

**การพัฒนาเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี
เพื่อศึกษาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในเห็ดและแคปซูลยา**
**Development of High Performance Liquid Chromatography
Technique for Determination of Contaminated Formaldehyde
in Mushrooms and Drug Capsules**

นฤมล วชิรปัทมา* กฤตมน คุณาวิศรุต และศิริศักดิ์ ชาราศิริไพฑูรย์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

การแยกและการหาปริมาณ formaldehyde ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography ถูกพัฒนาขึ้น โดยทำให้ formaldehyde อยู่ในรูปอนุพันธ์ ด้วย 2,4-pentanedione และทำการแยกสารบน monolithic RP-18 column โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 412 nm มีการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการทำให้เกิด formaldehyde derivative เพื่อให้ได้ความไวสูงสุด องค์ประกอบของ mobile phase ที่เหมาะสมคือ methanol-น้ำ (50-50 v/v) ใน 10 mM citric acid buffer ที่ pH 6.5 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time, peak area และ peak height สำหรับ formaldehyde derivative มีค่า 0.19, 0.54 และ 0.56% ตามลำดับ ค่า detection limit (ศึกษาที่อัตราส่วนสัญญาณต่อ noise เท่ากับ 3) มีค่า 0.08 ng/mL วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ formaldehyde ในเห็ดและแคปซูลยา

คำสำคัญ : เห็ด แคปซูลยา high performance liquid chromatography

Abstract

The high performance liquid chromatography technique for separation and determination of formaldehyde derivatized with 2, 4-pentanedione has been developed by using a monolithic RP-18 column at 412 nm detection wavelength. The pre-column formation of formaldehyde derivative was investigated for the highest sensitivity. The optimal mobile phase composition was methanol-water (50-50 v/v) in 10 mM citric acid buffer at pH 6.5. The standard deviations of retention time, peak area and peak height for formaldehyde

*ผู้รับผิดชอบบทความ : nvachira@yahoo.com

derivative were 0.19, 0.54 and 0.56%, respectively. The detection limit (determined by a signal to noise ratio of 3) was 0.08 ng/mL. The developed method was applied for formaldehyde determination in mushrooms and drug capsules.

Keywords: mushroom, drug capsule, high performance liquid chromatography

1. บทนำ

Formaldehyde มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น methanal, methyl aldehyde, methylene oxide, formalin และ formic aldehyde เป็นต้น มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ formaldehyde ในอาหาร [1] ซึ่งการปนเปื้อนมาจากการนำอาหารไปแช่ใน formalin เพื่อให้อาหารสดและอยู่ได้นานกว่าปกติ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบว่าในเห็ดหอมมี formaldehyde ปนอยู่ประมาณ 400 µg/g [2]

Formaldehyde เป็นสารที่ส่งผลต่อสุขภาพเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะทำให้เกิดอาการแสบตา น้ำตาไหลตลอดเวลา ทำให้ปวดหัวเมื่อสูดดม ปวดท้อง อาเจียน อุจจาระร่วง นอกจากนี้ยังมีผลเสียทำให้การทำงานของตับ ไต หัวใจ และสมองเสื่อมลง ผู้ที่ไวต่อสารนี้จะแสดงอาการปวดศีรษะ หายใจติดขัด และแน่นหน้าอก หากร่างกายได้รับบ่อยๆ พบว่า formaldehyde สามารถทำลายระบบการมองเห็น ระบบทางเดินหายใจ และมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งเม็ดเลือดขาว formaldehyde ถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็งโดย International Agency for Research on Cancer (IARC) [3]

นอกจากมีการปนเปื้อนของ formaldehyde ในอาหารแล้ว ยังพบว่าในขบวนการผลิตแคปซูลยาจาก gelatin มีการเติม formaldehyde ลงไปด้วย เพื่อให้โครงสร้างของ gelatin เกิด crosslink [4,5] มีผลให้แคปซูลยาที่ได้มีความแข็งแรงคงรูปได้มากขึ้น ซึ่ง

แคปซูลยาจะถูกนำไปใช้บรรจุยาผง อาหารเสริม สุขภาพ หรือสมุนไพร แต่เนื่องจาก formaldehyde เป็นสารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกาย กระทรวงสาธารณสุขจึงได้กำหนดให้ formaldehyde เป็นวัตถุห้ามใช้ผสมในอาหาร ดังนั้นหากคนไข้หรือประชาชนกินยา อาหารเสริม หรือสมุนไพรที่บรรจุในแคปซูลเป็นประจำ และต่อเนื่องเป็นเวลานานจะยิ่งทำให้สุขภาพแย่ลง หากแคปซูลนั้นมี formaldehyde ปนเปื้อนอยู่

ปัจจุบันนิยมใช้ C18 bonded phase เป็น column ในการวิเคราะห์ formaldehyde ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ในตัวอย่างต่างๆ เช่น ในตัวอย่างเห็ด [6] เห็ดหอม [2] เครื่องสำอาง [7] polymer [8] blood plasma [9] textile [10] ปลาหมึก [11] และ sugar cane spirits [12] นอกจากนี้มีการใช้เทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) วิเคราะห์ formaldehyde ในตัวอย่างยา [13] รวมทั้งใช้เทคนิค flow injection fluorimetric analysis ในการวิเคราะห์ formaldehyde ในตัวอย่างเครื่องสำอางและอาหาร [14] ตาราง 1 แสดงการเปรียบเทียบเทคนิคการแยกและการปริมาณของ formaldehyde จากตารางจะเห็นว่าหากใช้ chromolith C18 monolithic column [11] แทน bonded phase C18 จะมีผลให้ retention time ของ formaldehyde derivative เร็วขึ้น การวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาเทคนิค HPLC โดยใช้ monolithic column RP-18 สำหรับการวิเคราะห์ formaldehyde ในตัวอย่างเห็ดและแคปซูลยาเพื่อให้มีความไวในการตรวจวัด

เพิ่มขึ้นหรือ limit of detection ลดลง และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้สำหรับหาปริมาณ formaldehyde

ตัวอย่าง	Method-Column (loop)	Detection (derivatizing agent)	Detection limit (ng/mL)	Retention time (min)	เอกสาร อ้างอิง
เห็ดหอม (Shiitake mushroom)	HPLC-C18 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m (10 μ L)	352 nm (DNPH)*	5	4	[2]
เหล้า (spirits)	HPLC-C18 150 mm x 3.9 mm i.d., 4 μ m (20 μ L)	365 nm (ethyl 3- oxobutanoate)	24	3	[5]
เครื่องสำอาง (cosmetics)	HPLC-C8 250 mm x 4mm i.d., 10 μ m (10 μ L)	345 nm (DNPH)*	200	11	[6]
polymer	HPLC-C18 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m (100 μ L)	360 nm	-	12	[7]
blood plasma	HPLC-C18 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m (10 μ L)	Fluorescence detector (ampicillin)	460	8	[8]
textiles	HPLC-C18 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m	360 nm (DNPH)*	60	6	[9]
ปลาหมึก (squid)	HPLC-C18 200 mm x 4.6 mm, 5 μ m (20 μ L)	355 nm (DNPH)*	8.92	8	[10]
sugar cane spirit	HPLC-Chromolith C18 100 mm x 4.6mm (20 μ L)	365 nm (DNPH)*	8	1	[11]
ยา (pharmaceutical excipients)	GC-MS	MS detector (ethanol)	-	3.4	[12]
เครื่องดื่มและ อาหาร	Flow injection	Fluorescence detector (cyclohexane-1,3-dione) 412 nm (2,4-pentanedione)	0.04	-	[13]
แคปซูลยา	HPLC-Chromolith C18 100 mm x 4.6mm (20 μ L)	Fluorescence detector (cyclohexane-1,3-dione) 412 nm (2,4-pentanedione)	0.08	1.3	งานวิจัยนี้

*DNPH = 2,4-dinitrophenylhydrazine

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ

เครื่อง HPLC ประกอบด้วย gradient pump ของ Waters (Milford, MA, USA) Model 600E และ injector loop เป็น Rheodyne (Cotani, CA, USA) Model 7125 stainless steel injector (20 μ L loop) มี UV-VIS detector (Jasco, Tokyo, Japan) ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 412 nm ใช้ Chromolith RP-18 (100 mm x 4.6 mm I.D., Merck) เป็น analytical column และต่ออยู่กับ C18 (10 μ m) guard column, flow rate ของ mobile phase เป็น 2 mL/min และอุณหภูมิของ column ควบคุมไว้ที่ 30°C, Sep-Pak C18 จาก Waters, เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer Lamda 35 (Perkin Elmer, USA)

2.2 สารเคมี

น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ผ่านการกลั่นและ deionised (DI water) สารเคมีได้แก่ HPLC grade methanol, 37% formaldehyde, ammonium acetate, 2,4-pentanedione, acetic acid and citric acid จาก Merck (Darmstadt, Germany) เห็ดต่างๆ (เห็ดหอมแห้ง เห็ดหอมสด เห็ดหูหนู เห็ดเข็มทอง เห็ดนางฟ้า เห็ดฟาง เห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดเออรินจิ เห็ดโคน ญี่ปุ่น, white crab mushroom และ brown beech mushroom) ซื้อจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้า สำหรับแคปซูลยาซื้อจากร้านขายยา คลินิกแพทย์แผนจีน และโรงพยาบาล ทั้งในประเทศไทยและประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

Mobile phase สำหรับการตรวจวัด formaldehyde derivative ในตัวอย่างแคปซูลยา ประกอบด้วย 50% methanol ใน 10 mM citric buffer ที่ pH 6.5

Mobile phase สำหรับการตรวจวัด formaldehyde derivative ในตัวอย่างเห็ดประกอบด้วย 46% methanol ใน 10 mM citric buffer ที่ pH 6.5

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียม 2,4-pentanedione

ชั่ง 15 g ของ ammonium acetate เติม acetic acid เข้มข้น 0.3 mL และ 0.1637 g ของ 2,4-pentanedione ตามด้วยน้ำ 50 mL นำสารละลายไปปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 จากนั้นปรับปริมาตรใน volumetric flask เป็น 100 mL สารละลายมี 2,4-pentanedione เข้มข้น 16.7 mM

2.3.2 การเตรียม standard formaldehyde derivative

Formaldehyde derivative ของ standard ความเข้มข้นต่างๆ เตรียมโดยเจือจาง 11.1 μ g/mL ของ standard formaldehyde ก่อนเดิม 4 mL ของสารละลาย 2,4-pentanedione และนำสารละลายไปอุ่นใน water bath ที่ 40°C นาน 30 นาที แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วยน้ำ

2.3.3 การสกัดและการเกิด formaldehyde derivative ในตัวอย่าง

(1) ตัวอย่างเห็ด ชั่งเห็ดหนัก 5 g และน้ำ 200 mL ใส่ลงในเครื่องปั่น หลังปั่นจนเห็ดละเอียด นำสารทั้งหมดไป ultrasonic นาน 40 นาที จากนั้นกรองแยกอนุภาคขนาดใหญ่ออกด้วยตะแกรงละเอียด ส่วนที่เหลือนำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 4000 rpm นาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส 5 mL ใส่ใน beaker เติม 4 mL ของสารละลาย 2,4-pentanedione นำสารละลายไปอุ่นใน water bath ที่ 40°C นาน 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 25 mL ด้วยน้ำ กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 0.45 μ m ก่อนฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

ในการหาปริมาณ formaldehyde ในตัวอย่างหีดด้วยวิธี standard addition จะมีการเติม standard formaldehyde ลงไปใน beaker ก่อนเติมสารละลาย 2,4-pentanedione

(2) ตัวอย่างแคปซูลยา ชั่งแคปซูลยา 0.2 g เติมน้ำ 40 mL ลงในแคปซูลยาที่บรรจุใน beaker คนสารละลายด้วย magnetic stirrer นาน 10 นาที ยกเว้นแคปซูลยาต้องให้ความร้อนที่ 70°C ควบคู่ไปกับการคนสารตัวอย่างจนสารตัวอย่างละลายเป็นสารแขวนลอยเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารตัวอย่างลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และทำให้ถึงขีดปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้น pipet สารละลาย 10 mL ใส่ใน beaker และเติม 4 mL ของสารละลาย 2,4-pentanedione นำสารละลายไปอุ่นใน water bath ที่ 40°C นาน 30 นาที และปรับปริมาตรสารตัวอย่างเป็น 25 mL ด้วยน้ำ

ผ่าน methanol (3 mL) เข้าใน C18 cartridge ตามด้วยน้ำ 15 mL จากนั้นผ่านสารตัวอย่าง (2.5 mL) ซ้ำๆ เข้าสู่ C18 cartridge และตามด้วยน้ำ 20 mL formaldehyde จะถูก eluted ออกจาก C18 cartridge แบบ direct flushed ด้วยการผ่าน methanol ซ้ำๆ 3 mL เข้าสู่ volumetric flask ขนาด 5 mL และทำให้ถึงขีดปริมาตรด้วยน้ำ สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้า HPLC และ peak area ของ formaldehyde จะวัดที่ 412 nm

3. ผลและการวิจารณ์ผล

จากตาราง 1 จะเห็นว่าจะมีการเปลี่ยนให้ formaldehyde อยู่ในรูป formaldehyde derivative โดยให้ formaldehyde ทำปฏิกิริยากับสารบางตัวเช่น 2,4-dinitrophenylhydrazine [2, 6, 9-11] ก่อนจะตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ bonded phase C18 และ

monolithic column C18 เป็น analytical column ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเห็นว่า monolithic column C18 จะใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า bonded phase C18 ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ monolithic column C18 และต้องการพัฒนาเทคนิค HPLC ให้มีความไว (sensitivity) มากขึ้น โดยใช้ 2,4-pentanedione เป็น derivatizing agent พบว่า formaldehyde derivative ของมันจะให้ absorbance สูงสุดที่ความยาวคลื่น 412 nm จึงเลือกความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ที่ 412 nm

3.1 การสกัด formaldehyde และการเกิด formaldehyde derivative ในสารตัวอย่าง

3.1.1 ตัวอย่างหีดหอม

Formaldehyde เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี หลังจากสกัดสามารถนำมาทำปฏิกิริยาได้กับ 2,4-pentanedione ภายใต้อุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที พบว่า formaldehyde derivative ที่เกิดขึ้นเสถียรนาน 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาว่าถ้าต้องการให้ formaldehyde ออกจากเนื้อเยื่อหีดหอมหมด ต้องใช้เวลาและอุณหภูมิเท่าใด การทดลองเริ่มจากนำหีดหอมที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ 4 g ใส่ใน beaker เติมน้ำ 100 mL จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100°C บน hot plate ด้วยระยะเวลา 30 นาที 60 นาที และ 90 นาที ที่แต่ละอุณหภูมิ โดยทำในระบบปิด เปรียบเทียบกับระบบเปิด ผลการทดลองแสดงดังตาราง 2 จากตารางจะเห็นว่าถ้าให้ความร้อน 100°C กับตัวอย่างหีดหอมในระบบเปิด formaldehyde จะถูกกำจัดออกหมดภายใน 30 นาที

3.1.2 ตัวอย่างแคปซูลยา

หลังจากละลายแคปซูลยาและ formaldehyde ทำปฏิกิริยากับ 2,4-pentanedione ได้ formaldehyde derivative แล้ว จำเป็นต้องกำจัด

matrix ออกจากตัวอย่างก่อนจะฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC วิธีการทำได้โดยผ่านสารตัวอย่างเข้า C18 cartridge และล้าง matrix ออกจาก C18 ด้วยน้ำ แต่ formaldehyde derivative ยังคงติดอยู่กับ C18

cartridge จากนั้น elute formaldehyde derivative ออกจาก C18 cartridge โดยใช้ methanol 3 ml และปรับให้ครบปริมาตรด้วยน้ำ

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณ formaldehyde ที่ตรวจพบในเนื้อเชื้อเห็ดหลังจากให้ความร้อนด้วยระยะเวลาที่ต่างกันและที่อุณหภูมิในระบบปิดและในระบบเปิด

ระบบ	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (นาท)	ปริมาณ Formaldehyde ที่พบในเนื้อเชื้อเห็ดหอมแห้ง (µg/mL)
ปิด	80	30	154
		60	91
		90	62
	90	30	71
		60	30
		90	19
	100	30	36
		60	22
		90	8
เปิด	80	30	136
		60	73
		90	45
	90	30	37
		60	20
		90	12
	100	30	ตรวจไม่พบ
		60	ตรวจไม่พบ
		90	ตรวจไม่พบ

3.2 Separation parameters ในตัวอย่าง

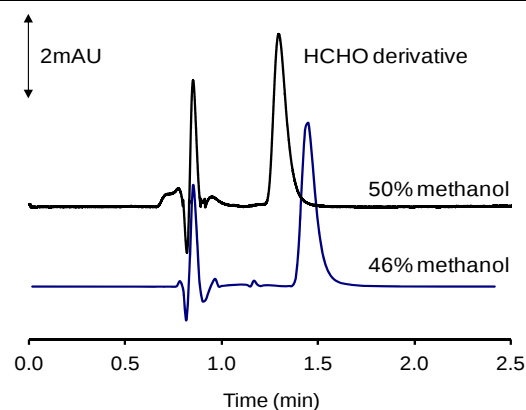
การวิเคราะห์หา formaldehyde ในรูปของอนุพันธ์ เพื่อให้ได้ความไว (sensitivity) สูงสุด จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความไว

(sensitivity) ของ formaldehyde derivative ได้แก่ ความเข้มข้นของ 2,4-pentanedione และ pH ของ formaldehyde derivative ที่เหมาะสม ซึ่งความเข้มข้นของ 2,4-pentanedione ที่เหมาะสมสำหรับเตรียม

standard และตัวอย่าง คือต้องใส่ 2,4-pentanedione เข้มข้น 16.7 mM ปริมาตร 4 mL และ pH ของ formaldehyde complex ที่เหมาะสมคือ 6.5

สภาวะที่เหมาะสมของ mobile phase มีความสำคัญในการแยกของสาร ซึ่งจะสามารถกำหนด retention time ได้ นอกจากนี้ pH ของ mobile phase ก็มีผลต่อ peak height และ peak area ของ formaldehyde derivative ดังนั้นจึงทำการศึกษาชนิดของ buffer โดยเปรียบเทียบ peak height ที่ได้จาก acetate และ citrate buffer ที่ $\text{pH}=\text{pK}_a$ ของกรด acetic และกรด citric พบว่า peak height ของ citrate buffer ให้ peak height สูงกว่า หลังจากนั้นศึกษาอิทธิพลของ pH ในช่วง 6.3, 6.5, และ 7.0 ของ citrate buffer พบว่า pH 6.5 ให้ peak height สูงที่สุด จึงเลือก pH ที่ 6.5

จากการทดลองพบว่าถ้า mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (50-50 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 จะเหมาะสมในการตรวจวัด formaldehyde ในแคปซูลยาและ retention time ของ formaldehyde derivative มีค่า 1.29 นาที แต่ในตัวอย่างหีด mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (46-54 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 จะเหมาะสมในการตรวจวัด formaldehyde ในหีดและ retention time ของ formaldehyde derivative มีค่า 1.47 นาที เนื่องจากในตัวอย่างหีดบางชนิดจะมีสัญญาณรบกวนบริเวณ base line ที่เวลา 1.3 นาที จึงลด methanol ลงเหลือเพียง 46% รูปที่ 1 เป็น chromatogram ของ standard formaldehyde derivative ที่มี mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (50-50 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 และ mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (46-54 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5



รูปที่ 1 Chromatogram ของ standard formaldehyde derivative (10 ppb) ที่มี mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (50-50 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 และ mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (46-54 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5

3.3 Analytical performance characteristics

ค่า detection limit (ศึกษาที่อัตราส่วนสัญญาณต่อ noise เท่ากับ 3) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% RSD) ของ retention time, peak area และ peak height ของ formaldehyde derivative ที่ได้จาก mobile phase ที่มี methanol-น้ำ (50-50 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 และ mobile phase ประกอบด้วย methanol-น้ำ (46-54 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 แสดงไว้ในตารางที่ 3

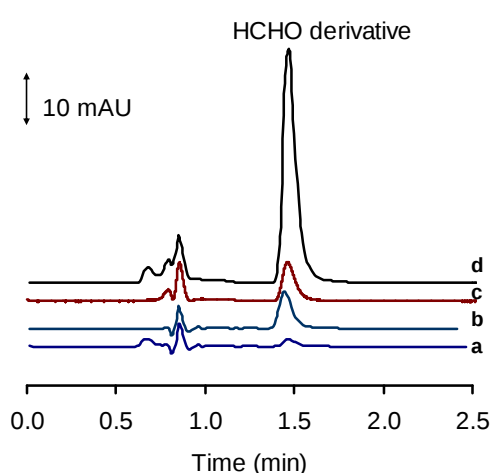
Linearity ของ formaldehyde derivative จะศึกษาอยู่ในช่วงความเข้มข้น 2 ng/mL-1500 ng/mL ที่ความเข้มข้นมากกว่านี้ จะเกิดการตกตะกอนสำหรับ mobile phase ที่ประกอบด้วย methanol-น้ำ (50-50 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 ให้ linearity equation คือ $y=1673.2x+11152$ ($R^2=0.9996$) และ mobile phase ที่ประกอบด้วย methanol-น้ำ (46-

54 v/v) ใน 10 mM citrate buffer ที่ pH 6.5 ให้ 0.9998)

linearity equation คือ $y = 147952X + 1849.4$ ($R^2 =$

ตารางที่ 3 Detection limit และ % RSD ของ retention time, peak area และ peak height ของ formaldehyde derivative

Mobile phase	Detection limit (ng/mL)	% RSD สำหรับ intraday (n=10)			% RSD สำหรับ interday (n=10)		
		Retention time	Peak area	Peak height	Retention time	Peak area	Peak height
50% methanol	0.08	0.19	0.54	0.56	0.34	0.45	0.55
46% methanol	0.12	0.17	0.24	0.44	0.32	0.40	0.52



รูปที่ 2 Chromatograms ของ (a) blank (b) standard 10 ppb HCHO (c) เห็ดหอมสด (UDS) และ (d) เห็ดหอมแห้ง Mobile phase ประกอบด้วย 46% MeOH ใน 10 mM citric acid ที่ pH 6.5 Injection loop 20 μ L; detection: 412 nm

3.4 การหาปริมาณ formaldehyde ในสารตัวอย่าง

3.4.1 ตัวอย่างเห็ด เห็ดที่นำมาหาปริมาณ formaldehyde มีหลายสายพันธุ์คือ เห็ดหอมแห้ง

เห็ดหอมสด เห็ดหูหนู เห็ดเข็มทอง เห็ดนางฟ้า เห็ดฟาง เห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดเออรินจิ เห็ดโคนญี่ปุ่น white crab mushroom และ brown beech mushroom จากการศึกษาค่า % recovery พบว่าตัวอย่างเห็ดที่มี matrix จึงจำเป็นต้องหาปริมาณ formaldehyde ในตัวอย่างเห็ดด้วยวิธี standard addition ตัวอย่างเห็ดที่ตรวจพบ formaldehyde มีเฉพาะในเห็ดหอมแห้งและเห็ดหอมสด ซึ่งมีค่าแตกต่างกันดังแสดงในตาราง 4 จากตารางจะเห็นว่าปริมาณ formaldehyde ที่ตรวจพบในเห็ดหอมแห้งมีมากกว่าในเห็ดหอมสด (รูปที่ 2)

3.4.2 แคปซูลยา ตัวอย่างแคปซูลยาที่นำมาหาปริมาณ formaldehyde ได้มาจากแคปซูลเปล่าที่ขายในร้านขายยาทั่วไป แคปซูลยาที่มีสมุนไพรจากร้านแพทย์แผนจีนทั้งในประเทศไทยและประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน รวมทั้งแคปซูลยาที่บรรจุยาปฏิชีวนะที่แพทย์และเภสัชกรจ่ายให้คนไข้ โดยแคปซูลที่มีตัวยาบรรจุอยู่จะเทตัวยาวออกหมดและทำความสะอาดก่อนนำมาทดสอบ พบว่าหลังจากละลายแคปซูลยาและกำจัด matrix ออกโดยการผ่านตัวอย่างเข้า C18 cartridge จะไม่มี matrix มารบกวนการ

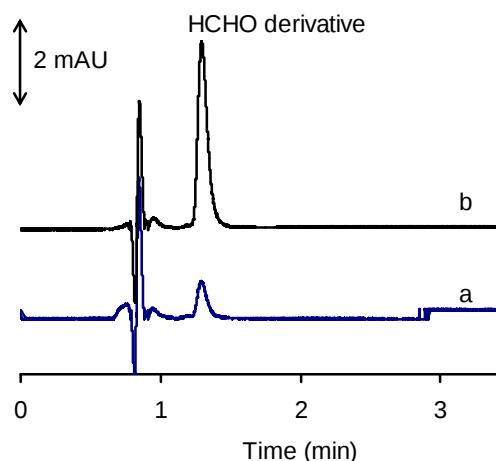
วิเคราะห์ จึงสามารถใช้ external calibration curve มาหาปริมาณ formaldehyde ได้ จากการศึกษาค่า % recovery โดย spike formaldehyde ลงในตัวอย่าง แคปซูลยา (n=3) พบว่าได้ % recovery อยู่ในช่วง 97.3% ถึง 100.05% ปริมาณ formaldehyde ที่ตรวจพบในแคปซูลยาแสดงในตาราง 5 ซึ่งพบ formaldehyde ในตัวอย่างแคปซูลยามากน้อยต่างกัน (รูปที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณ formaldehyde ที่ตรวจพบในเห็ด

เห็ด	ปริมาณ formaldehyde ที่พบในเนื้อเยื่อเห็ด (µg/mL)
เห็ดหอมแห้ง	
ตัวอย่าง 1 (STM)	58
ตัวอย่าง 2 (MTM)	9.8
ตัวอย่าง 3 (LTM)	37
ตัวอย่าง 4 (LJM)	425
เห็ดหอมสด	
ตัวอย่าง 1 (MC)	0.4
ตัวอย่าง 2 (V)	13
ตัวอย่าง 3 (D)	1
ตัวอย่าง 4 (UDS)	2.2
ตัวอย่าง 5 (TT)	4
ตัวอย่าง 6 (HD)	2.6
เห็ดฟาง	ตรวจไม่พบ
เห็ดหูหนูดำ	ตรวจไม่พบ
เห็ดหูหนูขาว	ตรวจไม่พบ
เห็ดนางฟ้า	ตรวจไม่พบ
เห็ดนางรม	ตรวจไม่พบ
เห็ดหิมะ	ตรวจไม่พบ
เห็ดเข็มทอง	ตรวจไม่พบ
เห็ดภูฐาน	ตรวจไม่พบ
เห็ดเออรินจิ	ตรวจไม่พบ
เห็ดโคนญี่ปุ่น	ตรวจไม่พบ
white crab mushroom	ตรวจไม่พบ
brown beech mushroom	ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 5 ปริมาณ formaldehyde ที่ตรวจพบใน
แคปซูล

สีแคปซูลยา	Formaldehyde (ng/mL) $\pm$ SD (n=3)
ใสไม่มีสี (SR)	609 $\pm$ 8.50
ขาว-ชมพู	290 $\pm$ 4.00
เหลือง-ฟ้า	782 $\pm$ 7.02
เหลือง	305 $\pm$ 4.51
ใสไม่มีสี (CN)	351 $\pm$ 3.51
ใสไม่มีสี (SL)	1029 $\pm$ 8.50
เขียว-ฟ้า	6383 $\pm$ 7.00

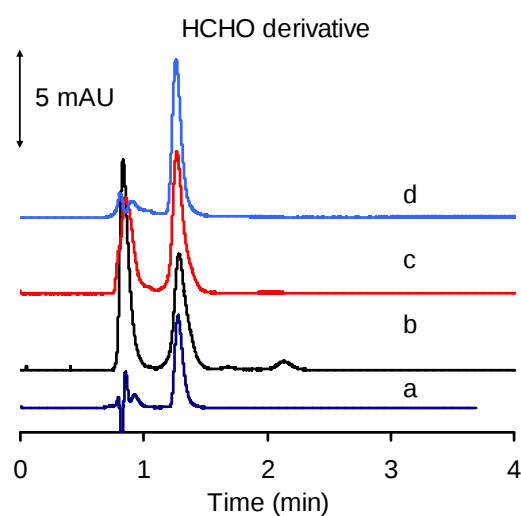


รูปที่ 3 Chromatograms ของ (a) blank และ (b) standard 10 ppb HCHO Mobile phase ประกอบด้วย 50% MeOH, 10 mM citric acid pH 6.5 Injection loop 20 μ L; detection: 412 nm

4. สรุปผลการทดลอง

เวลาที่ใช้ในการหาปริมาณ formaldehyde ในรูป formaldehyde derivative ด้วยเทคนิค HPLC

หลังจาก formaldehyde ทำปฏิกิริยากับ 2,4-pentanedione ได้ค่า retention time น้อยกว่า 1.5 นาทีและมีความไวสูงในการตรวจวัดเมื่อใช้ monolithic C18 column ในการแยกสาร โดยไม่มี peak อื่นรบกวนในการวิเคราะห์ เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ formaldehyde ในตัวอย่างเห็ดชนิดต่างๆ และแคปซูลยา ซึ่งการทดลองพบ formaldehyde ปนเปื้อนทั้งในตัวอย่างเห็ดหอมและแคปซูลยาคูที่นำมาทดสอบ



รูปที่ 4 Chromatograms ของ (a) 10 ppb HCHO derivative (b) แคปซูลสีเหลือง-ฟ้า (c) แคปซูลสีเขียว-ฟ้า และ (d) แคปซูลใสไม่มีสี (SL)

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่ให้การสนับสนุนในการใช้เครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งงบประมาณที่มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ให้การสนับสนุน

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Cui, X., Fang, G., Jiang, L. and Wang, S., 2007, Kinetic spectrophotometric method for rapid determination of trace formaldehyde in foods, *Anal. Chim. Acta* 590: 253-259.
- [2] Liu, J.F., Peng, J.F., Chi, Y.G. and Jiang, G.B., 2005, Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography, *Talanta* 65: 705-709.
- [3] Cogliano, V.J., Grosse, Y., Baan, R.A., Straif, K., Secretan, M.B. and Ghissassi, F.E., 2005, Meeting report: Summary of IARC monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxy-2-propanol, *Env. Health Pers.* 113: 1205-1208.
- [4] Albert, K., Peters, B., Bayer, E., Treiber, U. and Zwilling, M., 1986, Crosslinking of gelatin with formaldehyde a ¹³-C NMR study, *Zeit. für Natur.* 41b(35): 1-358.
- [5] Davis, P. and Tabor, B.E., 1963, Kinetic study of the crosslinking of gelatin by formaldehyde and glyoxal, *J. Polymer Sci. Part: A-1*: 799-815.
- [6] Burini, G. and Coli, R., 2004, Determination of formaldehyde in spirits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection after derivatization, *Anal. Chim. Acta* 511: 155-158.
- [7] Wu, P.W., Chang, C.C. and Chou, S.S., 2003, Determination of formaldehyde in cosmetics by HPLC method and acetylacetone method, *J. Food Drug Anal.* 11: 8-15.
- [8] Michels, J., 2001, Improved measurement of formaldehyde in water-soluble polymers by high performance liquid chromatography coupled with post-column reaction detection, *J. Chroma. A* 914: 123-129.
- [9] Luo, W., Li, H., Zhang, Y. and Ang, C.Y. W., 2001, Determination of formaldehyde in blood plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chroma. B* 753: 253-257.
- [10] Chen, L., Jin, H., Wang, L., Sun, L., Xu, H., Ding, L., Yu, A. and Zhang, H., 2008, Dynamic ultrasound-assisted extraction coupled on-line with solid support derivatization and high performance liquid chromatography for the determination of formaldehyde in textiles, *J. Chroma. A* 1192: 89-94.
- [11] Li, J., Zhu, J. and Ye, L., 2007, Determination of formaldehyde in squid by high performance liquid chromatography, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16 (Suppl. 1): 127-130.
- [12] Penteado, J.C.P., Sobral, A.C. and Masini, J.C., 2008, Evaluation of monolithic columns for determination of formaldehyde and acetaldehyde in sugar cane spirits by high performance liquid chromatography, *Anal. Lett.* 41: 1674-1681.
- [13] Barrio, M.A., Hu, J., Zhou, P. and Cauchon, N., 2006, Simultaneous determination of formic acid and formaldehyde in pharmaceuticals

-
- | | |
|--|---|
| <p>cal excipients using headspace GC/MS, J. Pharm. Biomed. Anal. 41: 738-743.</p> <p>[14] Zhao, X.Q. and Zhang, Z.Q., 2009, Rapid and sensitive determination of formaldehyde in</p> | <p>some beverages and foods by flow injection fluorimetric analysis, Int. J. Food Sci. Tech. 44: 216-221.</p> |
|--|---|