เมื่อนำเม็ดยาบดละเอียดหนัก 0.025 g ละลายในเมทานอลจำนวน 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาฉีดเข้าในโมโนลิทอินทรีย์ที่อยู่ในช่องการไหลวัดตัวที่ต่ออยู่กับเครื่องตรวจวัด LIF พบว่าสัญญาณที่ได้ให้ค่าความเข้ม (Intensity) อยู่ที่ 900 และเมื่อนำมาคำนวณความเข้มข้นพบว่ามีความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ได้เท่ากับ 13.45 มิลลิกรัม หรือ คิดเป็นร้อยละ 54 โดยน้ำหนักของเม็ดยา

(3) ผลงานวิจัยที่ได้รับ

จากการสนับสนุนของโครงการวิจัยนี้ของ สกว. ทำให้สามารถต่อยอดงานวิจัยที่มีผลถึงปัจจุบันคือ ความสามารถในการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ในท่อแก้วคาพิลลารีโดยที่ไม่มีการเกิดการแข็งตัวอย่างรวดเร็วของของเหลวผสมก่อนที่จะนำเข้าสู่ท่อแก้ว โดยงานนี้เพียงจะสามารถทำได้แต่ไม่ได้มีการรายงานไว้ในรายงานวิจัยนี้

ผลลัพธ์ที่ได้จากการงานวิจัยต่อมาที่สำคัญคือความสามารถในการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่มีขนาดเล็กมากระดับนาโนเมตรที่ยังไม่ปรากฏในรายงานวิจัยของต่างประเทศอื่นใด และโมโนลิทที่สังเคราะห์ขึ้นได้นี้ยังปราศจากช่องว่างจากการแตกหักและระหว่างโมโนลิทกับผนังภาชนะ เทคนิคการสังเคราะห์นี้จึงสามารถนำไปสู่เทคนิคการผลิตคอลัมน์โมโนลิทซิลิกาอินทรีย์ชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่สามารถทำได้เองในประเทศไทย ซึ่งโดยทั่วไปแล้วคอลัมน์ประเภทนี้มีการผลิตจำหน่ายในต่างประเทศในราคาที่สูงประมาณ 40,000 บาทต่อหนึ่งคอลัมน์ และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการซ่อมแซมคอลัมน์ซิลิกาอินทรีย์ C18 ที่เสียหายได้

นอกจากนี้ยังสามารถผลิตชิ้นงานตัวดูดซับซิลิกาในท่อแก้วคาพิลลารีในการวิเคราะห์สารทาเลตในอาหารที่มีไขมันสูงซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์จริง เนื่องจากด้วยชิ้นงานที่สามารถผลิตได้นี้ทำให้สามารถวิเคราะห์สารทาเลตในอาหารที่มีจำนวนตัวอย่างมากได้โดยใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการดั้งเดิม และราคาถูก

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากการที่เพียงจะเริ่มสามารถทำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ได้ ในงานวิจัยต่อไปในอนาคตจึงคาดว่าจะนำการสังเคราะห์โมโนลิทชนิดซิลิกาอินทรีย์ C18 ในท่อแก้วคาพิลลารีไปทำการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารประเภทต่างๆ เนื่องจากคอลัมน์ปัจจุบันทั่วไปมีการใช้ตัวดูดซับ และ/หรือ เฟสคงที่ที่ทำจาก C18 จำนวนมากกว่าร้อยละ 95 ด้วยคุณสมบัติของความเป็นโมโนลิทจึงทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ทำได้ดียิ่งขึ้นมาก โดยเฉพาะในเรื่องของการลดแรงดันย้อนกลับของการไหล

การสังเคราะห์ตัวดูดซับโมโนลิทชนิดอื่นๆ เพื่อการดูดซับและวิเคราะห์สารปนเปื้อนในอาหาร ยังคงเป็นงานที่มีความสำคัญที่สามารถนำองค์ความรู้นี้ไปทำการต่อยอดงานวิจัยในอนาคต

นอกจากนี้เมื่อสามารถสร้างคอลัมน์ในการดูดซับ และการวิเคราะห์ได้ง่ายและมีราคาที่ต่ำลง การสร้างคอลัมน์ราคาถูก และใช้แล้วทิ้ง ก็เป็นงานวิจัยที่คาดว่าจะสามารถทำได้ในอนาคตทั้งนี้เนื่องจากสามารถใช้คอลัมน์ขนาดเล็กเช่นท่อแก้วคาพิลลารี แทนคอลัมน์ขนาดใหญ่ที่ทำจากสแตนเลสที่มีฝังตัวดูดซับบรรจุในแบบดั้งเดิม

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - Insuan, W., Khawmodjod, P., Whitlow, H. J., Soonthondech, P., Malem, F., Chienthavorn, O.*, High throughput and low cost analysis of trace volatile phthalates in seafood by online coupling of monolithic capillary adsorbent with GC-MS, J. Agri. Food Chem., 64 (2016) 3287-92. (IF 2014: 3.107)
 - Chienthavorn, O.*, Subprasert, P., Insuan, W., Nitrosamines Extraction From Frankfurter Sausages by Using Superheated Water, Sep. Sci. Technol., 49 (2014) 838-846. (IF 2014: 1.200)
 - Chienthavorn, O.*, Ramnut, N., Subprasert, P., Sasook, A., Insuan, W., Effective and Reusable Monolith Capillary Trap of Nitrosamine Extraction by Superheated Water from Frankfurter Sausage, J. Agri. Food Chem., 62 (2014) 1240-1246. (IF 2014: 3.107)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์
 - มีการผลิตsilica monolith capillary จำนวนมากเพื่อนำไปใช้จริงในการทดลองหาปริมาณทาเลตในสัตว์ที่เป็นอาหารทะเลที่สุ่มได้จากชายทะเลของอ่าวไทย ให้แก่โครงการของกรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม
 - เชิงนโยบาย - ไม่มี
 - เชิงสาธารณะ - ไม่มี
 - เชิงวิชาการ
 - มีการสร้างนักวิจัยใหม่ในระดับปริญญาเอก 2 คนและปริญญาโท 3 คน
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
 - K. Khaunmeung, K. Srisuksawad, and O. Chienthavorn. 2014. "Novel Solid-Phase Microextraction Coupled with LC-MC Determination of Tetracycline from Waste Water". *PACCON 2014 proceedings*, Jan 2014, 8-10, p. 25–27. Khon-Khen University.
 - P. Khawmodjod, P. Soonthondech, F. Malem, O. Chienthavorn. 2014. "Phthalates Determination by Using Monolithic Adsorbent". *PACCON 2014 proceedings*, Jan 2014, 8-10, p. 1-3. Khon-Khen University.
 - S. Supraditarnporn, W. Insuan and O. Chienthavorn. 2015. "Monolithic Adsorbent for Analysis of Total Tetracycline in Water". The 3rd EnvironmentAsia International Conference proceedings, Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand, June 2015, 17-19, p.175-179. Thai Society of Higher Education Institutes on Environment.

ภาคผนวก

High-Throughput and Low-Cost Analysis of Trace Volatile Phthalates in Seafood by Online Coupling of Monolithic Capillary Adsorbent with GC-MS

Wimonrut Insuan,^{†,‡} Phatchara Khawmodjod,^{†,§} Harry J. Whitlow,^{†,⊥} Peerapong Soonthondecha,^Δ Fairda Malem,^Δ and Orapin Chienthavorn^{*,†,§}

[†]Department of Chemistry, Kasetsart University, P.O. Box 1011 Chatuchak, Bangkok 10903, Thailand

[‡]Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

[§]The Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, P.O. Box 1011 Chatuchak, Bangkok 10903, Thailand

[⊥]Haute Ecole Arc Ingénierie, University of Applied Sciences of Western Switzerland (HES-SO), Eplatures-Grise 17, CH-2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland

^ΔEnvironmental Research and Training Center, Department of Environmental Quality Promotion, Ministry of Natural Resources and Environment, Technopolis, Klongluang, Pathumtani 12120, Thailand

ABSTRACT: A simple, sensitive, and high-throughput method was developed for the determination of six volatile phthalate esters—dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), benzylbutyl phthalate (BBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), and di-*n*-octyl phthalate (DnOP)—in seafood samples by using monolith adsorbent in a capillary coupled to a gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) system. The freeze-dried samples were subjected to an ultrasonication with hexane, followed by vortex mixing. The liquid extract was quantitatively determined by a direct application to an online silica monolith capillary adsorbent coupled with a gas chromatograph with mass spectrometric detection. Method validation in seafood matrix gave recoveries of 72.8–85.4% and a detection limit of 6.8–10.0 ng g^{−1} for bivalve samples. Reusability of the monolith capillary for trapping coextracted matrix was up to six times, allowing high-throughput analysis at the parts per billion level. When compared with the Food and Environment Research Agency (FERA) method, no significant difference in the result was observed, confirming the method was valid and applicable for the routine analysis of phthalates in seafood samples for food and environmental laboratories.

KEYWORDS: phthalate ester, extraction, adsorbent, monolith, gas chromatograph, GC-MS

INTRODUCTION

Phthalates are esters of phthalic acid consisting of one or two benzene rings. They are typically utilized as plasticizers to improve properties of polymer products, such as transparency, durability, longevity, and especially flexibility. As phthalates are not chemically bound to polymer chains, during manufacturing they are easily released under thermal or mechanical stress. Their extensive use not only in plastics but also in products, such as personal care products (e.g., perfumes, lotions, and cosmetics), paints, toys, food packaging, medical devices, and pharmaceuticals, leads to their leaching into the environment and thence their presence in various matrices, for example, soils, sediments, air, and natural water and food products. In Thailand, a significant number of petrochemical industrial facilities are located around the Gulf of Thailand. Along this coast the residential area is dominated by local villagers and farmers working in agriculture and fisheries. The number of families associated with fisheries is continuously rising with an increasing demand for seafood for export and domestic consumption. Despite the fact that, according to Thailand's regulations, waste and wastewater from industry must be well-treated and controlled prior to discharge, leakage of waste into

the sea can be possible. Phthalates are chemicals of great concern that possibly contaminate the environment in those areas. Released phthalates that may induce adverse health effects may be transferred through the food chain into aquatic animals, from which human exposure mainly occurs via food ingestion. From our review, phthalate contamination is commonly found in drinking water,¹ in seafood, for example, fish, jellyfish, shrimp, and mussel,^{2,3} and packaged foods.⁴ Phthalate levels in edible marine fish and shellfish, such as oyster, white shrimp, and crab, were affected by fish habitat and physiochemical properties of polluting contaminants.³ A report of food monitoring of phthalates, meat samples (beef, poultry, pork, and meat product) showed high concentrations of DEHP of >300 ng g^{−1}. All phthalates were generally found in seafood to be of low concentration; DEHP was, however, detected in variable levels.⁵ Foods high in fat are contaminated by high

Received: February 15, 2016

Revised: March 19, 2016

Accepted: March 31, 2016

molecular weight phthalates that are more lipophilic, such as DEHP.⁶

Because phthalates are lipophilic and produce estrogenic activity in mammals,⁷ when they are directly or indirectly absorbed in human tissue, they give detrimental effects on human health, leading to cancer and endocrine disruption. The U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) and the European Union therefore classify them as priority pollutants. The U.S. EPA has established a maximum allowable concentration (MAC) of 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DEHP in water. The European Food Safety Authority (EFSA) has declared tolerable daily intake (TDI) values of 0.01, 0.05, 0.50, and 0.15 mg kg^{-1} body weight/day for dibutyl phthalate (DBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), benzylbutyl phthalate (BBP), and a group of diisononyl phthalate and diisodecyl phthalate, respectively.^{8,9} In 2011 the Chinese Ministry of Health announced quality limits of PAEs in foods and food additives of 1.5 and 0.3 mg kg^{-1} for DEHP and DBP, respectively.² It is therefore important to provide a rapid, highly reliable, sensitive, and efficient analytical procedure for monitoring phthalates in food matrices.

Several analytical methods have been developed for determining phthalate esters in food samples. Extraction and cleanup are the most challenging steps for analysis of the lipophilic phthalates in fat matrices, because fat can be coextracted and lead to contamination during the procedure. A few extra pretreatment steps for fat removal are then required prior to analysis by chromatographic methods, such as gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), or liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). To date, the most popular sample preparations are liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). After liquid extraction, a further cleanup of the extract is always necessary for those fatty matrices, and it was achieved by gel permeation chromatography (GPC) and/or SPE.^{8,10,11} Currently, several efficient and accurate sample preparation methods widely used for phthalate extraction are SPE, solid-phase microextraction (SPME), and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME). However, such methods are laborious and time-consuming, employ nonreusable materials or devices, and require large volumes of sample and/or organic solvents that can be harmful, carcinogenic, and hazardous to the environment. The most recently developed technique for routine analysis, SPME, was applied to extract phthalates from food,^{12,13} as SPME is a very simple, rapid, efficient, and solventless sample preparation method. Some disadvantages of the method that should be considered are high cost and sample carry-over effect. Its fiber is limited by type and lifetime, large batch-to-batch variation, and thermal instability. These limitations can be reduced by using a new alternative adsorbent employing monolithic material.

A monolithic material is a single continuous piece of either an organic polymer or silica that provides many advantages, those being large surface area, high permeability, easy fabrication, and functionalization. Many applications of the materials have been reported, including SPE, sample preconcentration, and separation in many areas, such as the environmental, pharmaceutical, food, and biomolecular fields.^{14–17} Characterization and classification of monolithic materials have been given elsewhere.^{18–20} The silica-based monolithic columns were prepared through hydrolysis and polycondensation of alkoxysilane in the presence of water-soluble polymers via sol–gel reaction.^{21,22} In our previous work

silica monolith was prepared in a capillary and used to absorb nitrosamine after superheated water extraction.²³

The goal of this study was to couple the synthesized monolithic capillary adsorbent online to a gas chromatograph for cleaning up and determining volatile phthalates in seafood samples. The outcome of this study proved the feasibility of high-throughput, low-cost, and rapid analysis of volatile phthalates in seafood samples by utilizing the monolithic capillary adsorbent.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Materials. Six standard phthalates were diethyl phthalate (DEP; 99.5%), dimethyl phthalate (DMP; 99.97%), and dibutyl phthalate (DBP; >99%) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), di-*n*-octyl phthalate (DnOP) from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland), benzyl butyl phthalate (BBP; 99.4%) from Merck (Darmstadt, Germany), and di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP; >98.5%) from Acros Organics (Geel, Belgium). Six deuterated standards, namely, dimethyl phthalate-3,4,5,6-*d*₄, diethyl phthalate-3,4,5,6-*d*₄, di-*n*-butyl phthalate-*d*₄, di-*n*-octyl phthalate-3,4,5,6-*d*₄, and bis(2-ethylhexyl)-phthalate-3,4,5,6-*d*₄ were obtained from AccuStandard (New Haven, CT, USA), whereas benzyl butyl phthalate-3,4,5,6-*d*₄ (98%) was from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Anthracene-*d*₁₀ (>98%) used as internal standard for phthalates was bought from CDN Isotopes Inc. (Quebec, Canada). All phthalate standard stock solutions were prepared in HPLC grade hexane (Burdick & Jackson, Ulsan, Korea).

For synthesis of the silica-based monolith capillary, a 0.32 mm i.d. bare fused silica capillary was obtained from SGE (SGE Analytical Science, Melbourne, VIC, Australia). Tetramethylorthosilicate (TMOS; >98%) from Merck, polyethylene glycol (PEG) with an average molecular weight of 10 000 g/mol from Fluka (Germany), glacial acetic acid from BDH (Poole, UK), urea (>99%), and sodium hydroxide from Merck were employed in the formulation. Other chemicals were of analytical grade used in a chemical laboratory. To avoid phthalate contamination, all or parts of the laboratory apparatus that potentially contacted samples were made of glass and/or metal.

Sample Collection. Representative seafood samples, namely, fish, prawn, and squid, were purchased from local markets in Samutsakorn province or in Bangkok, Thailand. Crabs were not selected because of the difficulty in removing the shell and low meat content. Fresh bivalve samples were mainly green mussels collected from Pradoo bay, adjacent to Map Ta Phut industrial estate, Rayong, Thailand. After collection, the shell and bone of all samples were removed, and the meat was kept in an aluminum foil bag during transportation and further storage at $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ or below.

Sample Preparation. Fresh seafood meat sample was defrosted, homogenized in a metal blender with an aluminum foil cover, and then freeze-dried. In a glass tube 1.0 g of the freeze-dried sample was mixed with 5 mL of hexane, and 1 mL of 20% NaCl solution was added for salting-out. To prevent sample agglomeration, the mixture was put into an ultrasonic bath for 5 min, homogenized by using a vortex mixer for 10 min, and followed by centrifugation at 4000 rpm for 5 min. The supernatant was dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered through a filter paper, and evaporated with a gentle nitrogen gas stream. To the final extract was added 100 μL of 100 ppm of anthracene internal standard and adjusted to 1.00 mL. One microliter of the liquid extract was finally injected into the GC-MS system.

For the Food and Environment Research Agency (FERA) method,²⁴ a 15.0 g sample was shaken with 15 mL of (1:1) acetonitrile/dichloromethane for 4 h and then centrifuged for 5 min. The supernatant was transferred into a glass vial and stored at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h to remove any fat. The organic layer was taken and evaporated to dryness at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the dry residue was reconstituted with 1.00 mL of acetonitrile for further analysis by GC-MS.

Monolith Capillary Preparation. The silica monolith was synthesized via a sol–gel technique by Kobayashi et al.²⁵ with some modifications. After pretreatment with 1 mol L^{-1} NaOH solution, the

fused silica capillary was filled with the formulation solution, tightly sealed at both ends, heated at 40 °C for 24 h, then raised to 120 °C, and kept for 6 h. After cooling, it was rinsed with ethanol and then dried in an oven at 60 °C for 3 h.

The synthesized monolith in a capillary was morphologically examined by using a Quanta 450 scanning electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA), whereas the thermal gravimetric analysis (TGA) profile of the silica monolith was measured using a TG7 thermogravimetric analyzer (PerkinElmer, Boston, MA, USA).

Phthalate Determination. Phthalates in the liquid extract were determined by using a 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a 5975C inert XL mass spectrometer (Agilent Technologies). A 5.0 cm fabricated silica monolith capillary was coupled between the GC injection port and a 0.25 mm i.d. \times 30 m \times 0.25 μ m ZB-5HT fused silica capillary column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) by using a 4.0 cm glass connector. The injector temperature was set at 290 °C in splitless mode with 1.2 mL min⁻¹ He carrier gas flow. The oven temperature was initially programmed at 120 °C for 1 min, ramped to 300 °C at 20 °C min⁻¹, and then held at 300 °C for 10 min. Both the ion source and transfer line temperature were maintained at 300 °C. The target compounds were determined in both full scan and selected ion monitoring (SIM) mode in a mass range of m/z 50–450.

RESULTS AND DISCUSSION

For comparison of efficiency of solvent in liquid extraction, two organic solvents, namely, hexane and acetonitrile, were chosen on the basis of high solubility of phthalates.^{10,13,26} Both solvents gave similar results, but in our work hexane was more appropriate because its higher volatility gave a better solvent evaporation after liquid extraction.

Feasibility of Using Fabricated Silica Monolith as an Adsorbent. As different monolithic material affects the properties and performance in extraction and separation, different types of monolithic material were therefore investigated to obtain the most suitable for use as an adsorbent. In our previous work silica monolith showed very good performance of trapping fat and nonvolatile components prior to chromatographic analysis of nitrosamine in the extract from sausage after superheated water extraction.²³ Silica monolith in a capillary was then synthesized and the monolithic structure confirmed by scanning electron microscopy (SEM) to be interconnected particles of about 2 μ m and macroporous size of approximately 5 μ m. The thermal behavior of silica monolith studied by TGA showed dehydration of weakly adsorbed water on the silica surface at approximately 150 °C, whereas the loss of the organic compounds or unreacted TMOS and dehydroxylation occurred between 150 and 600 °C.²⁷ This confirmed that the silica monolith was stable up to 600 °C and, hence, it can possibly be used for high-temperature separation in a GC oven. In our previous work the maximum allowance length of silica monolith capillary to connect to the ZB-5HT column without an overpressure was 5 cm. To confirm the feasibility of using silica monolith in a capillary as an adsorbent, a comparison between with and without the silica monolith connected between the injection port and the analytical column was performed by comparing the peak areas of 1 μ L each spiked phthalate in the liquid extract. From the two-tailed *t* test, the peak areas of each analyte separated with/without silica monolith were not significantly different, although the peaks with a presence of the monolith were slightly broader than those without the monolith. This broadening was most probably a result of the polar silica monolithic surface acting as a stationary phase for adsorption–desorption kinetics of the analytes and the nonequilibrium mass transfer of the analytes

between the polar silica solid surface and gas phase. A batch-to-batch variation or the variability of quality of capillary monolith synthesized between batches in different days was found only very small. The study of capillary-to-capillary reproducibility of silica monolith capillary demonstrated that the relative standard deviations of peak area of the six phthalates ranged between 3.03 and 4.88%, showing there was insignificant variation of the monolith synthesized between two or more batches, similar to SPME, for which variation was <6% RSD.²⁸

Comparison of chromatograms of real prawn samples obtained with and without the silica monolithic capillary adsorbent in Figure 1 demonstrates the effective removal of

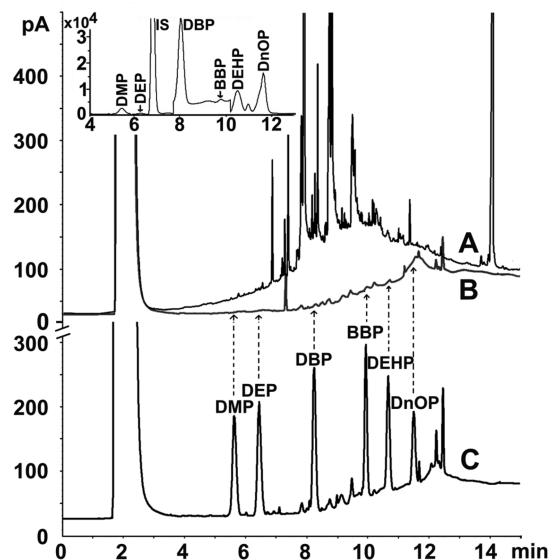


Figure 1. (A) Chromatogram of prawn sample extract analysis with an absence and (B) presence of silica monolith capillary before the ZB-5HT column coupled with GC-FID. (C) Chromatogram of a 100 ppm phthalate spiked prawn extract with a silica monolith coupled with the ZB-5HT column. (Inset) Chromatogram of 500 ppb spiked phthalate determined by GC-MS.

coextracted compound from the sample. A much clearer chromatogram was obtained when the monolith capillary was used (Figure 1B) compared with the one obtained without the capillary connection (Figure 1A). Figure 1C illustrates a clear chromatogram of 100 ppm phthalate spiked prawn extract, showing well-resolved peaks of all analytes with low background, thereby proving the selectivity of the method.

To examine the capability of a capillary monolith to be reused as the adsorbent, several repeated injections of the extract of bivalve from the most highly matrix-contaminated representative sample, was performed. The peak areas of six phthalates for seventh injection were obviously higher (26–40%) than those for the first injection. This was possibly caused by the fat matrix deposit onto the monolith; a shiny coagulation similar to one of fat injection was observed under SEM. The silica monolith capillary had a capacity limit in trapping of coextracted matrix; the maximum tolerable injection number of the bivalve extract was therefore six.

Efficiency of the Method. To test the efficiency of the method of coupling between silica monolith capillary and the analytical column, some method validation features were measured, such as linearity, detection limit, recovery, and precision. For all selected phthalates the calibration curves of

Table 1. Validation Parameters of Volatile Phthalates Determined by Using Silica Monolithic Capillary Connected with GC-MS

analyte	intercept, <i>a</i>	slope, <i>b</i>	<i>r</i> ²	LOD (ng g ⁻¹)	% recovery ± SD (<i>n</i> = 3)			
					bivalve	prawn	squid	fish
DMP	−14864	137329	0.9995	6.8	81.2 ± 0.2	71.4 ± 0.2	67.2 ± 1.8	52.7 ± 3.0
DEP	−426.14	133984	0.9996	7.9	82.8 ± 0.3	76.0 ± 0.2	68.2 ± 1.6	68.7 ± 2.4
DBP	−49012	224795	0.9985	9.5	80.1 ± 0.5	80.2 ± 0.2	68.4 ± 1.7	74.9 ± 1.8
BBP	−8079	69856	0.9984	10.0	82.0 ± 0.2	81.1 ± 0.4	75.3 ± 1.4	71.8 ± 1.6
DEHP	−19571	115429	0.9982	9.0	85.5 ± 0.2	84.1 ± 0.3	77.8 ± 2.4	68.5 ± 1.7
DnOP	−44545	161505	0.9972	9.3	84.4 ± 0.2	84.0 ± 0.4	94.2 ± 4.4	64.0 ± 1.6

Table 2. Phthalate Concentrations in Fresh Seafood Samples, Except Preserved Prawn, Analyzed by Using a Silica Monolith Capillary Connected with GC-MS

sample	concentration (ng g ⁻¹) ± SD, <i>n</i> = 3			
	DBP	BBP	DEHP	DnOP
fish 1	21.2 ± 6.7	11.3 ± 1.2	48.0 ± 8.2	nd
fish 2	12.6 ± 2.5	nd	nd	9.7 ± 0.3
fish 3	13.6 ± 3.1	13.0 ± 1.7	nd	nd
fish 4	34.1 ± 7.3	nd	nd	nd
fish 5	27.2 ± 3.1	30.1 ± 1.5	nd	nd
bivalve 1	62.7 ± 5.1	10.9 ± 0.6	nd	nd
bivalve 2	79.0 ± 12.8	19.6 ± 5.9	nd	nd
prawn 1	31.0 ± 4.4	10.6 ± 2.4	9.6 ± 0.4	73.1 ± 4.8
prawn 2	nd	nd	nd	89.1 ± 7.6
prawn 3	11.0 ± 3.3	nd	nd	78.5 ± 13.2
preserved prawn 1	375.1 ± 51.4	52.2 ± 11.2	385.2 ± 9.9	344.7 ± 82.2
preserved prawn 2	263.5 ± 67.8	53.1 ± 1.2	nd	243.7 ± 27.7

the concentrations between 0.01 and 20 ng injected to the monolith coupled with the ZB-5HT column were linear with correlation coefficients of >0.997. The detection limits of six phthalates were investigated by applying extremely low concentrations of standard phthalates to the silica monolith coupled to the ZB-5HT column and ranged between 6.8 and 10.0 ng g⁻¹ (Table 1).

To evaluate extraction efficiency, six deuterated phthalates fortified in the seafood samples were examined for recoveries, resulting the ranges of 80–85, 71–84, 53–75, and 67–94% for bivalve, prawn, fish, and squid, respectively (Table 1). Comparison of these matrices showed that the fish sample gave the lowest recoveries for all phthalates, which possibly resulted from the higher protein content in fish than in the other matrices. During liquid extraction in the aqueous–hexane liquid mixture, despite NaCl addition and dispersion by ultrasonication, the fish sample was agglomerated and became glue-like. It is therefore likely that the phthalates were more difficult to release from this matrix. Traces of remaining phthalate in the monolith adsorbent trap prior to chromatographic separation could also lead to low recoveries, as evidenced by an increasing background signal in the mass spectrum after several runs. The high background was also contributed by some unidentified interferences in the matrix extract.

Application to Real Samples. The proposed method was applied to determine phthalates in real seafood samples from several matrices, for example, bivalve, squid, fish, and prawn, collected from different locations in Thailand (Table 2). Four phthalates, namely, DBP, BBP, DEHP, and DnOP, were detected in all samples at very low parts per billion levels,

whereas DMP was found in only in one fish sample (fish 2) at 30 ng g⁻¹ and no DEP was detected in any sample. The concentrations of phthalates in all samples were in the range of the method detection limit (MDL) of phthalates in meat of 0.9–105 ng g⁻¹, according to the FERA method. A comparison of phthalate concentrations obtained by our method and the standard operating procedure of FERA is shown in Figure 2 for bivalve sample. The detection limits of the proposed method (6.8–10.0 ng g⁻¹) were within the range of those of the FERA method (0.9–105 ng g⁻¹). A *t* test for significance analysis was performed, resulting in experimental *t* values for analyte concentrations of 0.21, 1.07, 0.06, and 1.44 for DEP, DBP, BBP, and DEHP, respectively.

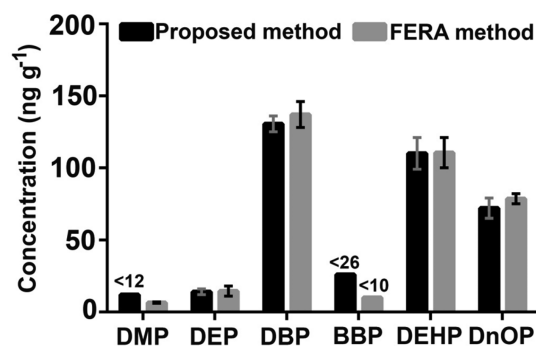


Figure 2. Comparison of phthalate concentrations from bivalves obtained between the proposed and the FERA method. The observed DMP concentration determined using the proposed method was <12 ng g⁻¹, and BBP by the proposed and FERA method was <26 and <10 ng g⁻¹, respectively.

DEHP, and DnOP, respectively. DMP and BBP were not detectable, thus giving no *lfl* values. All of the experimental *t* values were lower than the critical value ($t_{\text{crit}, 0.05, 4} = 2.78$) at the 95% confidence limit, which confirmed no significant differences exist between the results obtained by the proposed method and the FERA method.

Comparison with Other Methods. Despite the loss of some analytes during the analysis as discussed above, the proposed method provided more advantages. The amount of sample was only 1.0 g, lower than sample requirements for other methods.^{24,29–31} Most methods required between 5 and 50 g,^{24,29,30} whereas the method of Williams et al. for fish samples used up to 100 g.³¹ For determination of phthalates in food, the extraction and cleanup steps are the most challenging parts. LLE is the most frequently used among all reported methods because of its convenience and effectiveness. However, for phthalate determination in food extraction by other methods, organic solvents, such as hexane,¹⁰ pentane,³² dichloromethane, and mixed solvents,^{29,30,33} were required with high volumes of between 15 and 100 mL. For example, 50 mL of mixed solvent was needed for complete extraction of fatty food (bacon and cheese).³³ The volume of hexane in the liquid extraction (LLE) step of our proposed method was only 5.0 mL, implying 10 times lower solvent consumption. In our approach the liquid extraction time was 30 min per sample, and only about 1 h was normally required to complete the sample preparation. Extraction of multiple samples within 1 h was also achieved with the proposed method, compared with >4 h of preparation period reported by Bradley et al.³⁰ During the cleanup step, gel permeation chromatography (GPC) was also included in the other methods to remove interfering fats and other coextracted components.^{10,31,34,35} GPC and LLE often consume large volumes of hazardous organic solvents, require long pretreatment time, and give high blank values. SPE was more preferable to solvent extraction,¹⁰ but it utilizes nonreusable materials or devices. Such problems were overcome when the silica monolith capillary adsorbent was employed in this work, in addition with the benefit that one piece of monolithic adsorbent could be reused at least five times (or five samples). The cost of adsorbent was also much reduced, owing to the low amount of the inexpensive fabricating reagents, and tiny capillary, gaining virtually no produced waste. SPME employed in Kataoka's method is simple, fast, solvent free, and practical, but has several drawbacks, such as high cost and sample carry-over.¹³ These limitations can be overcome by using the silica monolith capillary adsorbent. Moreover, online extraction, preconcentration, and determination of multiple samples were achievable, leading to rapid high-throughput analysis with only a one-step preparation. Although the FERA method does not require any adsorbent or further extraction,²⁴ it was found that the analytical column was highly contaminated and eventually deteriorated after several injections. Coupling the monolith capillary adsorbent with the analytical column therefore also reduces the analysis cost by extending the column lifetime.

GC-MS is the most popular technique for phthalate determination because of its higher sensitivity than flame ionization detection (FID). The limit of detection (LOD) of the proposed method determined by GC-MS was in the range of 72.8–85.4 ng g⁻¹, which is the same as those of the other methods employing the same detection technique reported using FERA,²⁴ Bradley et al.,³⁰ and Cirillo et al.,²⁹ but higher than those of Arnold et al.³⁴ (0.2–3.7 ng kg⁻¹ in solid food)

and Guo et al.¹⁰ (0.29–0.61 ng g⁻¹ in ham and sausage). The higher LOD than expected were possibly occurred from cross-contamination from chemical, materials, and laboratory equipment, which is a common problem in phthalate analysis methods;⁸ a phthalate-free sample in this work therefore did not exist. Recoveries of the proposed method were between 72.8 and 85.4%, which is in the same range as those of FERA,²⁴ and Bradley et al.³⁰ The degree of recovery was lower than those reported by Petersen et al.³² and Lau et al.,³³ who obtained 90–100%.

In conclusion, a method for the determination of six phthalates in seafood samples utilizing a simultaneous sample pretreatment procedure, comprising liquid extraction with *n*-hexane and adsorption by using silica monolith, coupled with GC-MS was developed. The results of recovery and coefficient of variation indicated the method is accurate and precise for routine analysis of real samples with different seafood matrices and sources. Phthalates in collected seafood were detected in a low parts per billion level. Compared with the others,^{24,30–35} the proposed method was superior as it facilitated simultaneous extraction, preconcentration, and determination in one step with rapidity, simplicity, reliability, and low cost. It lends itself to high-throughput analysis of organic compounds from the environment at trace level in the presence of high levels of matrix contamination in bivalves and other seafood samples.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(O.C.) E-mail: fsciopc@ku.ac.th. Phone: (662) 562-5555, ext. 2136. Fax: (662) 579-3955.

Funding

Financial support from the Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI), the Thailand Research Fund (TRF) (Project RSA5580019), and the National Research Council of Thailand is gratefully acknowledged.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, for the studentship of P. Khawmodjod and the Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, for instruments and facilities support.

ABBREVIATIONS USED

DMP, dimethyl phthalate; DEP, diethyl phthalate; DBP, dibutyl phthalate; BBP, benzylbutyl phthalate; DEHP, di(2-ethylhexyl) phthalate; DnOP, di-*n*-octyl phthalate

REFERENCES

- (1) Mtibe, A.; Msagati, T. A. M.; Mishra, A. K.; Mamba, B. B. Determination of phthalate ester plasticizers in the aquatic environment using hollow fibre supported liquid membranes. *Phys. Chem. Earth* **2012**, 50–52, 239–242.
- (2) Gu, Y.-Y.; Yu, X.-J.; Peng, J.-F.; Chen, S.-B.; Zhong, Y.-Y.; Yin, D.-Q.; Hu, X.-L. Simultaneous solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of 15 endocrine disrupting chemicals in seafood. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, 965, 164–172.
- (3) Munshi, A. B.; Karim, N.; Shaikat, S.; Hashmi, D.; Boardman, G. D.; Flick, G. J. Toxicity of phthalate esters in fish and shellfish from

Virginia beach using matrix solid phase dispersion (MSPD) and GC-MS. *J. Chem. Soc. Pak.* **2013**, *35*, 1463–1471.

(4) Makkliang, F.; Kanatharana, P.; Thavarungkul, P.; Thammakhet, C. Development of magnetic micro-solid phase extraction for analysis of phthalate esters in packaged food. *Food Chem.* **2015**, *166*, 275–282.

(5) Serrano, S. E.; Braun, J.; Transande, L.; Dills, R.; Sathyanarayana, S. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ. Health* **2014**, *13*, 43.

(6) Cao, X.-L. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 21–43.

(7) Mankidy, R.; Wiseman, S.; Ma, H.; Giesy, J. P. Biological impact of phthalates. *Toxicol. Lett.* **2013**, *217*, 50–58.

(8) Fierens, T.; Servaes, K.; Van Holderbeke, M.; Geerts, L.; De Henaauw, S.; Sioen, I.; Vanermen, G. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 2575–2583.

(9) Moreira, M.; Andre, L.; Cardial, Z. Analysis of phthalate migration to food simulants in plastic containers during microwave operations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 507–526.

(10) Guo, Z.; Wang, S.; Wei, D.; Wang, M.; Zhang, H.; Gai, P.; Duan, J. Development and application of a method for analysis of phthalates in ham sausages by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 484–490.

(11) Sun, H.; Yang, Y.; Li, H.; Zhang, J.; Sun, N. Development of multiresidue analysis for twenty phthalate esters in edible vegetable oils by microwave-assisted extraction–gel permeation chromatography–solid phase extraction–gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5532–5539.

(12) Feng, Y.-L.; Zhu, J.; Sensenstein, R. Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 41–48.

(13) Kataoka, H.; Ise, M.; Narimatsu, S. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 77–85.

(14) Pavlovic, D. M.; Babic, S.; Horvat, A. J. M.; Kastelan-Macan, M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 1062–1075.

(15) Peters, E. C.; Ericson, C. Chapter 17: Monolithic stationary phases for the separation of small molecules. In *Journal of Chromatography Library*; Švec, F., Tennikova, T. B., Zdeněk, D., Eds.; Elsevier, 2003; Vol. 67, pp 373–387.

(16) Samanidou, V. F.; Karageorgou, E. G. An overview of the use of monoliths in sample preparation and analysis of milk. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 1–13.

(17) Švec, F. Less common applications of monoliths: preconcentration and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *841*, 52–64.

(18) Motokawa, M.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Jinnai, H.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 53–63.

(19) Sasook, A. *Characterization of Monolithic Column by Inverse Chromatography*; Kasetsart University: Bangkok, Thailand, 2008.

(20) Shintani, Y.; Zhou, X.; Furuno, M.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K. M onolithic silica column for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *985*, 351–357.

(21) Rodríguez, S. A.; Colón, L. A. Investigations of a sol–gel derived stationary phase for open tubular capillary electrochromatography. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *397*, 207–215.

(22) Hara, T.; Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Nakanishi, K.; Tanaka, N. Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7632–7642.

(23) Chienthavorn, O.; Ramnut, N.; Subprasert, P.; Sasook, A.; Insuan, W. Effective and reusable monolith capillary trap of nitrosamine extraction by superheated water from frankfurter sausage. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1240–1246.

(24) *Standard Operating Procedure for Determination of Sixteen Phthalate Diesters in Foodstuffs*; Food and Environment Research Agency (FERA): Sand Hutton, NY, USA, 2009.

(25) Kobayashi, H.; Smith, C.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. Capillary electrochromatography on monolithic silica columns. *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 89–92.

(26) Shen, H.-Y. Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC–MS methods. *Talanta* **2005**, *66*, 734–739.

(27) Silva, R. G. C.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H. New silica gel-based monolithic column for nano-liquid chromatography, used in the HILIC mode. *J. Chromatogr. Sci.* **2012**, *50*, 649–657.

(28) Carrillo, J. D.; Martínez, M. P.; Tena, M. T. Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry: use of deuterated phthalates as internal standards. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1181*, 125–130.

(29) Cirillo, T.; Fasano, E.; Castaldi, E.; Montuori, P.; Cocchieri, R. A. Children's exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and dibutylphthalate plasticizers from school meals. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10532–10538.

(30) Bradley, E. L.; Burden, R. A.; Leon, I.; Mortimer, D. N.; Speck, D. R.; Castle, L. Determination of phthalate diesters in foods. *Food Addit. Contam., Part A* **2013**, *30*, 722–734.

(31) Williams, D. T. Dibutyl- and di-(2-ethylhexyl)phthalate in fish. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 1128–1129.

(32) Petersen, J. H.; Breindahl, T. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit. Contam.* **2000**, *17*, 133–141.

(33) Lau, O.-W.; Wong, S.-K. Determination of plasticisers in food by gas chromatography-mass spectrometry with ion-trap mass detection. *J. Chromatogr. A* **1996**, *737*, 338–342.

(34) Schecter, A.; Lorber, M.; Guo, Y.; Wu, Q.; Yun, S. H.; Kannan, K.; Hommel, M.; Imran, N.; Hunan, L. S.; Cheng, D.; Colacino, J. A.; Birnbaum, L. S. Phthalate concentrations and dietary exposure from food purchased in New York state. *Environ. Health Perspect.* **2013**, *121*, 473–479.

(35) Cavaliere, B.; Macchione, B.; Sindona, G.; Tagarelli, A. Tandem mass spectrometry in food safety assessment: the determination of phthalates in olive oil. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1205*, 137–143.

Effective and Reusable Monolith Capillary Trap of Nitrosamine Extraction by Superheated Water from Frankfurter Sausage

Orapin Chienthavorn,* Narumol Ramnut, Panee Subprasert, Anupop Sasook, and Wimonrut Insuan

Department of Chemistry and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Post Office Box 1011, Chatuchak, Bangkok 10903, Thailand

ABSTRACT: A novel, simple, rapid, and inexpensive method of extraction and cleanup of nitrosamines from frankfurter sausage was achieved with a capillary filled with monolith of either polystyrene-*co*-divinylbenzene (PS-DVB), Polydivinylbenzene (P-DVB), or silica that had been fabricated. The study of capability in trapping nonpolar matrix and monolith capillaries with varied lengths revealed that a silica monolith gave the best result for nitrosamine determination. With an online coupling between superheated water extraction (SWE) and silica monolith capillary connected to a 5% phenyl-methylpolysiloxane column, factors affecting the extraction and determination, namely, sensitivity with and without the monolith, reusability, injection–injection repeatability, capillary–capillary precision, and chromatographic separation, were investigated. This confirmed the feasibility of the method. The optimal length of silica monolith capillary was 30 mm, offering reuse more than 20 times. Separation and quantification of selected volatile nitrosamines were carried out using gas chromatography (GC) coupled with either a flame ionization detector (FID) or mass spectrometer (MS). The overall extraction and determination method determined by GC–MS allowed for a recovery of 75–88% with a <5% relative standard deviation (RSD) and detection limit of 2–5 ng of injected nitrosamine.

KEYWORDS: frankfurter sausage, monolith, nitrosamine, silica monolith, superheated water extraction

INTRODUCTION

In chemical analysis, the sample preparation is an important process to cleanup and preconcentrate an analyte to improve efficiency of the method and instrument. Food is one of several samples that frequently require tedious preparation for determination because of its complicated matrix. In many food products from livestock, fat is the main matrix that needs elimination prior to analysis. Several standard extraction methods involving fat removal are liquid–liquid extraction (LLE), distillation, and solid-phase extraction (SPE).^{1–4} Although SPE has been widely used for extraction and preconcentration of analytes from food samples, a few drawbacks of conventional SPE limit the requirement that an extraction method should be as fast and cheap as possible.⁵ As a general rule, solid-phase material should be well-packed before extraction and the method must be optimized. Single use of a SPE column before disposal also leads to high waste volume and cost. Moreover, many extraction steps are required before reaching a suitable concentration of extract, of which only a small proportion is actually introduced for quantitative determination.

The motivation of this study originated from a tedious process in sample cleanup and preconcentration prior to the determination of volatile nitrosamines by gas chromatography (GC). The analysis of nitrosamine compounds in frankfurter sausage samples extracted by superheated water extraction was described in our previous study.⁶ Because matrix interference, such as fat and pigment, typically exists in sausage samples, elimination of these interferences was then performed by a conventional SPE. Because of the drawbacks of conventional SPE as well as the current trend in analytical chemistry to miniaturize an extraction system driven by environmental

concerns, the steadily increasing costs of solvent disposal, and limited amounts of samples, monolithic adsorbent in a capillary or so-called “monolith capillary” was proposed as an alternative cleanup and preconcentration method.

In chromatography, the monolith is a stationary-phase material consisting of a single piece of solid with interconnected skeleton and flow-through pores. Its “cauliflower-like” porous structure provides a highly effective surface area for adsorption, and the interconnected flow-through pores give benefits in high column permeability.^{7,8} Monolithic materials are divided into two categories: polymer based and silica based.^{9,10} Organic polymer monoliths are basically synthesized by a radical polymerization process, whereas those of silica are prepared through a sol–gel mechanism.^{11–13} Numerous applications of both types of monoliths have been focused on high-performance liquid chromatography (HPLC)^{8,14,15} and capillary electrochromatography,^{16,17} while the number of applications in GC is fairly limited.¹⁸ The use of monolithic material in an indirect chromatographic application, for example, its application for sample preparation to concentrate and purify analytes from liquid matrix, or SPE has been studied.^{12,19} These functions were based on physical adsorption between chemistry of the supporting material and analyte, for which the adsorbent should possess an extremely high surface area. The characteristics of the sorbent are therefore a key parameter concerning selectivity and capacity. In this study, three monolithic materials, polystyrene–divinylbenzene, polydivinylbenzene

Received: August 17, 2013

Revised: January 15, 2014

Accepted: January 17, 2014

Published: January 17, 2014

and silica, were of interest as a sorbent trap to extract nitrosamines from the liquid extract of frankfurter sausage after SWE. Because PS-DVB and P-DVB possess high hydrophobicity and thermal stability, they are likely to absorb fat and nonpolar matrix. Silica was chosen because it was successfully used as a fat retainer²⁰ and also provides a high thermal stability.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Sample. For polymer-based monolith capillary synthesis, γ -(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (98.0%) obtained from Acros (Morris Plains, NJ) and glacial acetic acid from BDH (Poole, U.K.) were used as silanization solutions. Styrene monomer (99.0%) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), and divinylbenzene monomer (80.0%) was from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Decanol (99.0%) from Acros (Morris Plains, NJ), tetrahydrofuran (99.9%) from Fisher (Loughborough, U.K.), and dodecanol (>99.5%) from Fluka (Buchs, Switzerland) were used as porogenic agents. Dibenzoyl peroxide (75%) from Acros (Morris Plains, NJ) was employed as an initiator. For silica-based monolith capillary synthesis, polyethylene glycol [MW of 10 000 g/mol; analytical reagent (AR) grade] was bought from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), while urea of analytical grade and tetramethoxysilane (98.0%) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Both polymeric and silica-based monoliths were synthesized inside a 0.32 mm inner diameter \times 10 m bare fused silica capillary tubing with polyimide coating purchased from SGE (SGE Analytical Science, Melbourne, Victoria, Australia).

Standard nitrosamines, namely, *N*-nitrosodiethylamine or NDEA (99.0%) from Fluka (Buchs, Switzerland), *N*-nitrosopiperidine or NPIP (99.0%) and *N*-nitrosopyrrolidine or NPYR (99.0%) from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), and *N*-nitrosomorpholine or NMOR (5.0 mg/mL in methanol) from Supelco (Bellafonte, PA) were used in this study. Each 1.0 mg/mL standard stock solution was prepared in methanol. *N*-Nitroso-*di-n*-propylamine or NDPA from Supelco (Bellafonte, PA) was used as an internal standard for quantification. Other chemicals were of analytical grade.

Frankfurter sausages from a local supermarket in Bangkok were chopped and homogenized. A 1.0 g sample was fortified with 100 μ g of each nitrosamine, rehomogenized, and left at room temperature for 10 min.

Monolith Capillary Preparation. *Silanization of the Inner Wall of the Capillary.* The silanization method described by Coufal et al. was used. In brief, silanization solution was prepared from 1.817 g of glacial acetic acid mixed with 20 μ L of γ -(trimethoxysilyl)propyl methacrylate in a 5.00 mL volumetric flask and adjusted to the volume by decanol. The solution was filled into a 0.32-mm inner diameter \times 100 cm bare fused silica capillary, where both ends of the capillary were subsequently sealed with a septum. The sealed capillary was then incubated in an oven at 60 °C for 20 h. After cooling to room temperature, it was rinsed with acetone to remove the silanizing solution, dried with a gentle flow of nitrogen gas for 1 h, and finally cut into 10.0 cm pieces.

PS-DVB and P-DVB Monolith Capillary. A PS-DVB polymerization mixture consisted of 200 μ L of styrene monomer, 200 μ L of divinylbenzene, 520 μ L of decanol, 80 μ L of tetrahydrofuran porogen, and 10 mg/mL dibenzoyl peroxide initiator. The formulation of the PS-DVB polymerization solution used the method by Premstaller et al.^{21,22} The P-DVB polymerization solution was a mixture of 400 μ L of divinylbenzene monomer, 520 μ L of dodecanol, 80 μ L of toluene, and 10 mg/mL dibenzoyl peroxide, and its formulation was from the method by Svec and Kurganov.¹⁸ Either polymerization solution was filled in the 10 cm silanized capillary for about 5 cm. The capillary was sealed at both ends and kept at 70 °C for 24 and 20 h for PS-DVB and P-DVB synthesis, respectively. To remove the porogen and monomeric residues, the fabricated monolith in capillary was flushed with either acetonitrile or methanol at a flow rate of 10 μ L/min for 3 h and then dried with nitrogen gas flow.

Silica Monolith Capillary. A fabrication method for silica monolith capillary was adapted from one previously reported by Tanaka et al.⁹ In brief, a 0.32 mm inner diameter \times 100 cm bare fused silica capillary was pretreated with 1 M NaOH, and both ends were tightly sealed with a septum. The filled tubing was kept at 40 °C for 6 h, rinsed with deionized water, and dried with nitrogen gas. The sol-gel solution for silica monolith synthesis was a mixture of 400 μ L of tetramethoxysilane, 0.088 g of polyethylene glycol, and 0.09 g of urea in 0.01 M acetic acid. The solution was stirred in an ice bath for 45 min and then filled into the pretreated capillary that was subsequently heated at 40 °C for 24 h. The temperature was then raised to 120 °C for 6 h. After cooling, the monolith in capillary was washed with methanol and then dried with nitrogen gas. The fabricated PS-DVB, P-DVB, and silica monolith capillaries were cut perpendicular to the cross-section into 0.50 cm long pieces, and the specimens were subjected to scanning electron microscopy (SEM) using a JSM-5600 SEM microscope (JEOL, Japan) at 20 kV.

SWE. The SWE system was similar to the one described previously.^{6,23} In brief, degassed double-deionized water was delivered by a ConstraMetric 3200 HPLC pump (LDC Analytical, Riviera Beach, FL) passing through a 1 m \times 0.51 mm inner diameter stainless-steel preheating coil (Alltech Chromatography, Columbia, MD) to a 15 cm \times 4.6 mm inner diameter stainless-steel extraction cell containing 1.0 g of fortified frankfurter sausage sample. Glass wool was put at both ends of the cell, where 2 μ m stainless-steel frits and screw caps were subsequently mounted. Both the preheating coil and extraction cell were heated in an oven at 140 °C for 5 min of static time. The end of the outlet tubing was crimped to control pressure to more than 300 psi. After that, the water was reflowed and the aqueous extract was cooled using a stainless-steel cooling coil wrapped with aluminum fins. The aqueous extract was collected for 10 mL in a vial containing 2 g of NaCl and 2 mL of dichloromethane (DCM). The cloudy mixture in the vial was transferred to centrifuge at 1100 rpm for 7 min, and the DCM layer was filtered and dried with anhydrous Na₂SO₄. To preconcentrate, the organic phase was purged with nitrogen gas and then adjusted to 100 μ L with the solvent.

Monolith Capillary GC Setup. A 1 μ L sample of the organic extract was subjected to extraction, separation, and quantification by coupling a fabricated monolith sorbent with GC. To set up the connection, a 0.32 mm inner diameter \times 5.0 cm bare fused silica tubing was connected with an injection port of a HP5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) at one end and the other end was connected with a fabricated monolith capillary, where a glass connector led to a 0.32 mm inner diameter \times 0.52 μ m film thickness \times 25 m HP-5 column (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). The temperature program was started by ramping from 40 to 80 °C at 7 °C/min, held for 8 min, then increased to 200 °C at 15 °C/min, and maintained for 5 min. Either a flame ionization detector (FID) or HP 5989B mass spectrometer (MS, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) in an electron impact mode was employed as a detector. The injector and FID temperatures were maintained at 250 and 280 °C, respectively. The temperatures of the ion source and quadrupole mass analyzer were 200 and 100 °C, respectively. During optimization of the monolith sorbent capillary, the FID was operated with nitrogen carrier gas and the split ratio at the injection port was 1:15. For quantification by using GC-MS, the operation was in splitless mode and nitrogen was replaced with helium carrier gas.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of Monolith. The types of primarily studied monolith for fat adsorbent were chosen from two individual properties, namely, polarity and thermal stability. The monolith should be adequately nonpolar to retain fat while releasing the polar analytes. It must also have sufficiently high thermal stability to tolerate heat in the oven during the desorption step. When the monolith capillary was connected to the analytical column, the column head pressure increased, particularly for the polymeric monolith. The pressure was measured from the

column head pressure gauge in the front panel of the GC instrument. The maximum scale of the gauge corresponded to 40 psi. Although a high surface area was obtained with a long monolith capillary, the longer the monolith, the higher the column head pressure, and the gas flow stopped at the maximum allowed length for different types of monoliths. At high carrier gas flow through the column, increased resistance occurred, and as a consequence, a higher pressure was needed to drive gas through both the monolith capillary and analytical column to obtain the required column flow rate. The maximum pressure was restricted to 40 psi because of a limitation of the GC instrument. Figure 1 shows the average column head

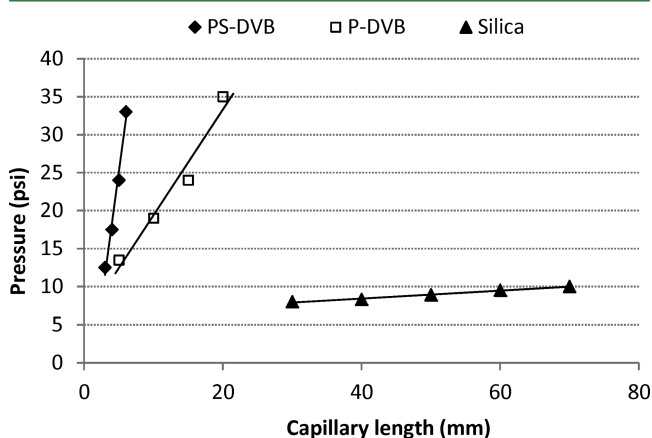


Figure 1. Average column head pressure for the GC column connected with different types of synthesized monolith capillary.

pressure when connected with each type of monolith with the flow of 1.4 mL/min. No flow occurred for PS-DVB and P-DVB monoliths of more than 6 and 20 mm, respectively.

With the coupling of the PS-DVB monolith to the analytical column, nitrosamines did not separate well. For the 5–6 mm long monoliths, baseline drift occurred and all compounds gave broad and tailing peaks, presumably as a result of their strong interaction with the polymeric phase. Besides, NDPA and NPYR peaks were completely overlapped. For 4.0 and 3.0 mm monoliths, a better peak shape was obtained but NDPA and NPYR peaks remained completely overlapped (Figure 2). Because of thermal stability and hydrophobic properties similar to those of PS-DVB, P-DVB was investigated as a nonpolar monolith sorbent trap. After varying the length of polymer monolith from 5 to 20 mm, the best separation in this experiment occurred using a 5 mm P-DVB monolith. Despite the higher column permeability and effective surface area than those of PS-DVB, an improved peak shape was obtained but the separation of NPYR and NDPA was still not possible. It was then concluded that both polymer monoliths gave rather poor performance in retaining fat. According to our previous study⁶ in which silica sorbent was primarily used as a lipid retainer, a silica monolith was then synthesized and studied, despite the fact that it has rather high polarity. A scanning electron micrograph of the silica monolith in the capillary showed a skeleton with large through pores, and the microglobule diameter was on average 1 μm . The specific surface area was 32–43 m^2/g determined by inverse size-exclusion chromatography.²⁴ Because of large macropores, silica monoliths provide several times higher column permeability than the two polymer monoliths and permeability of silica monolith was not affected by the capillary length. The flow was almost constant when

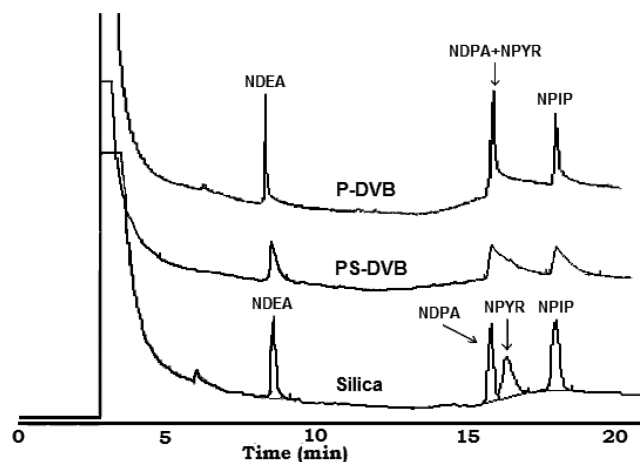


Figure 2. Separation of nitrosamines on a HP-5 column coupled with online sorbent of 5 mm P-DVB and 3 mm PS-DVB and 30 mm silica monolith sorbent. Temperature program: 60–100 $^{\circ}\text{C}$ at 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, maintained for 8 min, then raised to 120 $^{\circ}\text{C}$ at 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and maintained for 5 min.

increasing the capillary length. This led to the feasibility of using a very long silica capillary. Better separation of nitrosamines was obtained with a short silica monolith, owing to the lower interaction of nitrosamines with silica sorbent. Separation of all nitrosamines was achieved for the silica monolith, although the NPYR peak was rather broad. Gradually reducing the monolith length from 70 to 60, 50, and 40 mm improved both the peak shape and separation. A 30 mm long monolith gave the most favorable separation, and the chromatogram is shown in Figure 2. Further reducing sorbent capillary length likely caused poor nonpolar matrix trapping, thus affecting the separation efficiency of nitrosamines.

Capability and reusability of a silica monolith capillary as a nonpolar sorbent trap was studied to investigate the feasibility of multiple use before disposal. Figure 3 shows the chromato-

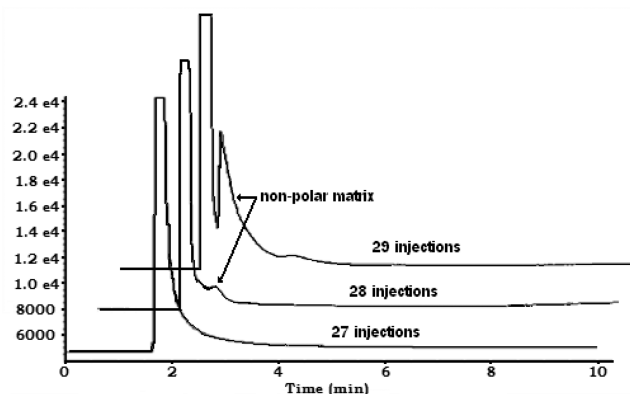


Figure 3. GC chromatograms obtained from different numbers of repeated injections of unfortified frankfurter extract on 30 mm silica monolith connected with a HP-5 column.

gram of the nonpolar matrix of frankfurter sausage. The extract was repeatedly injected onto the monolith coupled with the HP-5 column, the peak area of the nonpolar matrix was observed after 27 injections for a 30 mm long silica monolith (Figure 3). The number of repeated injections was also dependent upon the amount of contaminating fat, and for our sample, the fat content from the frankfurter sausage package

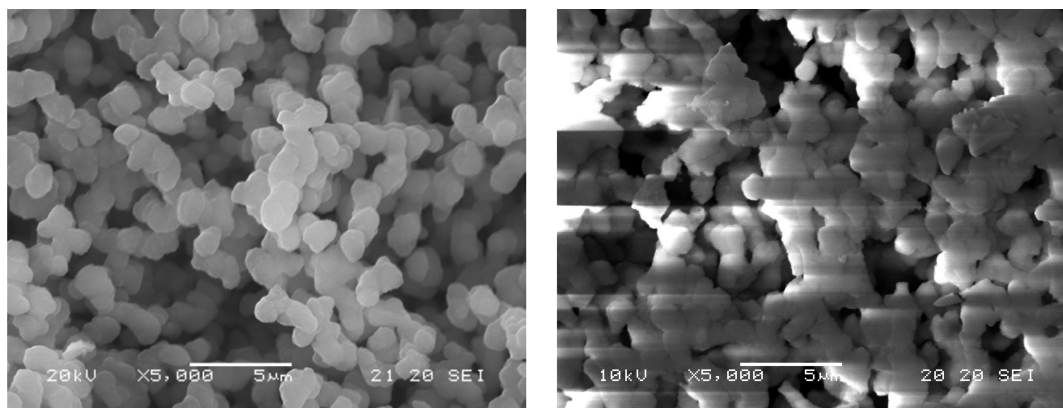


Figure 4. Scanning electron micrograph of silica monolith (a) before and (b) after use as a sorbent trap for frankfurter extract.

label was 30% by weight. The sample of absorbed fat on the monolith after 30 injections was also subjected to SEM (Figure 4), confirming that the deposit of fat and other nonpolar matrix covered the monolithic skeleton. The deposition might occur from both condensation and adsorption of the volatile fat and other nonpolar components onto the silica surface, because the operating temperature was lower than the smoke point of lard (188 °C). It was then concluded that the reusability of a 30 mm fabricated silica monolith capillary as a sorbent trap for a fat matrix was up to 27 times. In practice, for prevention of fat leachate reaching an analytical column, the number of reuses should be reduced by a quarter or to about 20.

Application to Real Samples. When the silica monolith trap was connected to the HP-5 analytical column, the elution order of NPYR and NPDA was obviously swapped, in comparison to the one without the silica monolith. NPYR changed the retention with the silica trap, and its peak shape was quite broad. The phenomenon possibly occurred from an increased dipole–(induced) dipole interaction of NPYR to the silica surface, because NPYR is more polar than the other chosen nitrosamines. However, the interaction that caused the broad peak was traded off by better separation between the NPYR and NDPA peaks, giving benefits to the overall nitrosamine separation.

A two-tailed *t*-test also revealed no significant difference in the average peak area of each nitrosamine obtained from its separation on the analytical column with and without the silica monolith trap. The *|t|* values of NDEA, NPYR, NPIP, and NDPA were 0.1532, 0.5815, 0.6317, and 0.2820, respectively, lower than the *t*-critical value of 4.30 at the 95% confidence limit. A 20 µg/g fortified sausage extract was repeatedly injected onto the same capillary and different capillaries to show the reliability of the method for each nitrosamine. The percent relative standard deviations (%RSDs) of an average area ratio of each analyte to the internal standard showed very good precision for injection–injection (0.79–1.46%) and reasonably good precision for capillary–capillary (2.4–6.0%) experiments, and %RSDs of average retention time of both comparison tests were very good (0.09–0.22%). Such results confirm that fat adsorption on the silica monolith did not significantly affect either the quantification or retention of nitrosamines.

Efficiency of the extraction and determination method was assessed by an investigation of detection limits and percent recovery of all analytes. The detection limits of nitrosamine were found to lie in a range of 2.1–5.4 ng injected for all components. The detection limits of all analytes obtained was

not as low as expected, probably because of the small amount of sausage packed in the extraction cell and an insufficiently high sensitivity of the HP 5989B mass spectrometric detector used in the work. It was then postulated that the detection limits could be reduced using more sensitive and selective detectors, such as a tandem mass spectrometric detector (tandem MS) and thermal energy analyzer (TEA).

The recoveries of nitrosamine extraction from frankfurter sausage using SWE coupled with monolith sorbent capillary were compared to SWE–conventional SPE in our previous study⁶ and determined by GC–MS analysis. The recovery of nitrosamines was in a range of 74.7–88.4%, which lies within the acceptable range, and precision of the coupling method was satisfactory, varying between 2.09 and 3.85%. Although the results showed the same trend for both methods, the recovery obtained from SWE–conventional SPE was slightly higher than those from SWE–silica monolith: about 7% for NPYR, 10% for NDEA, and 18% for NPIP. Silica monolith has obviously proven to be the most optimal monolith adsorbent for our purpose. No additional ions of significant relative abundance were detected in those spectra measured with the silica monolith capillary coupled to the HP-5, indicating that the method was very clean with no interference with similar retention and fragmented mass.

The coupling method of SWE with a silica monolith capillary for nitrosamine determination from frankfurter sausage in our present work was compared to other extraction methods and our previous work for several meat products, as shown in Table 1. Although the extraction efficiency, represented by percent recovery, of the proposed method was close to those of other methods,^{2,25,26} this method gave more advantages by reducing solvent consumption, amount of sample, and analysis time. For example, in the method by Byun et al.,³ up to 600 mL of DCM was consumed per sample for additional extraction after distillation. The necessary organic solvent volume for the methods by Yurchenko et al.^{25,26} and our previous classical SPE⁶ were 52, 72, and 30 mL, respectively. The total volume of extracting organic solvent used in this work was significantly reduced at less than 3 mL, related to a fast preconcentration step, compared to those methods. The required amount of sample was also significantly reduced in this work. Only 1 g of food sample was subjected to the overall preconcentration and cleanup process, while the amount was 2–200-fold larger for the other techniques.^{2,27–35}

Some reference methods require several steps of sample preparation and are therefore time-consuming. For example,

Table 1. Method Comparison for Determination of Nitrosamine from Different Meat Matrices (Adapted from Ref 6)

sample matrix	preparation method	analytical method	sample mass (g)	percent recovery (%)	detection limit	reference
pork luncheon meat, pig liver	steam distillation (alkali and acid), electrochemical reduction, and amine derivative method	HPLC	200	42–77 yield of derivative	1–10 µg/kg	27
frankfurter sausage	supercritical CO ₂ coupled with SPE (Florisil)	GC–TEA	2.5	84.3–104.8		30
sausages	two-step SPE with Extrelut and Florisil	GC–TEA	6.0	40–100	0.3 ppb	31
fresh and preserved food	liquid–liquid extraction with DCM and SPE with basic alumina	GC–TEA	10.0	60–90	0.1–0.5 µg/kg	32
cured ham, bacon, and sausage	flow-injection method (on the basis of photochemical cleavage of the N–NO bond) and then nitrite was detected	DAD	2.0	91.6–105.8	6.0 ng/mL	28
meat products	steam distillation, extraction with DCM, and denitrosation	HPLC with fluorescence	80–100	72–76	0.7–2.2 ng	2
canned sausage	steam distillation (rotary vacuum evaporator) and SPE with active carbon	MEKC	150	38.2–55.0		29
dried seafood	steam distillation and extraction with DCM	GC–TEA	25	83.2–102.2	0.1 µg/kg	38
fermented sausage	steam distillation on a steam generator and extraction with DCM	GC–TEA	20	87–93	0.1 µg/kg	3
sausage	headspace solid-phase microextraction	GC–TEA	2.5	105–110	3 µg/kg	33
fish sample	two-step SPE with Extrelut and Florisil	GC–MS	6.0	79–88	0.10 µg/kg	25
sausage	supercritical fluid CO ₂ coupled with SPE (Florisil)	MEKC	0.2	21–82		39
meats	two-step SPE with Extrelut and Florisil	GC–MS	6.0	79–88	0.09 µg/g	26
meat products	two-step SPE with Extrelut and Florisil	GC × GC–NCD	6.0		1.66–3.86 µg/g	34
meat sample	two-step SPE with Extrelut and Florisil	GC × GC–NCD	6.0	83.1–89.8	1.54–1.86 pg	35
meat products	microwave-assisted extraction (MAE) and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME)	GC–MS	0.25	36–74	0.003–0.014 ng/mL for NPIP and NMEA	40
frankfurter	SWE and LLE couple with SPE (Florisil)	GC–MS	1.0	81–106	0.47–1.48 ng	6
frankfurter	SWE and LLE couple with silica monolith capillary	GC–MS	1.0	74.7–88.4	2.10–5.40 ng injected/g	proposed method

the AOAC reference method using vacuum distillation takes about 75 min per sample followed by a second step of DCM extraction of the distillate.³⁶ The total sample preparation time is approximately 2 h. A cleaning and preconcentration process using a conventional SPE took about 1 h in the work by Yurchenko et al.,²⁶ but it was reduced to less than 10 min for separation of those components using a coupling technique of monolith capillary with GC after 20 min of extraction with superheated water. In addition, one monolith capillary could be reused with the liquid extract more than 20 times (corresponding to 20 samples).

Many significant benefits were obtained for the determination of nitrosamines in sausage by coupling of SWE with a silica monolith capillary and GC. The detection limits results were, however, not as low as expected. To improve the sensitivity, additional steps, such as denitrosation,³⁷ could be introduced prior to detection. Specific detectors, namely, a TEA or highly sensitive tandem MS, can enhance the detection efficiency. Furthermore, the monolith capillary can also be adapted to couple with other methods of extraction for further preconcentration and purification of a wide range of analytes prior to chromatographic analysis. This method investigated here has also been proven to be a green technique with environmental advantages, because it greatly reduced solvent consumption and minimized analysis time and costs associated with obtaining reproducible results.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Telephone: 662-562-5555, ext. 2136. Fax: 662-579-3955. E-mail: fsciopc@ku.ac.th.

Funding

Financial support from the Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) and the Thailand Research Fund (TRF) (Project RSA5580019) is gratefully acknowledged. The authors thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, for the studentships of Panee Subprasert, Anupop Sasook, and Narumol Ramnut, and the Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, for instruments and facilities support.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS USED

DCM, dichloromethane; FID, flame ionization detector; GC, gas chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; LLE, liquid–liquid extraction; MS, mass spectrometer; NDEA, *N*-nitrosodiethylamine; NPIP, *N*-nitrosopiperidine; NPYR, *N*-nitrosopyrrolidine; NMOR, *N*-nitrosomorpholine; P-DVB, polydivinylbenzene; PS-DVB, polystyrene-divinylbenzene; RSD, relative standard deviation; SPE, solid-phase extraction; SWE, superheated water extraction; TEA, thermal energy analyzer

REFERENCES

- (1) Kimoto, W. I.; Pensabene, J. W.; Fiddler, W. Isolation and identification of *N*-nitrosothiazolidine in fried bacon. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 757–760.
- (2) Komarova, N. V.; Velikanov, A. A. Determination of volatile nitrosamines in food by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Anal. Chem.* **2001**, *56*, 359–363.

- (3) Byun, M. W.; Ahn, H. J.; Kim, J. H.; Lee, J. W.; Yook, H. S.; Han, S. B. Determination of volatile *N*-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 403–407.
- (4) Filho, S.; Rios, P. J.; Valcárcel, A.; Zanin, M.; Caramão, K. D. B. Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction–micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *985*, 503–512.
- (5) Huang, Z.; Lee, H. K. Materials-based approaches to minimizing solvent usage in analytical sample preparation. *Trends Anal. Chem.* **2012**, *39*, 228–244.
- (6) Chienthavorn, O.; Subprasert, P.; Insuan, W. Nitrosamines extraction from frankfurter sausage by using superheated water. *Sep. Sci. Technol.* **2014**, DOI: 10.1080/01496395.2013.863338.
- (7) Ishizuka, N.; Kobayashi, H.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hiraoa, K.; Hosoyab, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *960*, 85–96.
- (8) Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Kimura, H.; Hara, T.; Tokuda, D.; Tanaka, N. Properties of monolithic silica columns for HPLC. *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 491–501.
- (9) Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoy, K.; Ikegami, T. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 35–49.
- (10) Zhu, G.; Zhang, L.; Yuan, H.; Liang, Z.; Zhang, W.; Zhang, Y. Recent development of monolithic materials as matrices in micro-column separation systems. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 792–803.
- (11) Rodríguez, S. A.; Colón, L. A. Investigations of a sol–gel derived stationary phase for open tubular capillary electrochromatography. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *397*, 207–215.
- (12) Ming-Ming, Z.; Ge-Deng, R.; Yu-Qi, F. Hybrid organic–inorganic silica monolith with hydrophobic/strong cation-exchange functional groups as a sorbent for micro-solid phase extraction. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7739–7746.
- (13) Ghanem, A.; Ikegami, T. Recent advances in silica-based monoliths: Preparations, characterizations and applications. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 1–13.
- (14) Chirita, R.-I.; Finaru, A.-L.; Elfakir, C. Evaluation of fused-core and monolithic versus porous silica-based C18 columns and porous graphitic carbon for ion-pairing liquid chromatography analysis of catecholamines and related compounds. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 633–640.
- (15) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3498–3501.
- (16) Li, W.; Fries, D. P.; Malik, A. Sol–gel stationary phases for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1044*, 23–53.
- (17) Ming-Luan, C.; Ming-Ming, Z.; Yu-Qi, F. Preparation of organic–inorganic hybrid silica monolith with octyl and sulfonic acid groups for capillary electrochromatography and application in determination of theophylline and caffeine in beverage. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3547–3556.
- (18) Svec, F.; Kurganov, A. A. Less common applications of monoliths III. Gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 281–295.
- (19) Chienthavorn, O.; Dararuang, K.; Sasook, A.; Ramnut, N. Purge and trap with monolithic sorbent for gas chromatographic analysis of pesticides in honey. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 955–964.
- (20) Björklund, E.; Christoph, v. H.; Anklam, E. Fast extraction, clean-up and detection methods for the rapid analysis and screening of seven indicator PCBs in food matrices. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 40–53.
- (21) Premstaller, A.; Oberacher, H.; Huber, C. G. High-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry of single- and double-stranded nucleic acids using monolithic capillary columns. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4386–4393.

- (22) Coufal, P.; Cihák, M.; Suchánková, J.; Tesarová, E.; Bosáková, Z.; Stulík, K. Methacrylate monolithic columns of 320 μm I.D. for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *946*, 99–106.
- (23) Chienthavorn, O.; Pengpumkiat, S.; Noomhorm, A.; Smith, R. M. Superheated water extraction and phase transfer methylation of phenoxy acid herbicides from solid matrices. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152*, 268–273.
- (24) Sasook, A. Characterization of silica monolithic column by inverse gas chromatography. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 2008.
- (25) Yurchenko, S.; Mölder, U. Volatile *N*-nitrosamines in various fish products. *Food Chem.* **2006**, *96*, 325–333.
- (26) Yurchenko, S.; Mölder, U. The occurrence of volatile *N*-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1713–1721.
- (27) Cox, G. B. Estimation of volatile *N*-nitrosamines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1973**, *83*, 471–481.
- (28) Encarnación, L. P.; Ríos, A.; Valcárcel, M. Automated flow-injection spectrophotometric determination of nitrosamines in solid food samples. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 891–895.
- (29) Filho, P. J. S.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Caramao, E. B. Development of a new method for the determination of nitrosamines by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Water Res.* **2003**, *37*, 3837–3842.
- (30) Maxwell, R. J.; Pensabene, J. W.; Fiddler, W. Multiresidue recovery at PPB levels of 10 nitrosamines from frankfurters by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, *31*, 212–215.
- (31) Raoul, S.; Gremaud, E.; Biaudet, H.; Turesky, R. J. Rapid solid-phase extraction method for the detection of volatile nitrosamines in food. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4706–4713.
- (32) Mitacek, E. J.; Brunnemann, K. D.; Suttajit, M.; Martin, N.; Limsila, T.; Ohshima, H.; Caplan, L. S. Exposure to *N*-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: Volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 297–305.
- (33) Andrade, R.; Reyes, F. G. R.; Rath, S. A method for the determination of volatile *N*-nitrosamines in food by HS–SPME–GC–TEA. *Food Chem.* **2005**, *91*, 173–179.
- (34) Ozel, M. Z.; Gogus, F.; Yagci, S.; Hamilton, J. F.; Lewis, A. C. Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography–nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3268–3273.
- (35) Kocak, D.; Ozel, M. Z.; Gogus, F.; Hamilton, J. F.; Lewis, A. C. Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography–nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2215–2220.
- (36) AOAC International. Method 982.22. *AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*; AOAC International: Gaithersburg, MD, 1995.
- (37) Cárdenes, L.; Ayala, J. H.; González, V.; Afonso, A. M. Fast microwave-assisted dansylation of *N*-nitrosamines: Analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **2002**, *946*, 133–140.
- (38) Lee, S. J.; Shin, J. H.; Sung, N. J.; King, J. G.; Hotchkiss, J. H. Effect of cooking on the formation of *N*-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 31–36.
- (39) Filho, P. S.; Rios, A.; Valcarcel, M.; Zanin, K. D.; Caramao, E. B. Method of determination of nitrosamines in sausage by CO_2 supercritical fluid extraction (SFE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 603–607.
- (40) Campillo, N.; Viñas, P.; Martínez-Castillo, N.; Hernández-Córdoba, M. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1815–1821.



Separation Science and Technology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/lsst20>

Nitrosamines Extraction from Frankfurter Sausages by using Superheated Water

Orapin Chienthavorn^a, Panee Subprasert^a & Wimonrut Insuan^a

^a Department of Chemistry and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

Accepted author version posted online: 31 Dec 2013. Published online: 14 Apr 2014.



[Click for updates](#)

To cite this article: Orapin Chienthavorn, Panee Subprasert & Wimonrut Insuan (2014) Nitrosamines Extraction from Frankfurter Sausages by using Superheated Water, Separation Science and Technology, 49:6, 838-846, DOI: [10.1080/01496395.2013.863338](https://doi.org/10.1080/01496395.2013.863338)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01496395.2013.863338>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Nitrosamines Extraction from Frankfurter Sausages by using Superheated Water

Orapin Chienthavorn, Panee Subprasert, and Wimonrut Insuan

Department of Chemistry and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

An efficient, rapid, and inexpensive method for extraction and clean-up of some selected volatile nitrosamines from frankfurter sausages was developed by using superheated water coupled with solid-phase extraction. Because a coextraction of lipid caused a serious problem during the extraction, a subsequent clean-up step using fat-selective Florisil adsorbent with 60% diethyl ether-dichloromethane was then necessary. Various factors affecting superheated water extraction, such as flow rate, extraction temperature, dynamic time, and static time were optimized by using a full factorial design with three replicates. The optimal extraction temperature was 140°C with dynamic and static time of 10 and 5 min, respectively, and a flow rate of 1.0 mL/min. Separation and quantification of nitrosamines were carried out using GC-FID and GC-MS in selected ion monitoring mode. Direct application of this method to frankfurter samples allowed overall recoveries of N-nitrosamines in the range of 81–106% with < 10% RSD, and the detection limit of the coupling method ranged between 0.47–1.48 ng nitrosamines injected.

Keywords factorial design; frankfurter sausage; nitrosamine; silica monolith; subcritical water extraction; superheated water extraction

INTRODUCTION

Nitrosamine is a class of carcinogenic compounds that contaminates several foods and food products even at low concentrations. When oxidized nitrosamines generate carboonium ion intermediates that promote alkylation of DNA (1). Nitrosamines induce tumors in many organs, such as liver, kidney, lung, and pancreas, depending on the size and frequency of dose and the administration route (2–6). The compounds are formed by a reaction of amines and nitrosating agents, nitrite, nitrate, nitrogen oxide, or nitrous acid (4,7–8). Nitrite and nitrate are additives of meat for preventing outgrowth

and toxin formation. In immersion cured meat and poultry products the permission levels required by the US Food Safety and Inspection Service are 200 ppm for potassium nitrate and 700 ppm for potassium nitrite (9). The amines are natural breakdown species of amino acids present in food, water, cosmetics and many other products. Nitrosamines are generally stable and are only slowly decomposed by light or acid, while several factors inducing their formation are pH, environment, alkalinity of amine, and temperature (4,10–11). They can also be formed endogenously in the human stomach or small intestine by an interaction of nitrosating agents and ingested amines (4).

For analytical purpose nitrosamines are divided into two groups, namely non-volatile and volatile compounds. The non-volatiles have received less attention, as they appeared to be non-carcinogenic (12). Volatile nitrosamines are relatively nonpolar, low-molecular weight compounds that are mostly carcinogenic, for example, nitrosodimethylamine, nitrosodiethylamine, and nitrosopyrrolidine. Despite the low concentration of volatile N-nitrosamines in food and, as a consequence, their little exposure to humans, two unavoidable reasons to take the issue seriously are that their carcinogenic potency in experimental animals is highly significant, and secondly, humans may be more sensitive than experimental animals to nitrosamines (13). The permitted level of volatile nitrosamines in food has been regulated in several countries (14–16), and the World Health Organization restricted the permitted level of N-nitrosamines in fresh and smoked foodstuffs at 0.002 and 0.004 mg/kg, respectively.

Great concerns regarding these compounds challenge researchers to develop satisfactory methods for extraction and determination of nitrosamines in foods. Extraction of nitrosamines from foods has several difficulties, for example, they present at very low levels and in a large variety of foods with different compositional characteristics (8,17–19). Isolation and detection of nitrosamines are problematic because of possible interferences of which structure similar to the analytes (20–22). Analytical methods for nitrosamine determination in food involve many preliminary steps, such as sampling, extraction, clean-up, and preconcentration. The extraction and clean-up have been achieved by solvent extraction on a dry celite column

Received 23 January 2013; accepted 04 November 2013.

Address correspondence to Orapin Chienthavorn, Department of Chemistry and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, P.O. Box 1011 Chatuchak, Bangkok 10903, Thailand. E-mail: fsciopc@ku.ac.th

(23), supercritical CO₂ extraction (24-25), steam distillation (26-28), and vacuum distillation in a mixture of mineral oil and base (11,29). Many extraction methods require large amounts of greenhouse-toxic solvents, such as dichloromethane (27,30-31). More advanced extractions involved using supercritical CO₂ as the extractant (24-25), but lipid co-extraction with the analytes occurred. Hitherto the most effective method may be classical distillation, but it has several drawbacks, such as being time-consuming, requiring high energy, and sample throughput; the method therefore does not support routine analysis. The standard method of determination of volatile N-nitrosamines has been typically carried out by gas chromatography-thermal energy analyzer (GC-TEA) (27,30-32). Although the detector is sensitive and specific for N-nitroso compounds, it is expensive, not easily operated, and in particular not usually available in most laboratories, unlike some other detectors, namely flame ionisation detector and mass spectrometer.

To support the US Environmental Protection Agency regulations, reduce the usage of halogen solvents that are potentially harmful to our environment and reduce costs of solvent disposal, subcritical water extraction or superheated water extraction (SWE) was developed for the determination of nitrosamines. SWE is a sample preparation and extraction technique that combines elevated temperature and pressure with liquid solvents to achieve fast and efficient extraction of the analytes from the solid matrix. Increasing temperature reduces the surface tension and viscosity of water, thereby increasing the solvent's ability to wet the matrix and solubilise the target analytes (33). Temperature also assists in breaking down analyte-matrix interactions. For applications involving highly adsorptive matrices, high pressure enhances extraction efficiency by forcing the solvent into the matrix pores. SWE has been demonstrated for the extraction of organic analytes from food (34-35), plant (35-37), and environmental matrices (38-39).

In this work, SWE was utilized as a sample preparative method for nitrosamine determination in frankfurter sausages. Superheated water was employed to replace conventional organic solvents for the extraction, followed by solid-phase extraction as an efficient tool supporting the cleaning-up step. Optimization of SWE was clearly demonstrated by using a full factorial design. Determination of nitrosamines in the samples was achieved by gas chromatography-mass spectrometric detection (GC-MS), and the efficiency of extraction was compared with conventional methods.

EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

Standard nitrosamines, namely N-nitrosodiethylamine or NDEA (99.0%) from Fluka (Buchs, Switzerland), N-nitrosopiperidine or NPIP (99.0%) from Sigma (Steinheim, Germany), N-nitrosopyrrolidine or NPYR (99.0%) from Aldrich (Milwaukee, WI, USA), and N-nitrosomorpholine or NMOR (5.0 mg/mL in methanol) from Supelco (Bellafonte,

PA, USA) were used in this study. Each 1.0 mg/mL standard stock solution was prepared in methanol. N-nitroso-di-n-propylamine, or NDPA from Supelco (Bellafonte, PA, USA) was used as an internal standard.

For solid-phase extraction, Florisil with a particle size of 60-100 mesh or 149-250 μm and a surface area of 289 m^2/g was obtained from Sigma (Steinheim, Germany). Silica gel 60 with a particle size of 230-400 mesh or 0.040-0.063 mm was purchased from Merck. Other solvents and reagents were analytical grade. Double-deionized water with a resistance of 18 M Ω used throughout these studies was produced by using Elga Maxima HPLC double deionized water apparatus (Elga, Bucks, England).

Preparation of Frankfurter Samples

Refrigerated frankfurter sausages were purchased from a local supermarket in Bangkok, Thailand. After being left at room temperature for 1 h, the sample was chopped into small pieces, and homogenized by hand mixing. A 1.0 g sample was fortified with 100 μg each of nitrosamine stock solution, re-homogenized, and left for solvent evaporation at room temperature for 10 min.

Superheated Water Extraction

Double-deionized water contained in a glass reservoir was sonicated for 1 h to remove oxygen by using a Transsonic T460/H ultrasonic bath (Elma, Germany). The superheated water extraction system was similar to one described previously (39). The water was delivered by a ConstrMetric 3200 HPLC pump (LDC analytical, USA) through a Rheodyne 7010 valve (Rheodyne, CA, USA) at 1.0 mL/min, passing through a 1-m x 1.59-mm o.d. x 0.51-mm i.d. stainless steel preheating coil (Alltech Chromatography, USA) to a 15-cm x 4.6-mm i.d. stainless steel extraction cell that contained 1.0 g fortified sample. Glass wool was put at both ends of the cell where 2- μm stainless steel frits and screw caps were subsequently mounted. Both preheating coil and extraction cell were placed in an oven (F11, Perkin Elmer, USA) and maintained at 120°C for a static period of 5 min. After that the water was re-flowed, and the aqueous extract passing out of the sample cell was cooled down by a cooling system consisting of a stainless steel cooling coil wrapped with aluminum fins to avoid loss of volatiles. The end of the outlet tubing was crimped to control pressure of the system, thus maintaining the extractant in the liquid state. The pressure of the system indicated by the HPLC pump was > 300 psi. The total aqueous extract was collected for 10 mL in a vial containing 2 g NaCl for salting out and 2 mL of dichloromethane or ethyl acetate for trapping the extracted analytes. The organic layer was collected and subjected to solid phase extraction (SPE).

A full factorial model was designed by using a Minitab software version 14 with three replicates to study the effects of temperature, static time and flow rate factors on % recovery.

The volume of the aqueous extract was kept constant at 10 mL, and each extract was further cleaned up by SPE under optimal conditions.

Solid-Phase Extraction

The SPE was carried out using a 4.6-g Florisil column that was preconditioned by 5 mL dichloromethane. After loading the organic extract, the column was eluted by 15 mL of 60% diethyl ether/dichloromethane. The eluent was dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered through a 0.45- μm Nylon 6,6 membrane, and evaporated to < 1.0 mL under nitrogen gas. The clear filtrate was then added with 100 μL of 1000 ppm NDPA internal standard and the volume was adjusted to 1.00 mL with dichloromethane. 1 μL of the solution was subjected to either GC-FID or GC-MS. All data points were obtained by an average of the peak area ratios of triplicate extractions.

Gas Chromatographic Analysis

Quantitative analysis was performed using a HP5890 Series II gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto CA, USA) equipped with a 0.32-mm. i.d. \times 0.52- μm film thickness \times 25-m 5% phenyl - 95% dimethylpolysiloxane capillary column (HP-5, Hewlett Packard, USA). Both the injector and the flame ionization detector were kept constant at 220°C. A 1 μL sample was injected using a split injection (1:15) with nitrogen carrier gas. The oven temperature program was started at 40°C, ramped from 40°C to 80°C at 7°C/min and kept for 8 min, then raised to 200°C at 15°C/min and held for 5 min. N-nitrosodipropylamine (NDPA) was used as an internal standard for quantification.

Extracted nitrosamines were determined by using a HP5890 gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) coupled with a HP5989B mass spectrometer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) in an electron impact mode. The separation was performed on the same column and oven temperature program as those for the GC-FID analysis, except that an operation was in a splitless mode and helium was used as a carrier gas. To confirm NDEA, NPYR, NPIP, and NMOR present in frankfurter, a selected ion monitoring (SIM) technique was operated.

RESULTS AND DISCUSSIONS

SWE Optimization

As nitrosamines were to be extracted by using the superheated water extraction system, several parameters affecting an extraction yield of analytes must be optimized. Minitab software was a useful tool for optimization by preparing a set of experiments to study an interrelationship of those parameters. To design experiments by using the Minitab program, the factors affecting the SWE, namely extraction temperature, static extraction time, and flow rate, and their levels were considered. For a simultaneous extraction to keep all nitrosamine

analytes as liquid in the superheated water phase the extraction temperature range must be below the boiling point of the lowest volatile analyte. NDEA has a boiling point of 177°C, which is the lowest among the selected nitrosamines, so the highest extraction temperature was chosen as 170°C. Because of our instrument limitation, the lowest oven temperature that gave enough thermal stability was 120°C, which was therefore designated as the lowest extraction temperature of this model. The extraction temperature was varied at three levels of 120, 140, and 170°C. The static time in this work was defined as the period in which the temperature was held before restarting the flow. The static time was carried out at three levels of 1, 5, and 10 min, since during a longer period of 15 min at 170°C, lipid and pigment were highly co-eluted and plugged the SPE sorbent column. For most SWE applications, an effective flow rate for the dynamic extraction is usually in a range of 0.5–2.0 mL/min; in our study it was then carried out at two discreet levels, 0.5 and 1.0 mL/min. A higher flow rate than 1.0 mL/min caused excessively high pressure and consequently system leakage, and was therefore not practical. Three replicates were run in order to estimate a standard error of each experiment. The highest recovery for all extracted components and for all experiments was achieved not exceeding 100%. Maximum recoveries for NDEA (96.54%), NPIP (98.65%), and NPYR (85.53%) were obtained at the extraction temperature of 140°C for 5 min with 1.0 mL/min, and reasonably good repeatability was shown by the range of %RSD for all experiments between 2.6–5.2%.

Fig. 1 shows the contour plot of % recovery of nitrosamines by SWE versus flow rate, static time, and temperature. Three factors affected the removal of each nitrosamine at different levels, for example NDEA extraction was affected by temperature more than static time and more than flow rate, as shown by the distorted contour lines of NDEA. The flow rate affected the removal of NPIP more than NPYR. It was obvious that the flow rate of 1.0 mL/min was more suitable than 0.5 mL/min when considering % extraction efficiency and range of extraction time; for example, at more than 90% extraction efficiency of NDEA the flow of 1.0 mL/min provided a wider range of extraction temperature and static time than that of 0.5 mL/min. Too low a flow rate caused accumulated heat in the extract and, as a consequence, coevaporation of the analytes with the organic trapping solvent occurred, and the yields of the analytes were therefore decreased. Another important reason for the decreased recovery was that the very low flow rate eluted not only the nitrosamine analytes but also the fat and other additives, which later contaminated the aqueous extract. With the flow rate of 1.0 mL/min the fat was removed less than using the lower flow rate, since the water solubility of nitrosamines is higher than that of fat. Besides, fat retarded the analyte elution of the solid phase column and trace of fat peak in the GC column also hindered the analyte peak. The optimal flow rate for NPIP and NPYR was 1.0 mL/min at the extraction temperature of 140°C and the

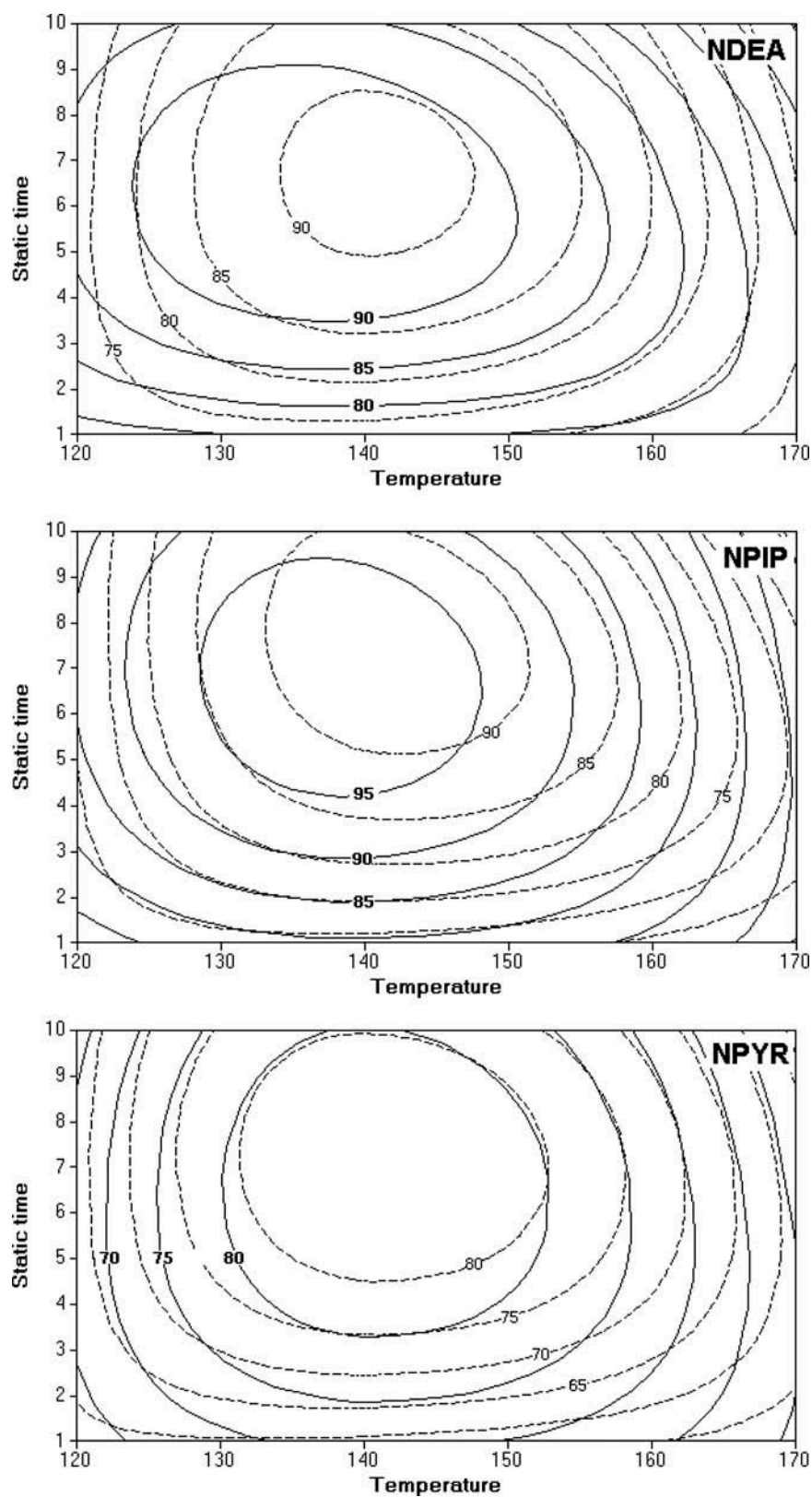


FIG. 1. Contour plot of recovery of NDEA, NPIP, and NPYR versus extraction temperature, static time and flow rates of 0.5 mL/min (dash line) and 1.0 mL/min (solid line).

TABLE 1

Main effects and their interaction effects to the recovery of nitrosamine. Symbols: +++ highly significant, ++ significant, + low significant, and - insignificant

Source	Compounds *		
	NDEA	NPIP	NPYR
Main effect			
Temperature	+++	+++	+++
Static time	++	+	++
Flow rate	+	++	+
Two-way interaction			
Temperature*Static time	++	++	++
Temperature*Flow rate	+	+	-
Static time*Flow rate	-	-	+
Three-way interaction			
Temperature*Static time*Flow rate	+	+	-

static time of 5 min. The extraction efficiency of NPYR did not depend much on flow rate, particularly for the static time of more than 5 min, as shown by the overlapping contoured lines. For all analytes the static time of 1 min was too fast to allow thermal equilibration between the oven and extraction cell and at 10 min, reduced recoveries of all components were obtained.

From the factorial analysis of variance (ANOVA) three main factors and their interactions affecting the recoveries of nitrosamines are summarized in Table 1. Temperature was the most influential parameter in the removal of all nitrosamines and flow rate seems to dominate the recovery of NPIP more than NDEA and NPYR, while static time played an opposite role. A combination of temperature and static time also contributed to high recoveries of all compounds. However, the recoveries of all analytes did not change much when the three-way interaction was taken into account.

Cleaning Up

After the SWE the analytes in the aqueous extract were collected by an organic liquid, and then the organic layer was subjected to SPE. Two kinds of organic solvents, namely dichloromethane and ethyl acetate, were chosen for the organic trapping liquid according to their immiscibility with water and similar polarity to the analytes. From our investigation, at 120°C extraction temperature, dichloromethane is more efficient than ethyl acetate, because it removed a higher yield of nitrosamines (75-82%) from the aqueous extract than ethyl acetate (58-69%), and because dichloromethane is heavier than water, the aqueous upper layer prevented dichloromethane

and analytes coevaporation. A single extraction with 2-mL dichloromethane was enough to collect most analytes from the aqueous phase. The second extraction with 2 mL of the solvent collected only 0-2% analytes compared to the first extraction, and double extraction using 1 mL dichloromethane each gave a similar result to a single step using 2 mL of the solvent.

After the dichloromethane extraction of frankfurter sausages, the lipid matrix remained in the extract. Solid phase extraction was then employed to trap the non-polar component, releasing the analytes for chromatographic determination. To remove fat from the food matrix normal phase SPEs involving a polar analyte interacted with polar adsorption media are typically used (26, 40-41). Florisil and silica gel are polar absorbing materials of interest, according to their polar interactions to intermediately polar nitrosamines. SPE sorbents, namely Florisil, silica gel and sulphuric acid-impregnated silica gel, were compared for their effectiveness in trapping the fat matrix and releasing the nitrosamines with the elution of different ratios of ethyl acetate-dichloromethane.

Florisil gave the best performance in trapping fat and the pigment matrix from the sample. When extracting using Florisil, a yellow color of lipid deposit was observed on the top packed bed and red color of frankfurter pigment was in the anhydrous Na_2SO_4 layer. Although clean and clear organic liquid extract was collected for Florisil and sulphuric acid impregnated silica gel sorbent columns, the highest recovery was obtained using Florisil. Sulphuric acid-impregnated silica gel was successfully used as a lipid-retainer for complicated fatty foods (42); however, in this work no nitrosamines in the organic layer were detected because they are not stable under strong acidic conditions (43). When using silica gel sorbent, the lipid was co-extracted into the collected fraction and the recovery was consequently low. The recovery of NDEA when using silica gel and Florisil with ethyl acetate eluting solvent was 53.50 and 58.93, respectively ($n = 3$). When the amount of Florisil was reduced to 3.0 g, the lipid was co-extracted in the collected fraction, but no lipid was detected when using 4.6 g of the sorbent. The 4.6 g of Florisil was then used to retain the lipid component, and it was conditioned with 5 mL dichloromethane before applying the dichloromethane extract. Some organic solvents and their mixtures were studied as an eluent for the SPE, as shown in Fig. 2. With diethyl ether in the eluent, the recovery was higher than those without it. Increasing proportion of diethyl ether when mixed with dichloromethane, nitrosamine compounds were more extracted, and it reached the maximum at 60% diethyl ether-dichloromethane, giving a recovery of 81-110%. Although diethyl ether is highly volatile, and took less clean-up and preconcentration time for evaporation, the co-evaporation of analytes with diethyl ether did not occur because of the high boiling point difference between nitrosamines and

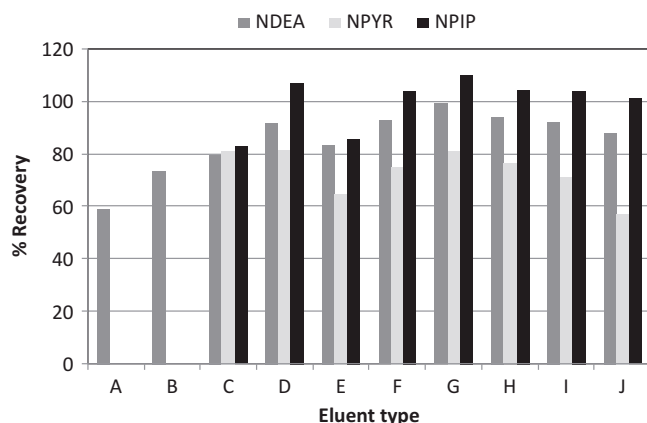


FIG. 2. Comparison of different eluting solvent systems. A: ethyl acetate, B: 1% acetic acid-ethyl acetate, C: 1% triethylamine-ethyl acetate, D: acetone-ethyl ether(5:95), E: 30% diethyl ether-dichloromethane, F: 45% diethyl ether-dichloromethane, G: 60% diethyl ether-dichloromethane, H: 70% diethyl ether-dichloromethane, I: 80% diethyl ether-dichloromethane, and J: pure diethyl ether.

the solvent. The average boiling temperature of the studied nitrosamines was 203°C, and that of diethyl ether was 34.6°C. 60% Diethyl ether-dichloromethane was therefore optimized and the volume needed to completely extract the nitrosamines was 15 mL.

Recovery of the Method

The recovery of the optimized SWE followed by the cleaning up for all nitrosamines ranged between 81-107% with reasonably good precision ($RSD \leq 7.2\%$) as given in Table 2. The recoveries of nitrosamines were examined from 20 µg each nitrosamine spiked in 1.0 g of the sample under the optimized conditions. NMOR is a volatile nitrosamine with a structure similar to NPIP. It was then presumed that the

TABLE 2

% Recoveries and detection limits of nitrosamines obtained from a SWE-SPE under the optimum conditions and determined by GC-MS

Compounds	% Recovery ¹ ± SD (RSD)	r ²	Calculated detection limits (ng injected/g of sample)
NDEA	95.05 ± 5.9 (6.2)	0.996	0.68
NPYR	81.82 ± 4.9 (6.0)	0.995	1.48
NPIP	106.93 ± 7.7 (7.2)	0.995	1.38
NMOR	87.34 ± 5.7 (6.5)	0.980	0.47

¹n = 5

optimized conditions should have a similar effect to NMOR. Calibrations in a range between 10-30 ng injected showed very good linearity with the regression of between 0.980-0.995, and the determined detection limits were in a range of between 0.47-1.48 ng injected per gram of sample. The detection limits of all analytes were not as low as expected, probably due to an insufficient sensitivity of the HP5989B mass spectrometric detector in our work.

Comparison with Other Methods

Table 3 showed a comparison of our proposed method to other preparation techniques. The SWE gave rather high recovery of 81-106%, similar to some extraction methods, such as steam distillation/liquid extraction of sausage (27) and dried seafood (44), two steps of SPE for the meat sample and supercritical CO₂/SPE for frankfurter sausage (24). When comparing among gas and liquid chromatographic determination, the amount of sample needed for analysis in this work was much reduced, with rather low detection limit in a range of nanogram injected. Employing thermal energy analyser (TEA), a selective detector, coupled with GC for nitrosamine determination could decrease the detection limits more than the mass detector; however, the later one is more versatile and commercially available. A tandem mass spectrometric detector may therefore be an alternative for lowering the detection limit.

CONCLUSIONS

The proposed method provides several advantages in the following ways: first, the sample preparation steps are simple, efficient, and relatively inexpensive while using only small amounts of organic solvents. Second, the period of time necessary for both extraction and pre-concentration was not very long, ranging from 45 min to 1 hour. Third, factorial designs can be considered as an effective tool to study the influence of parameters affecting SWE and they permit acquisition of more robust results with a reduced number of experiments when compared with the classical one-to-one parameter approach. Fourth, the use of a mass spectrometric detector provided identification of all analytes without using other confirmatory techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University is also acknowledged for instruments and facilities support.

FUNDING

We thank the Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) and the Thailand Research

TABLE 3
Comparison between various methods for determination of nitrosamines

Preparation method	Sample matrix	Sample mass	Analytical method	% Recovery	Detection limit	References
Steam distillation and Liquid-liquid extraction	Meat products	80-100 g	HPLC with fluorescence	72-76 %	0.7-2.2 ng	(28)
	Fermented sausage	20 g	GC-TEA	87-93 %	0.1 µg/kg	(27)
	Pork luncheon meat, pig liver	200 g	HPLC	42-77 % yield of derivative	1-10 µg/kg	(29)
	Canned sausages	150 g	MEKC	38.2-55.0 %	—	(21)
Liquid-liquid extraction with DCM and SPE with basic alumina	Dried seafood	25 g	GC-TEA	83.2-102.2 %	0.1 µg/kg	(44)
	Fresh and preserved food	10.0 g	GC-TEA	60-90 %	0.1-0.5 µg/kg	(30)
Supercritical CO ₂ coupled with SPE (Florisil)	Frankfurter sausage	2.5 g	GC-TEA	84.3-104.8 %	—	(24)
	Sausages	0.2 g	MEKC	21-82 %	—	(45)
Flow-injection method(based on photochemical cleavage of N-NO bond), then nitrite was detected	Cured ham, bacon and sausages	2.0 g	Diode-array spectrophotometer	91.6-105.8 %	6.0 ng/mL	(46)
Two-step SPE with Extrelut and Florisil	Fish sample	6.0 g	GC-MSD	79-88 %	0.10 µg/kg	(19)
	Meats	6.0 g	GC-MS	79-88 %	0.09 µg/g	(8)
	Sausages	6.0 g	GC-TEA	40-100 %	0.3 ppb	(47)
	Meat products	6.0 g	GCxGC-NCD	—	1.66-3.86 µg/g	(40)
Headspace solid phase microextraction	Meat sample	6.0 g	GCxGC-NCD	83.1-89.8 %	1.54-1.86 pg	(41)
	Sausages	2.5 g	GC-TEA	105-110 %	3 µg/kg	(31)
SWE, LLE couple with SPE (Florisil)	Frankfurter sausage	1.0 g	GC-MS	81-106 %	0.47-1.48 ng	Proposed Method

Fund (TRF) (project number RSA5580019) for financial support, as well as the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education for the studentships of P. Subprasert.

REFERENCES

- Archer, M.C.; Leung, K.-H. (1981) *Mechanisms of Alkylation of DNA by N-Nitrosodialkylamines*, N-Nitroso Compounds 1st ed.; American Chemical Society: Washington DC.
- Xu, G.; Reed, P.I. (1993) Method for group determination of total N-nitroso compounds and nitrite in fresh gastric juice by chemical denitrosation and thermal energy analysis. *Analyst*, 118: 877.
- Xu, G.P.; Reed, P.I. (1993) N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method. *Carcinogenesis*, 14: 2547.
- Lane, R.P.; Bailey, M.E. (1973) The effect of pH on dimethylnitrosamine formation in human gastric juice. *Food Cosmet. Toxicol.*, 11(5): 851.
- Mirvish, S.S. (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.*, 93(1): 17.
- McCutcheon, J.W. (1984) Nitrosamines in Bacon: a case study of balancing risks. *Public Health Reports*, 99 (4): 360.
- Pegg, R.B.; Shahidi, F. (2008) *Potential Health Concerns About Nitrite: Nitrite Curing of Meat Food*; Meat Food and Nutrition Press: Trumbull, CT.
- Yurchenko, S.; Mölder, U. (2007) The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chem.*, 100(4): 1713.
- U.S.D.A. (1995) *Processing Inspectors' Calculations Handbook*; Food Safety Inspection Service; p 138.
- Li, L.; Wang, P.; Xu, X.; Zhou, G. (2012) Influence of various cooking methods on the concentrations of volatile N-nitrosamines and biogenic amines in dry-cured sausages. *J. Food Sci.*, 77(5): 560.
- Mavelle, T.; Bouchikhi, B.; Debry, G. (1991) The occurrence of volatile N-nitrosamines in French foodstuffs. *Food Chem.*, 42(3): 321.
- Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. (1996) Tobacco-specific nitrosamines. *Eur. J. Cancer Prev.*, 5: 33.
- Lijinsky, W. (1993) Life-span and cancer: the induction time of tumors in diverse animal species treated with nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis*, 14(11): 2373.
- Liteplo, R.G.; Meek, M.E. (2002) *N-Nitrosodimethylamine*; World Health Organization; p 52.
- U.S.D.A. (2005) *Accreditation of Chemistry Laboratories*; Food Safety and Inspection Service; p 499.
- European Commission (1997) *Reports of the Scientific Committee for Food, Opinions of the Scientific Committee for Food On Nitrates and Nitrite*; European Commission: Luxembourg.
- Ventanas, S.; Martín, D.; Estévez, M.; Ruiz, J. (2006) Analysis of volatile nitrosamines from a model system using SPME-DED at different temperatures and times of extraction. *Food Chem.*, 99(4): 842.
- Ventanas, S.; Ruiz, J. (2006) On-site analysis of volatile nitrosamines in food model systems by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device. *Talanta*, 70(5): 1017.
- Yurchenko, S.; Mölder, U. (2006) Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food Chem.*, 96(2): 325.
- Grebel, J.E.; Young, C.C.; Suffet, I.H. (2006) Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *J. Chromatogr. A*, 1117(1): 11.
- Filho, P.J.S.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Caramao, E.B. (2003) Development of a new method for the determination of nitrosamines by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Water Res.*, 37(16): 3837.
- Boyd, J.M.; Hrudehy, S.E.; Li, X.F.; Richardson, S.D. (2011) Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography mass spectrometry analysis of nitrosamines in treated drinking water and wastewater. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 30(9): 1410.
- Kimoto, W.I.; Pensabene, J.W.; Fiddler, W. (1982) Isolation and identification of n-nitrosothiazolidine in fried bacon. *J. Agric. Food Chem.*, 30 (4): 757.
- Maxwell, R.J.; Pensabene, J.W.; Fiddler, W. (1993) Multiresidue recovery at ppb levels of 10 nitrosamines from frankfurters by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 31(6): 212.
- Sanches Filho, P.J.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Soares Melecchi, M.I.; Bastos Caramão, E. (2007) Method of determination of nitrosamines in sausages by CO₂ supercritical fluid extraction (SFE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *J. Agric. Food. Chem.*, 55(3): 603.
- Sanches Filho, P.J.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Zanin, K.D.; Bastos Caramão, E. (2003) Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction-micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, 985(1-2): 503.
- Byun, M.W.; Ahn, H.J.; Kim, J.H.; Lee, J.W.; Yook, H.S.; Han, S.B. (2004) Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *J. Chromatogr. A*, 1054(1-2): 403.
- Komarova, N.V.; Velikanov, A.A. (2001) Determination of volatile nitrosamines in food by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Anal. Chem.*, 56: 359.
- Cox, G.B. (1973) Estimation of volatile N-nitrosamines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 83: 471.
- Mitacek, E.J.; Brunnemann, K.D.; Suttajit, M.; Martin, N.; Limsila, T.; Ohshima, H.; Caplan, L.S. (1999) Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: Volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem. Toxicol.*, 37(4): 297.
- Andrade, R.; Reyes, F.G.R.; Rath, S. (2005) A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. *Food Chem.*, 91(1): 173.
- Lee, S.J.; Shin, J.H.; Sung, N.J.; King, J.G.; Hotchkiss, J.H. (2003) Effect of cooking on the formation of N-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. *Food Addit. Contam.*, 20: 31.
- Smith, R.M. (2002) Extractions with superheated water. *J. Chromatogr. A*, 975 (1): 31.
- García-Marino, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ibáñez, E.; García-Moreno, C. (2006) Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta*, 563(1-2): 44.
- Luque-Rodríguez, J.M.; Luque de Castro, M.D.; Pérez-Juan, P. (2007) Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. *Bioresource Technol.*, 98(14): 2705.
- Mortazavi, S.V.; Eikani, M.H.; Mirzaei, H.; Jafari, M.; Golmohammad, F. (2010) Extraction of essential oils from *Bunium persicum* Boiss. using superheated water. *Food Bioprod. Process.*, 88(2-3): 222.
- Ozel, M.Z.; Gogus, F.; Lewis, A.C. (2003) Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chem.*, 82(3): 381.
- Tajuddin, R.; Smith, R.M. (2005) On-line coupled extraction and separation using superheated water for the analysis of triazine herbicides in spiked compost samples. *J. Chromatogr. A*, 1084(1-2): 194.
- Chienthavorn, O.; Pengpumkiat, S.; Noomhorm, A.; Smith, R.M. (2007) Superheated water extraction and phase transfer methylation of phenoxy acid herbicides from solid matrices. *J. Chromatogr. A*, 1152(1-2): 268.
- Ozel, M.Z.; Gogus, F.; Yagci, S.; Hamilton, J.F.; Lewis, A.C. (2010) Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chem. Toxicol.*, 48(11): 3268.
- Kocak, D.; Ozel, M.Z.; Gogus, F.; Hamilton, J.F.; Lewis, A.C. (2012) Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography - nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chem.*, 135(4): 2215.
- Björklund, E.; Christoph, v.H.; Anklam, E. (2002) Fast extraction, clean-up and detection methods for the rapid analysis and screening of seven indicator PCBs in food matrices. *Trends Anal. Chem.*, 21(1): 40.

43. Rostkowska, K.; Zwierz, K.; Róžański, A.; Moniuszko-Jakoniuk, J.; Roszczenko, A. (1998) Formation and metabolism of n-nitrosamines. *Pol. J. Environ. Stud.*, 7 (6): 321.
44. Lee, S.J.; Shin, J.H.; Sung, N.J.; King, J.G.; Hotchkiss, J.H. (2003) Effect of cooking on the formation of N-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. *Food Addit Contam.*, 20: 31.
45. Filho, P.S.; Rios, A.; Valcarcel, M.; Zanin, K.D.; Caramao, E.B. (2007) Method of determination of nitrosamines in sausage by CO₂ supercritical fluid extraction (SFE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *J. Agr. Food Chem.*, 55: 603.
46. Encarnación, L.P.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2001) Automated flow-injection spectrophotometric determination of nitrosamines in solid food samples. *Fresenius J. Anal Chem.*, 371: 891.
47. Raoul, S.; Gremaud, E.; Biaudef, H.; Turesky, R.J. (1997) Rapid solid-phase extraction method for the detection of volatile nitrosamines in food. *J. Agric. Food. Chem.*, 45(12): 4706.