

ชื่อวิทยานิพนธ์	วิเคราะห์สารประกอบเฮเทอโรโรไซคลิกเอมีน (IQ, MeIQx, PhIP) ในอาหาร โดยแก๊สโครมาโตกราฟี
ผู้เขียน	นางสาววราภรณ์ รัศมีพะกาย
สาขาวิชา	เคมีวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2547

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้วิเคราะห์สารประกอบเฮเทอโรโรไซคลิกเอมีน(เอชซีเอ)ปริมาณน้อยในอาหาร 3 ตัว ได้แก่ ไอคิว เอ็มอีไอคิวเอก และ พีเอชไอพี โดยเอชซีเอจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์เอ็นไดเมทิลอะมิโนเมทิลลิน จากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ ยืนยันลักษณะโครงสร้างของอนุพันธ์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (GC-MS) และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีใช้กะปิลาริคอลัมน์ชนิดพีอี17อุณหภูมิสูง (PE-17 ht) ยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร (50% ฟีนิล-50%เมทิลโพลีไซลอคแซน)ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัส(NPD)สภาวะการทดลองที่เหมาะสมได้แก่ อัตราการไหลของแก๊สพา(ฮีเลียม)1.5 มิลลิตรต่อนาทีโปรแกรมอุณหภูมิคอลัมน์ อุณหภูมิเริ่มต้น 190 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้ 3 นาที และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 35องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิต่อด้วยอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีไปจนถึง 330 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิต่อท้ายไว้ 5 นาที อุณหภูมิหัวฉีด 300 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิตัวตรวจวัด 340 องศาเซลเซียส ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดการตรวจวัดระหว่างเทคนิค GC-MS และ GC-NPD ผลการศึกษาสำหรับเทคนิค GC-NPD ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.8-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยค่าสหสัมพันธ์ของเส้นตรง ( $R^2$ ) มากกว่า 0.99 และให้ค่าความแม่นยำโดยมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 4% ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด 0.5-5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับเทคนิค GC-MS ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.2-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรและขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.1-1.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบคอลัมน์ระหว่างกะปิลาริคอลัมน์ชนิดพีอี17อุณหภูมิสูงและเอชพี5(HP-5)ยาว30 เมตรขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตรและความหนาของฟิล์ม(5%ฟีนิล-95%เมทิลโพลีไซลอคแซน) 0.25 ไมโครเมตร สภาวะที่เหมาะสมสำหรับกะปิลาริคอลัมน์ชนิดเอชพี5 ได้แก่ อัตราการไหลของแก๊สพา (ฮีเลียม)

ของแก๊สพา (ฮีเลียม) 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โปรแกรมอุณหภูมิคอลัมน์ อุณหภูมิเริ่มต้น 190 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้ 3 นาที และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 35 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิต่อด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีไปจนถึง 300 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิต่อด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีไปจนถึง 300 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิต่อด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีไปจนถึง 300 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ 5 ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.3 ถึง 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยค่าสหสัมพันธ์ของเส้นตรง ( $R^2$ ) มากกว่า 0.99 และให้ค่าความแม่นยำโดยมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 4 % และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด 0.30-5.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งให้ค่าที่ต่ำกว่าอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ 17 อุณหภูมิสูง

ได้ทำการศึกษาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์สารเอชซีเอโดยเทคนิคการสกัดด้วยอัลตราโซนิก ร่วมกับเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งชนิดไดอะตอมมาเซียส เอิร์ท, โพรพิลพัลโฟนิกเอซิด (พีอาร์เอส, 500 มิลลิกรัม) และออกตะเดซิล ไชลีน (คาร์บอน 18, 100 มิลลิกรัม) สภาวะการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมได้แก่ เวลาในการสกัดด้วยอัลตราโซนิก 2 ชั่วโมง อัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม (3% โทลูอีนในไดคลอโรมีเทนโดยปริมาตร) 2 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ 5 ไดอะตอมมาเซียสเอิร์ทด้วยปริมาตร 60 มิลลิตรและ 25 มิลลิตรของ 0.5 โมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตทพีเอช 8.0 สำหรับอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ 18 คอลัมน์ และ 2.5 มิลลิตรของตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับแอมโมเนียในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร สำหรับอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ 18 คอลัมน์

ค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสารเอชซีเอแต่ละตัวเป็นดังนี้ IQ: 55.1-90.0 %, MeIQx: 36.3-63.0% และ PhIP: 33.2-82.3% ได้สุ่มเก็บตัวอย่างไก่ย่าง ไก่ทอด หมูย่าง แฮมเบอร์เกอร์เนื้อปลาย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเอชซีเอต่ำกว่าขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธี ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณของเอชซีเอในตัวอย่างอาหารทำโดยนำวิธี Standard Addition มาร่วมด้วยได้ค่าการปนเปื้อนของเอชซีเออยู่ในช่วงต่ำกว่าขีดจำกัดการตรวจวัดถึง 0.11 นาโนกรัมต่อกรัม

Thesis Title	Analysis of Heterocyclic Amines (IQ, MeIQx, PhIP) in Foods by Gas Chromatography
Author	Miss Waraporn Ratsameepakai
Major	Analytical Chemistry
Academic	2004

### ABSTRACT

Analysis of three HCAs, *i.e.* IQ, MeIQx and PhIP were done by converting them into their N- dimethylaminomethylene derivatives at an optimum reaction temperature of 90°C and optimum time at 10 minutes. HCA derivatives were confirmed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and analyzed by gas chromatography equipped with nitrogen-phosphorus detector (NPD) and 30 m × 0.25 mm i.d., × 0.25 μm film thickness (50%phenyl-50%methylpolysiloxane) PE-17 ht. Optimum conditions were optimized and obtained, *i.e.*, the carrier gas (helium) flow rate at 1.5 mL min<sup>-1</sup>; the column temperature programming was obtained as: initial temperature 190°C hold for 3 minutes, ramped at 35°C/min to 280°C and then continuously ramped at 10°C/min to a final temperature of 330°C (hold 5 minutes). Injector and detector temperatures were 300 °C and 340°C respectively. Analysis using GC-NPD and GC-MS were compared. The GC-NPD system provided the linear dynamic range in the range of 0.8 and 100 ng μL<sup>-1</sup> with linear regression coefficient (R<sup>2</sup>) greater than 0.99, the relative standard deviation (%RSD) of less than 4%, and limit of detection in the range of 0.5-5.0 ng μL<sup>-1</sup>. The GC-MS system provided the linear dynamic range in the range of 0.2 to 100 ng μL<sup>-1</sup> and limit of detection in the range of 0.1 and 1.0 ng μL<sup>-1</sup>. In addition, the capillary column of PE-17 ht and HP-5 a 30 m × 0.32 mm i.d., × 0.25 μm film thickness (5%phenyl-95%methylpolysiloxane) HP-5 and were compared. Optimum conditions of GC-NPD equipped with

HP-5 were obtained as; the carrier gas flow rate  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ , column temperature programming: initial temperature was maintained at  $190^{\circ}\text{C}$  for 3 minutes, then raised to  $280^{\circ}\text{C}$ , at  $35^{\circ}\text{C/min}$ , immediately ramp to  $300^{\circ}\text{C}$  with a ramp rate of  $10^{\circ}\text{C/min}$ , and finally hold for 5 minutes. The optimum injector and detector temperatures were  $300^{\circ}\text{C}$ . The results showed that HP-5 provided a better performance than PE-17 ht, giving the linear dynamic range in between  $0.3$  and  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  with linear regression coefficient ( $R^2$ ) greater than  $0.99$ , the relative standard deviation (%RSD) of less than  $4\%$ , and limit of detection in the range of  $0.3\text{-}5.0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

Sample preparation for HCAs in food samples was investigated by ultrasonic extraction and solid phase extraction using diatomaceous earth, a propylsulfonic acid silica (PRS,  $500 \text{ mg}$ ) cartridge and octadecylsilane ( $\text{C}_{18}$ ,  $100 \text{ mg}$ ) cartridge. The optimum conditions for extraction HCAs 2 hours of extraction time,  $60 \text{ mL}$  of  $3\%$  toluene in dichloromethane  $2 \text{ mL min}^{-1}$  flow rate of eluent from diatomaceous earth column,  $25 \text{ mL}$  of  $0.5 \text{ M}$  ammonium acetate,  $\text{pH } 8.0$  and  $2.5 \text{ mL}$  of  $\text{CH}_3\text{OH-NH}_3\text{OH}$ .

The percentage recovery of each HCA was, IQ:  $55.1\text{-}90.0\%$ , MeIQx,  $36.3\text{-}63.0\%$  and PhIP:  $33.2\text{-}82.3\%$ . Cooked meat samples such as grilled chicken, pork, fish, hamburger beef, and fried chicken were sampling from local supermarkets. The concentrations of HCAs were in trace level and lower than the limit of detection. This was confirmed by standard addition method where the results showed the concentration in the range of not detected to  $0.11 \mu\text{g g}^{-1}$ .