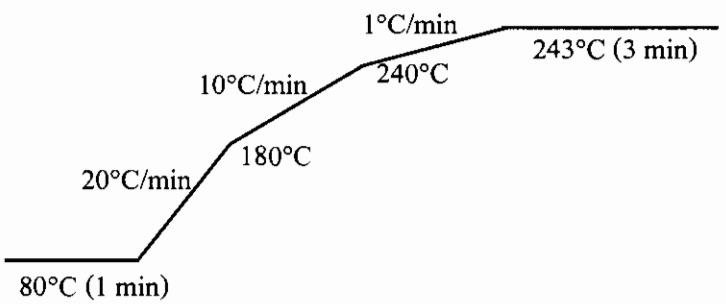
บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร PAHs ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร PAHs ด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้สารละลายผสม PAHs 9 ชนิด ได้แก่ Acenaphthylene (ACY), Acenaphthenc (ACE), Fluorene (FL), Phenanthrene (PHEN), Anthracene (AN), Fluoranthene (FLUR), Pyrene (PY), Benzo[a]anthracene (BaA) และ Chrysene (CHRY) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้ Scan Mode ได้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องดังนี้

อัตราการไหลของแก๊สพา (ฮีเลียม)	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
สภาวะการฉีด	Splitless เวลา 30 วินาที
ปริมาตรที่ฉีด	1 ไมโครลิตร
เวลาที่ฉีด	0.5 นาที
อุณหภูมิของ Injection Port	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์	280 องศาเซลเซียส
เวลารวม	18 นาที

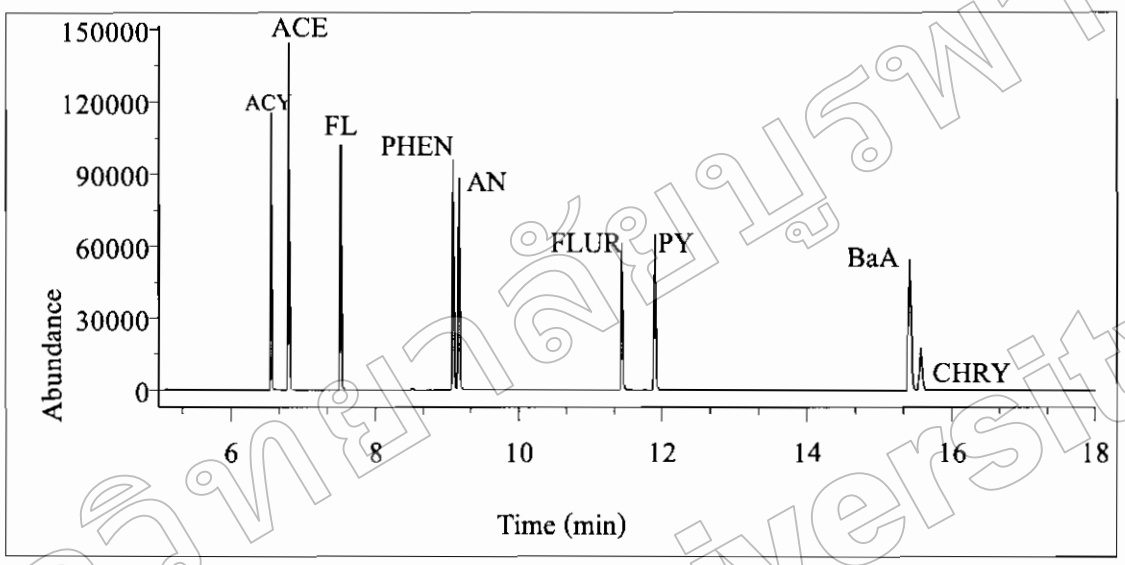
จากสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง นำมาศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิ พบว่าได้โปรแกรมอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ PAHs ทั้ง 9 ชนิด แสดงดังในภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 แสดงผลการศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ PAHs ทั้ง 9 ชนิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โครมาโทแกรมของสารละลายผสม PAHs 9 ชนิด ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่วิเคราะห์ด้วยสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-MS และโปรแกรมอุณหภูมิที่ศึกษาได้ แสดงดังภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-1



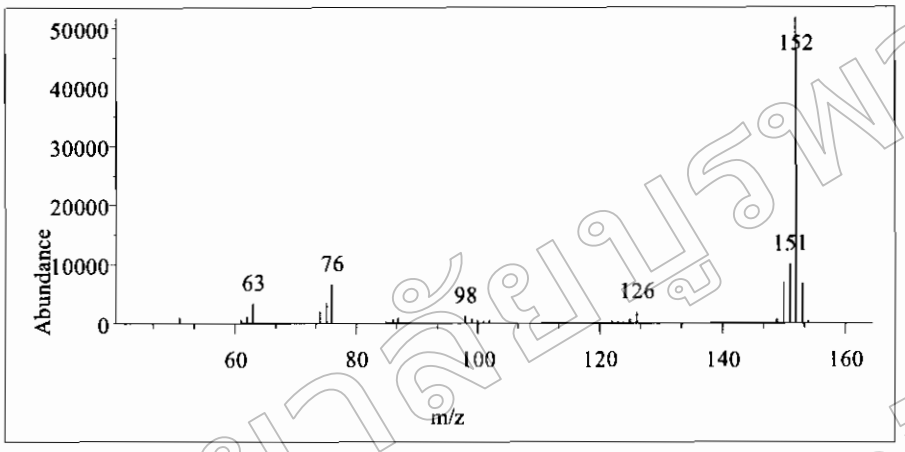
ภาพที่ 4-2 โครมาโทแกรมของสารละลายผสม PAHs 9 ชนิด ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4-1 ค่ารีเทนชันไทม์ (Retention Time หรือ t_R) และค่าการแยก (Resolution หรือ R_s)

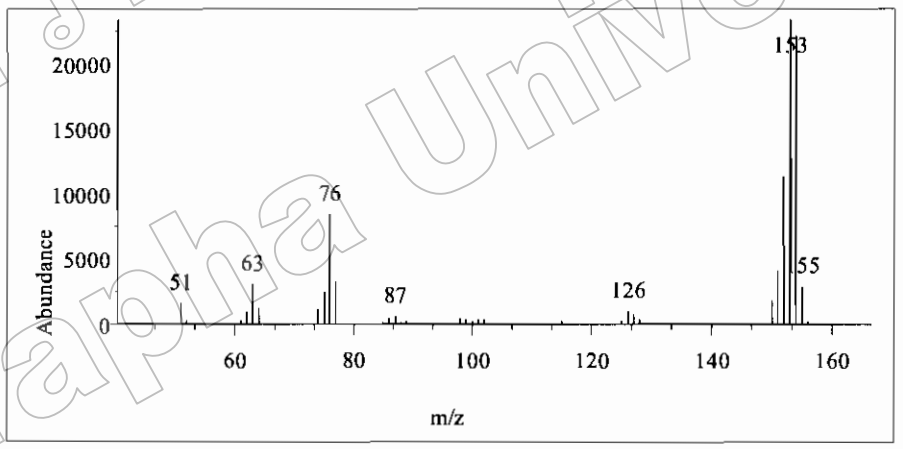
PAHs	ค่ารีเทนชันไทม์ (นาที)	ค่าการแยก (R_s)
ACY	6.557	12.000
ACE	6.803	34.095
FL	7.519	66.851
PHEN	9.090	3.200
AN	9.170	85.849
FLUR	11.445	16.393
PY	11.904	99.070
BaA	15.421	3.576
CHRY	15.573	-

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ข้อมูลในเชิงคุณภาพด้วยแมสสเปกตรัมเพื่อบ่งชี้ว่าเป็นสาร PAHs ชนิดใด โดยแมสสเปกตรัมที่ได้จากพีคของสารแต่ละชนิดแสดงดัง ภาพที่ 4-3 ถึง 4-11

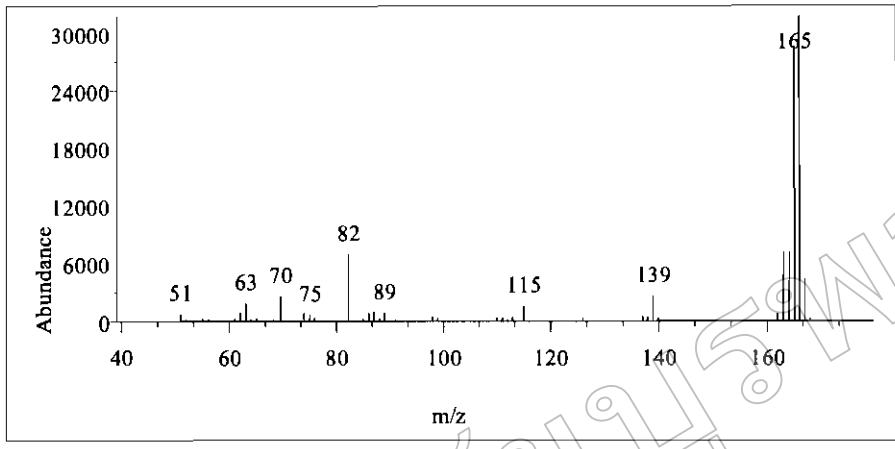


ภาพที่ 4-3 แมสสเปกตรัมของ Acenaphthylene

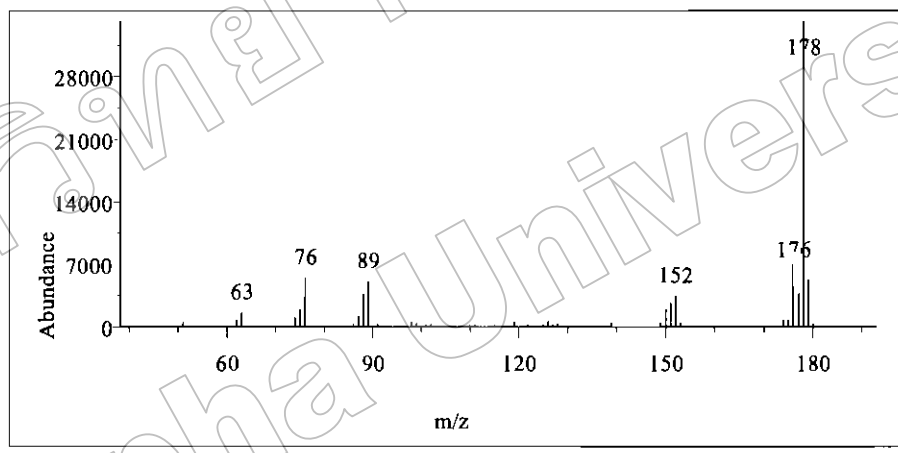


ภาพที่ 4-4 แมสสเปกตรัมของ Acenaphthene

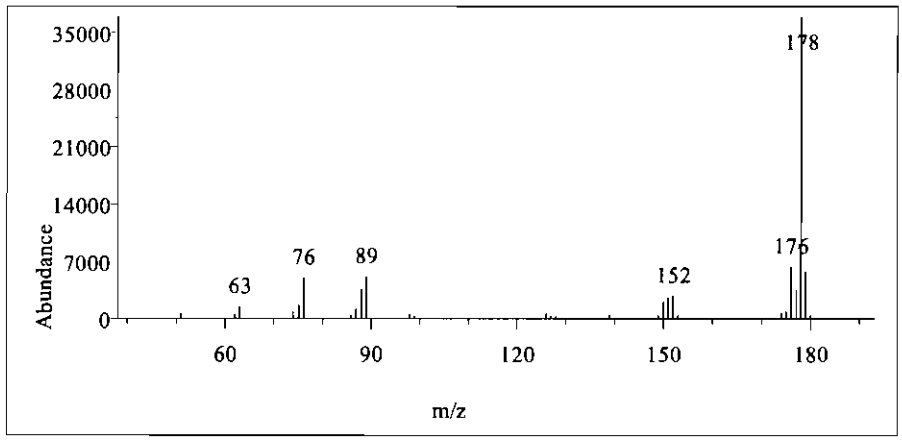
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-5 แมสสเปกตรัมของ Fluorene

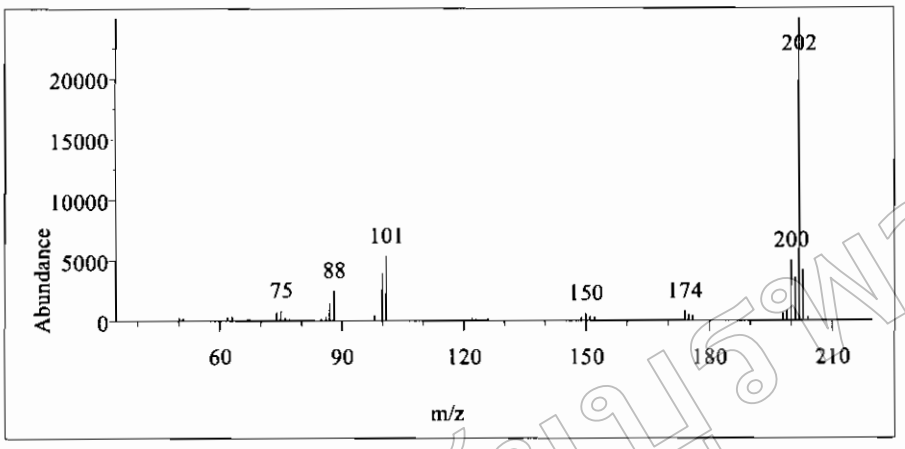


ภาพที่ 4-6 แมสสเปกตรัมของ Phenanthrene

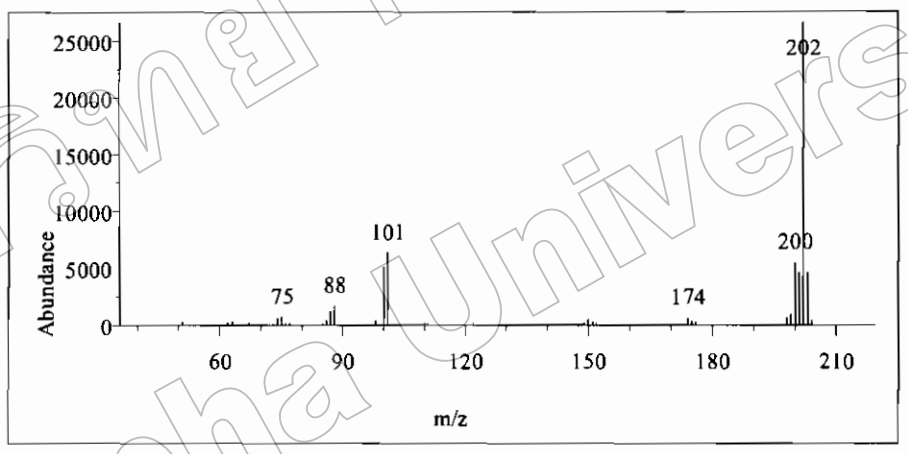


ภาพที่ 4-7 แมสสเปกตรัมของ Anthracene

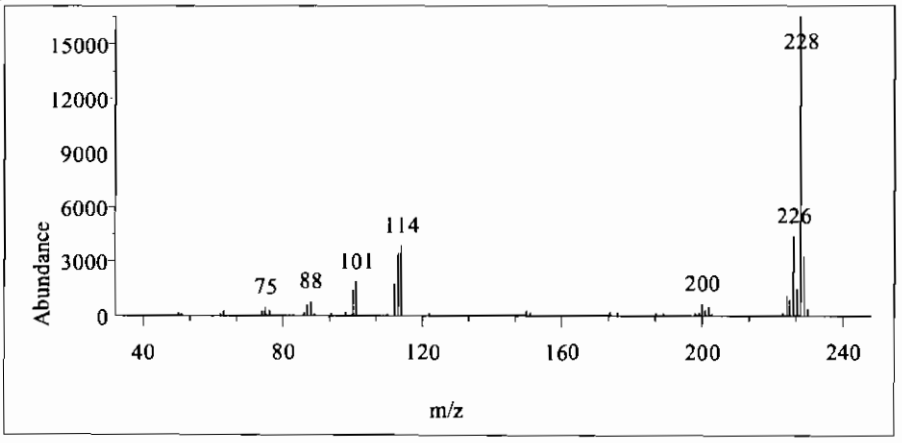
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-8 แมสสเปกตรัมของ Fluoranthene

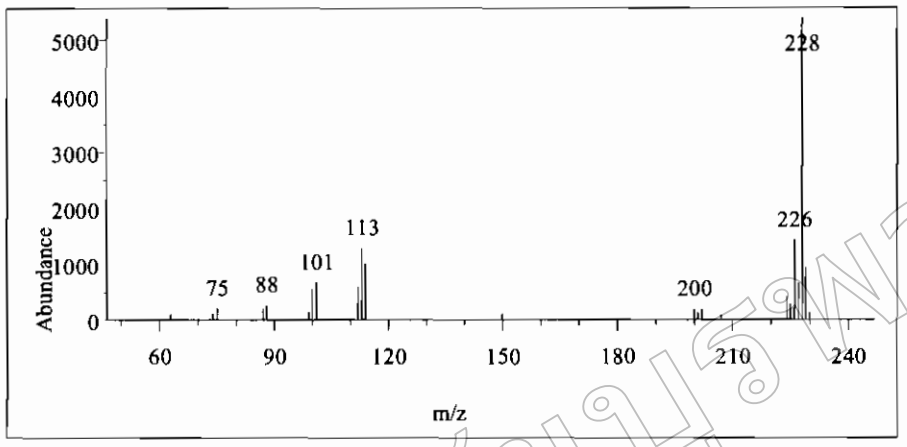


ภาพที่ 4-9 แมสสเปกตรัมของ Pyrene



ภาพที่ 4-10 แมสสเปกตรัมของ Benzo[a]anthracene

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

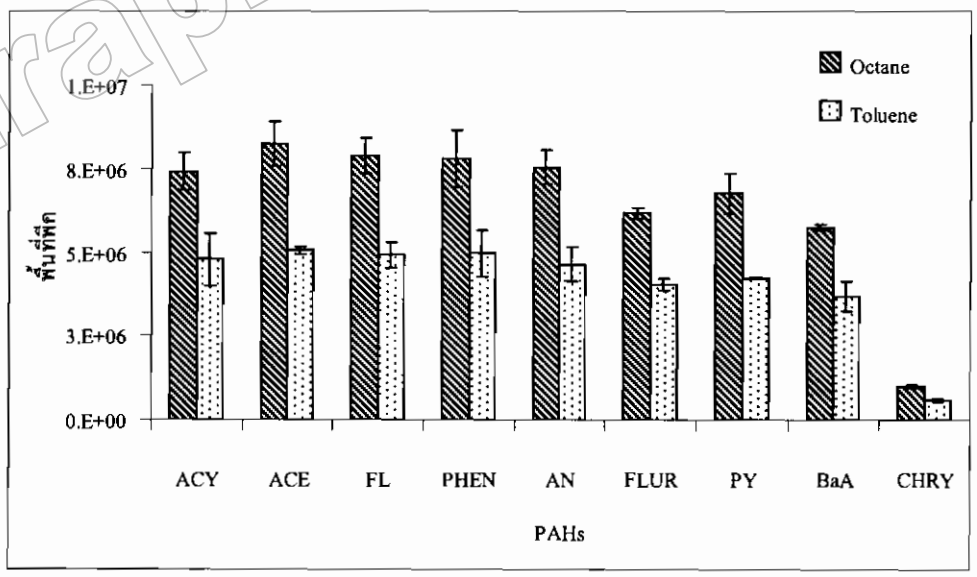


ภาพที่ 4-11 แมสสเปกตรัมของ Chrysene

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PAHs ระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-phase Microextraction หรือ LPME) โดยใช้เมมเบรนชนิดเส้นใยกลวง

1. ผลการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสม

โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ออกเทน โทลูอีน ไอโซออกเทน เฮกเซน และไซโคลเฮกเซน โดยนำมาสกัดสารละลายตัวอย่างน้ำที่เติม PAHs แล้ว ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่าออกเทนและโทลูอีนสามารถคงตัวอยู่ในรูพรุนของเมมเบรนได้ดี ส่วนตัวทำละลายชนิดอื่นนั้นไม่สามารถคงตัวอยู่ได้ ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4- 12

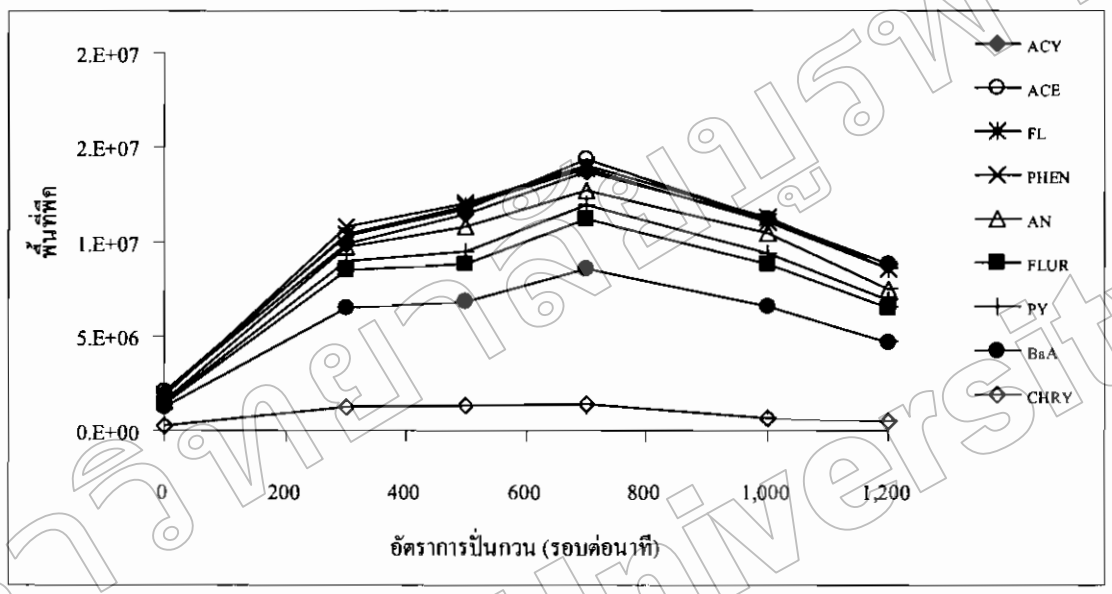


ภาพที่ 4-12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคของ PAHs และตัวทำละลายที่ใช้สกัด (n=3)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ผลศึกษาอัตราเร็วของการปั่นกวนที่เหมาะสม

โดยสกัดตัวอย่างน้ำที่เติมPAHs แล้วความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ใช้ออกเทนเป็นตัวทำละลาย ที่อัตราเร็ว 0, 300, 500, 700, 1000 และ 1200 รอบต่อนาที ผลการ ศึกษาที่ได้แสดงดังภาพที่ 4- 13

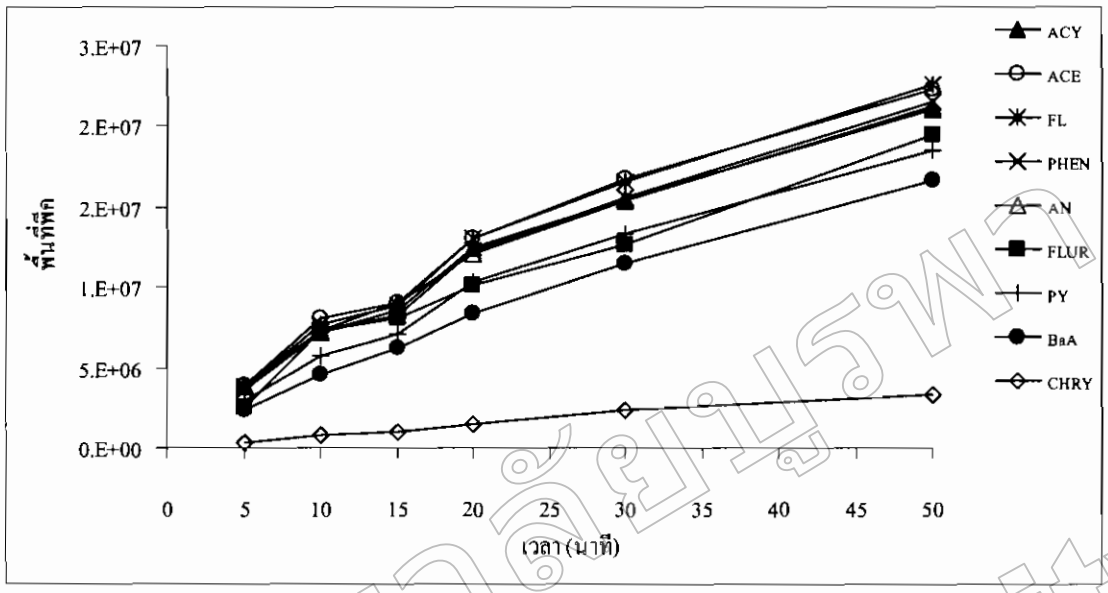


ภาพที่ 4-13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคของ PAHs และอัตราเร็วการปั่นกวน (n=3)

3. ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

โดยสกัดตัวอย่างน้ำที่เติม PAHs แล้วความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ใช้ออกเทนเป็นตัวทำละลาย ที่อัตราเร็ว 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5, 10, 15 20, 30 และ 50 นาที ผลการศึกษาที่ได้แสดงดังภาพที่ 4- 14

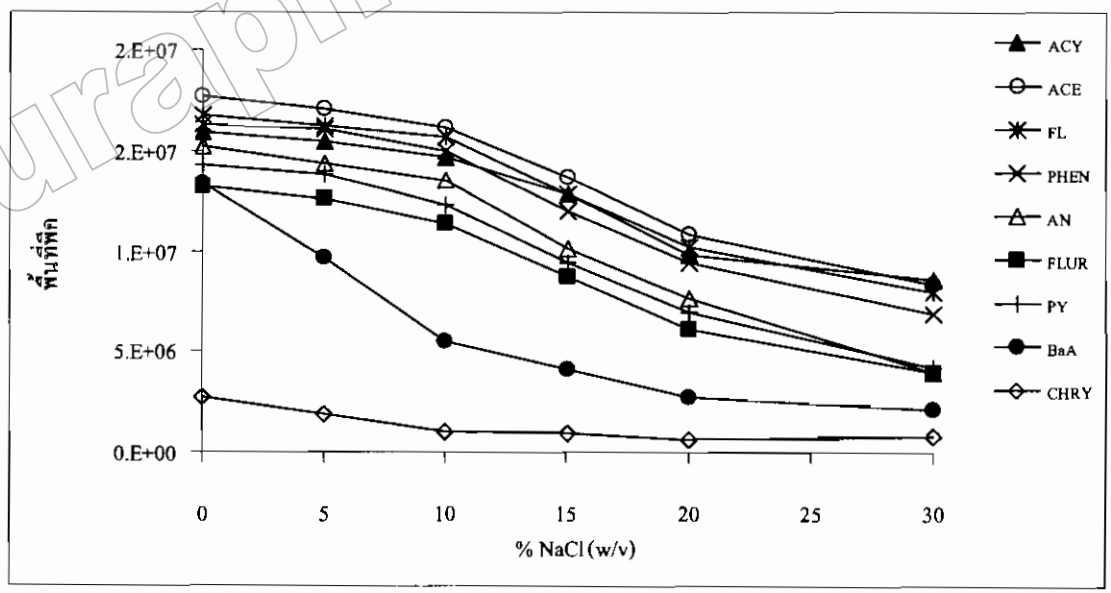
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคของ PAHs และเวลาในการสกัด (n=3)

4. ผลการศึกษาอิทธิพลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อประสิทธิภาพของการสกัด

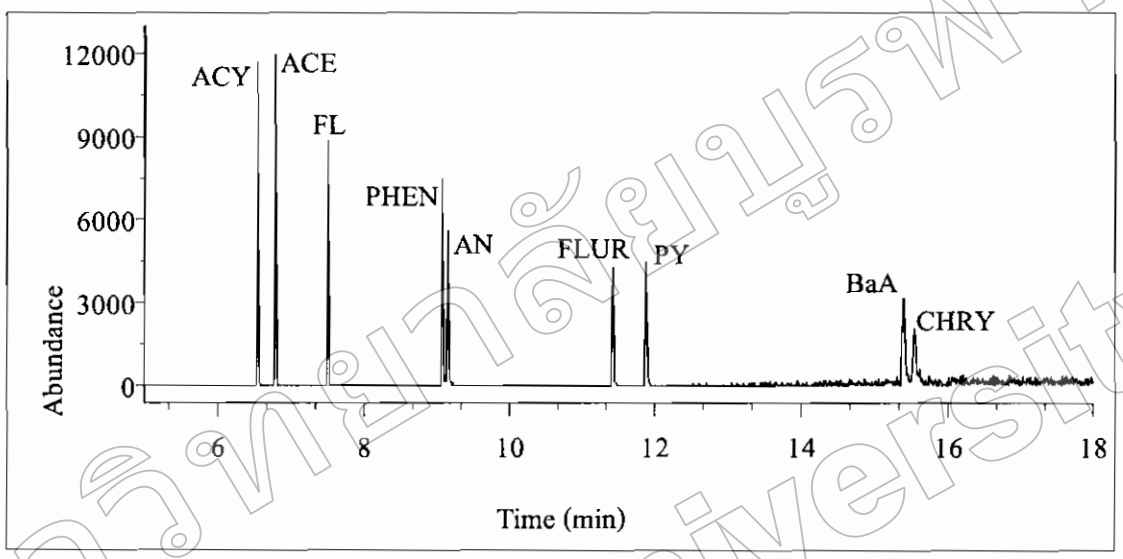
โดยสกัดตัวอย่างน้ำที่เติม PAHs แล้วความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งปรับปริมาตรด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 (%w/v) ใช้ออกเทนเป็นตัวทำละลายที่อัตราเร็ว 700 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ผลการศึกษาที่ได้แสดงดังภาพที่ 4-15



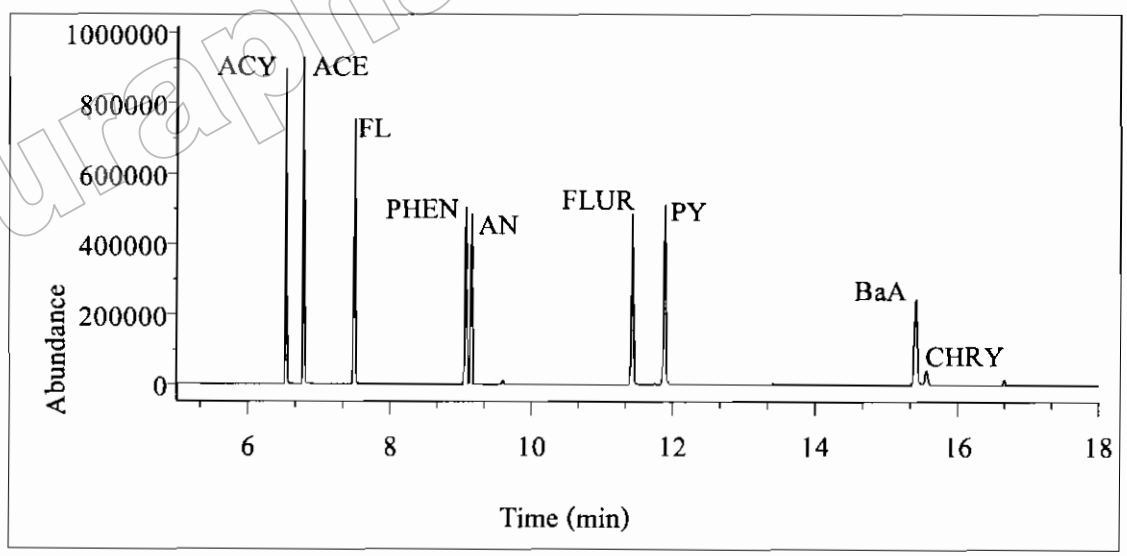
ภาพที่ 4-15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคของ PAHs กับความเข้มข้นของ NaCl (n=3)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อนำวิธีการนี้มาสกัด PAHs ในตัวอย่างน้ำโดยใช้สภาวะที่ได้จากการศึกษาข้างต้น พบว่าวิธีนี้นอกจากเป็นการเตรียมตัวอย่างแล้วยังสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ PAHs ในตัวอย่างได้อีกด้วย ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4-16 และ 4-17 และค่า Enrichment Factor ของ PAHs แต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 4-2



ภาพที่ 4-16 โครมาโทแกรมก่อนการสกัดของสารละลายผสม PAHs 9 ชนิด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-17 โครมาโทแกรมหลังการสกัดของสารละลายผสม PAHs 9 ชนิด ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 ค่า Enrichment Factor ของ PAHs ทั้ง 9 ชนิด

PAHs	Enrichment Factor
ACY	91
ACE	87
FL	112
PHEN	104
AN	125
FLUR	125
PY	129
BaA	76
CHRY	19

จากภาพที่ 4-7 และ 4-8 แสดงโครมาโทรแกรมของ PAHs ทั้ง 9 ชนิด เปรียบเทียบก่อนและหลังกระบวนการสกัดด้วยเทคนิค LPME พบว่าสัญญาณที่ได้ของ PAHs ทั้ง 9 ชนิด หลังผ่านกระบวนการสกัดมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นสารในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้อีกด้วย และจากตารางที่ 4-2 แสดงค่า Enrichment Factor ของ PAHs ทั้ง 9 ชนิด พบว่าอยู่ในช่วง 19-129

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

1. ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) และกราฟมาตรฐาน

จากการนำตัวอย่างน้ำที่เติมสารละลาย PAHs แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังรายละเอียดในส่วนของวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 5.1-5.3 มาสกัดและวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี ผลของค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ค่า LOD LOQ สมการเส้นตรง และค่า R^2 (n = 3)

PAHs	LOD (นาโนกรัมต่อลิตร)	LOQ (นาโนกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	R^2
ACY	6.00	20.0	y = 57.629x + 178.27	0.9985
ACE	5.50	15.5	y = 69.266x + 675.00	0.9955
FL	4.50	14.5	y = 60.243x + 802.97	0.9852
PHEN	3.00	10.0	y = 34.375x + 1643.0	0.9921
AN	4.00	9.00	y = 29.951x + 215.67	1.000
FLUR	3.00	10.0	y = 34.728x + 531.27	0.9978
PY	4.00	13.5	y = 40.109x + 570.06	0.9898
BaA	4.00	12.0	y = 133.60x - 774.06	0.9989
CHRY	30.0	90.0	y = 13.590x - 99.633	0.9923

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการนำตัวอย่างน้ำที่เติม PAHs แล้ว ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสกัดและวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรง ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสภาวะที่ได้ว่าสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี PAHs ได้ในช่วงความเข้มข้นเท่าใด ช่วงความเป็นเส้นตรง สมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) แสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ช่วงความเป็นเส้นตรง สมการเส้นตรง และค่า R^2 (n = 3)

PAHs	ช่วงความเข้มข้น (นาโนกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	R^2
ACY	20 - 1000	y = 48.149x + 953.3	0.9982
ACE	20 - 1000	y = 56.375x + 2049	0.9967
FL	15 - 1000	y = 45.204x + 2112.6	0.9974
PHEN	10 -1000	y = 34.567x + 1753.5	0.9986
AN	10 -1000	y = 38.566x - 392.57	0.9988
FLUR	10 -1000	y = 40.169x + 186.36	0.9996
PY	15 - 1000	y = 38.151x + 713.91	0.9997
BaA	15 - 1000	y = 176.15x - 3902.1	0.9993
CHRY	100 - 2000	y = 16.819x - 1096.4	0.9947

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. ผลการศึกษาความเที่ยง (Precision)

ผลการศึกษาความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision) โดยนำตัวอย่างน้ำที่เติม PAHs แล้ว มาสกัดตามวิธีข้อ 4.1 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD) ผลจากการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการศึกษาความเที่ยง (n=6)

PAHs	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)					
	25 นาโนกรัมต่อลิตร		60 นาโนกรัมต่อลิตร		90 นาโนกรัมต่อลิตร	
	ภายในวัน	ระหว่างวัน	ภายในวัน	ระหว่างวัน	ภายในวัน	ระหว่างวัน
ACY	6	5	6	9	12	10
ACE	5	5	5	9	12	13
FL	7	7	5	8	7	9
PHEN	10	8	11	13	8	10
AN	3	12	15	10	11	10
FLUR	13	14	13	11	14	10
PY	2	4	5	8	4	8
BaA	6	8	10	7	7	3
CHRY*	14	12	8	11	12	10

* ความเข้มข้นเท่ากับ 125, 250 และ 475 นาโนกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. ผลการศึกษาความแม่น (Accuracy)

โดยนำตัวอย่างน้ำที่เติม PAHs แล้ว มาสกัดตามวิธีข้อ 4.1 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี นำข้อมูลมาคำนวณค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery) ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ค่าร้อยละการได้กลับคืนจากการศึกษาความแม่น (n=6)

PAHs	ร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery)		
	25 นาโนกรัมต่อลิตร	60 นาโนกรัมต่อลิตร	90 นาโนกรัมต่อลิตร
ACY	102	104	105
ACE	95	102	99
FL	94	98	104
PHEN	103	105	99
AN	93	101	100
FLUR	93	97	109
PY	100	102	103
BaA	106	101	108
CHRY*	101	100	100

* ความเข้มข้นเท่ากับ 125, 250 และ 475 นาโนกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนในตัวอย่างน้ำชา (Matrix Effect)

โดยนำตัวอย่างน้ำชาที่เติม PAHs แล้ว มาสกัดตามวิธีข้อ 4.1แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี นำข้อมูลมาคำนวณค่าร้อยละการได้กลับคืน โดยทำการศึกษาในตัวอย่างน้ำชา 2 ประเภทได้แก่ น้ำชาจากใบชาและน้ำชาบรรจุขวด ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-7 ค่าร้อยละการได้กลับคืนจากการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวน (n=3)

PAHs	ค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery)					
	25 นาโนกรัมต่อลิตร		60 นาโนกรัมต่อลิตร		90 นาโนกรัมต่อลิตร	
	น้ำชาใบ	น้ำชาขวด	น้ำชาใบ	น้ำชาขวด	น้ำชาใบ	น้ำชาขวด
ACY	79	56	83	66	80	69
ACE	53	61	67	71	71	77
FL	75	85	71	71	66	69
PHEN	44	29	49	57	52	64
AN	29	38	47	58	53	61
FLUR	100	37	59	55	50	54
PY	67	47	41	47	35	46
BaA	79	53	50	37	44	35
CHRY*	45	40	31	37	25	33

* ความเข้มข้นเท่ากับ 125, 250 และ 475 นาโนกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ในตัวอย่างน้ำชาด้วยวิธี Standard Addition

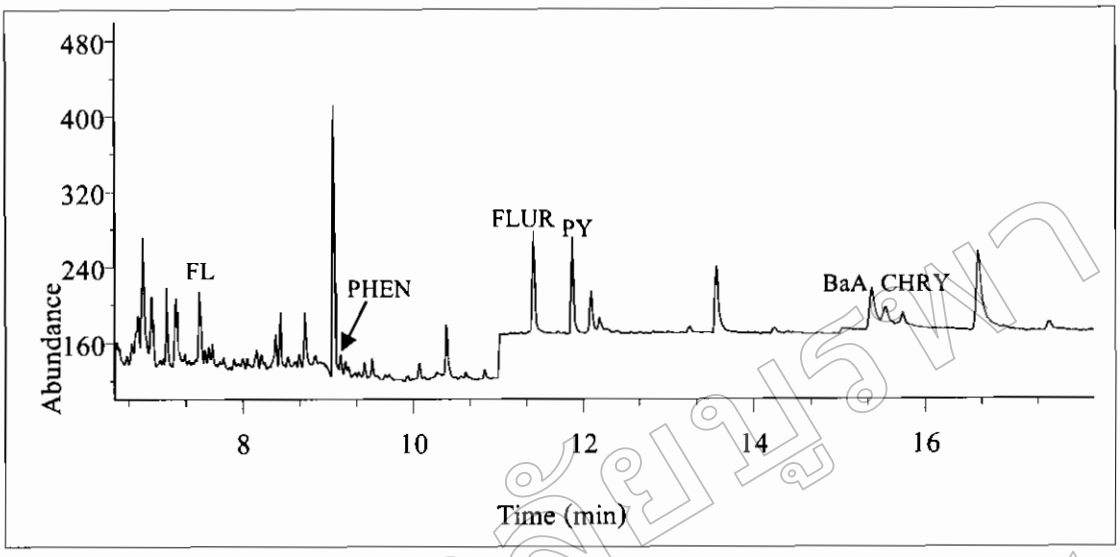
จากผลการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนในตัวอย่างน้ำชาดังข้อ 5 พบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 25 – 100% ซึ่งค่าที่ได้มีการกระจายตัวสูง แสดงให้เห็นว่าในน้ำชามีสารรบกวนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs จึงใช้วิธี Standard Addition สำหรับการหาปริมาณ ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีสารรบกวนสูง (Matrix Interference) โดยวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ในตัวอย่างน้ำชา 4 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำชาจากใบชา 2 ตัวอย่างและน้ำชาบรรจุขวด 2 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแสดงดังตารางที่ 4-8 และโครมาโทรแกรมของตัวอย่างน้ำชาทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการสกัดแล้วแสดงดังภาพที่ 4-18 ถึง 4-21

ตารางที่ 4-8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ PAHs ทั้ง 9 ชนิด ในตัวอย่างน้ำชาทั้ง 4 ชนิด (n=3)

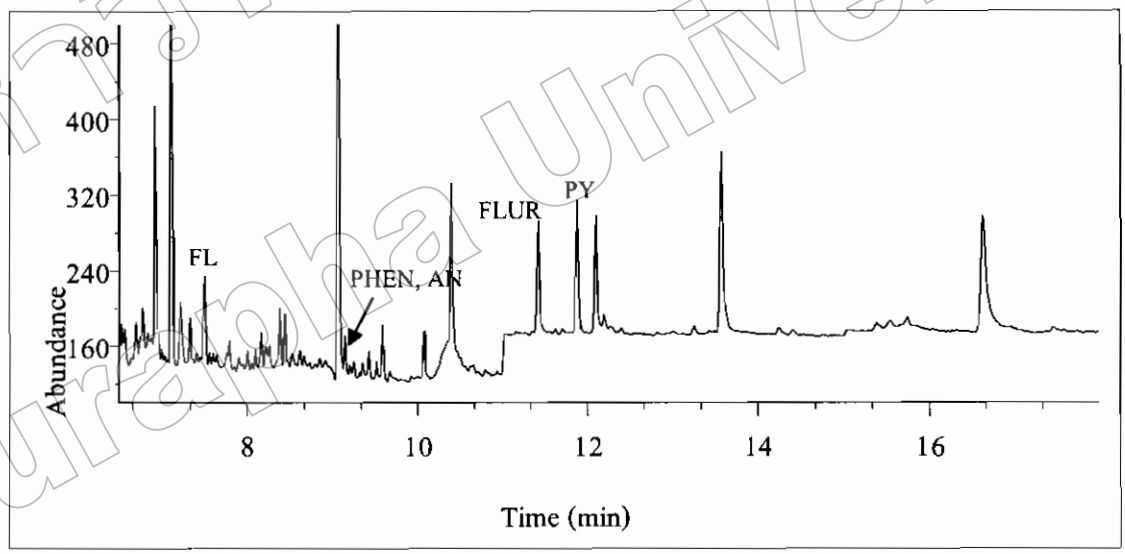
PAHs	ปริมาณ PAHs (นาโนกรัมต่อลิตร)			
	ใบชาเขียว	ใบชาจีน	น้ำชาเขียว	น้ำชาดำ
ACY	ND	ND	ND	ND
ACE	ND	ND	ND	ND
FL	30.11	30.79	23.07	33.63
PHEN	I76.98	187.85	ND	49.88
AN	ND	26.70	ND	ND
FLUR	99.68	129.80	70.12	16.75
PY	I04.20	124.00	42.69	31.49
BaA	17.98	< LOQ (LOQ = 12)	17.32	ND
CHRY	154.71	< LOQ (LOQ = 90)	199.79	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง Not Detected

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

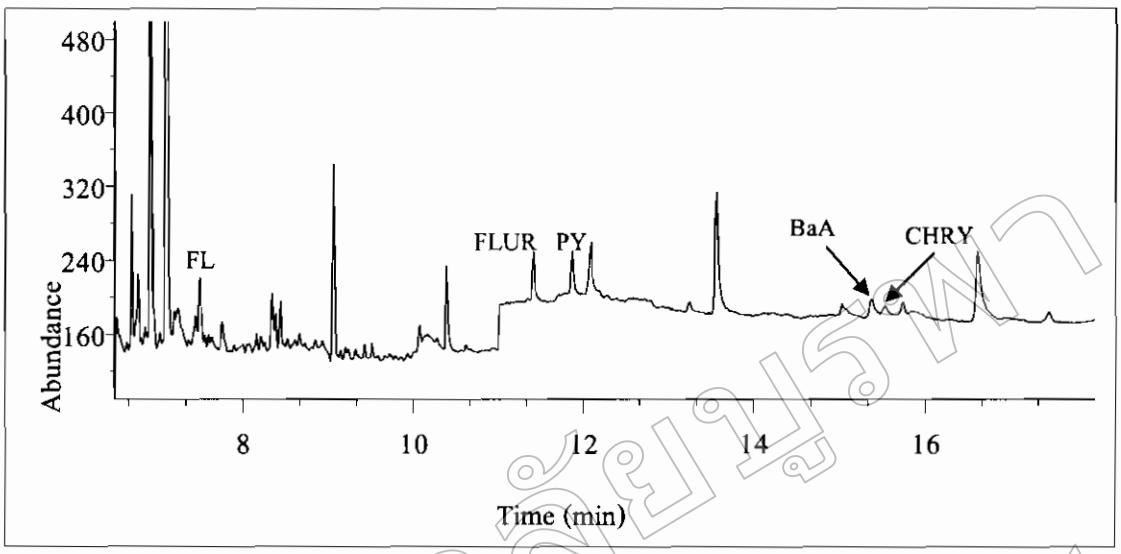


ภาพที่ 4-18 โครมาโทรแกรมที่ได้จากการสกัดน้ำชาจากใบชาเขียว

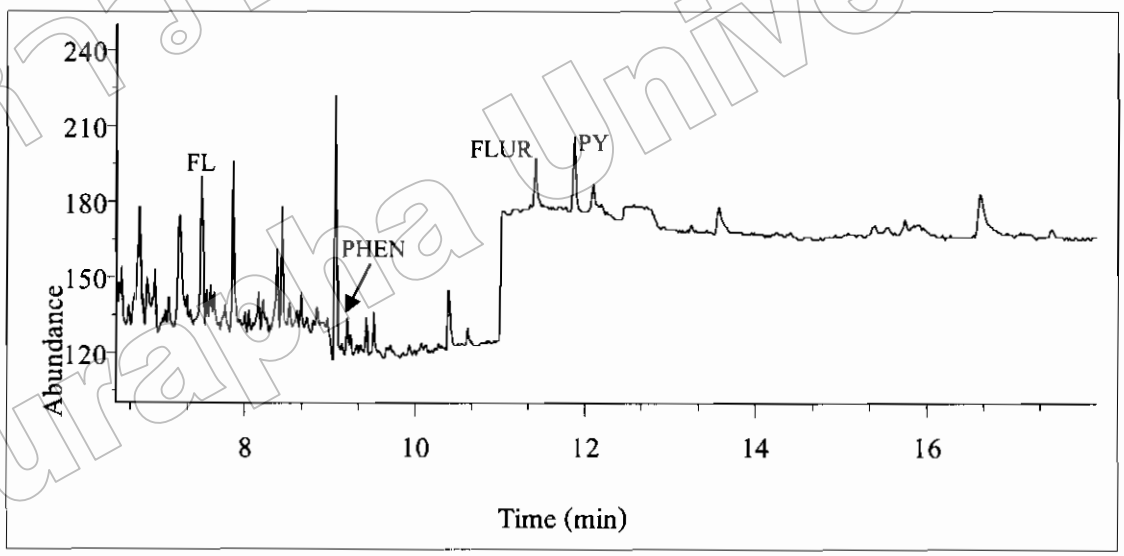


ภาพที่ 4-19 โครมาโทรแกรมที่ได้จากการสกัดน้ำชาจากใบชาจีน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-20 โครมาโทรแกรมที่ได้จากการสกัดน้ำชาเขียวบรรจุขวด



ภาพที่ 4-21 โครมาโทรแกรมที่ได้จากการสกัดน้ำชาดำบรรจุขวด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University