

การหาปริมาณเบนซีน โทลูอิน เอทิลเบนซีน ไซลีน และเอ็มทีบีอี ในเลือดโดยเทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน

ธนสร ต้นสูงขาม^{1*} นันทนา ชูฉัตร² บุญเทียม เทพพิทักษ์ศักดิ์¹

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีการที่ง่ายเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ระเหยง่ายประเภท เบนซีน โทลูอิน เอทิลเบนซีน ไซลีน (ซึ่งรวมเรียกว่า BTEX) และ เอ็มทีบีอี (MTBE) ในเลือดด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน (HS-SPME) ผลการศึกษาพบว่า วิธีการนี้มีความจำเพาะ ความไว การทำซ้ำ และความแม่นยำสูง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ≥ 0.997 ค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของสารเบนซีน โทลูอิน เอทิลเบนซีน เอ็ม-พี-ไซลีน โอ-ไซลีน และ เอ็มทีบีอี มีค่า 23.5, 40.6, 48.3, 68.1, 77.6 และ 39.1 นาโนกรัมต่อลิตรตามลำดับ วิธีการนี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประโยชน์ในการประเมินการรับสัมผัสสาร BTEX และ MTBE จากการประกอบอาชีพหรือจากสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: สารอินทรีย์ระเหยง่าย, การวิเคราะห์, เฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน, เลือด

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

²ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

*ติดต่อได้ที่ kalayanee.t@chula.ac.th, โทรศัพท์ 0 2218 8156, โทรสาร 0 2253 2395

Headspace-Solid Phase Micro-extraction for Determination of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene and MTBE in Blood

Tanasorn Tunsaringkarn^{1,}, Nantana Choochat², Boontiem Theppitaksak¹*

Abstract

The simple analytical method for volatile organic compounds (VOCs) as benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX) and MTBE in blood by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) was developed. The method showed high specificity, sensitivity, repeatability and linearity with correlation coefficients of ≥ 0.997 . The limit of detection of benzene, toluene, ethylbenzene, m-, p-xylene, o-xylene and MTBE were 23.4, 40.6, 48.3, 68.1, 77.6 and 39.1 ng/L respectively. It is a useful alternative method to assess human exposure to BTEX and MTBE compounds due to occupational or eventual exposure from environment.

Key words: volatile organic compound, analysis, headspace–solid phase micro-extraction, blood

¹Institute of Health Research, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²Scientific and Technological Equipment Research Centre, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

*Correspondence to kalayanee.t@chula.ac.th, Tel. 0 2218 8156, Fax. 0 2253 2395

บทนำ

สารอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเบนซีน โทลูอิน เอทิลเบนซีน ไซลีน (รวมเรียกว่า BTEX) เป็นสารประกอบที่สำคัญและใช้มากในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น พลาสติก ปิโตรเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นส่วนผสมของน้ำมันเบนซิน ซึ่งในปัจจุบันมีการเติมสารเอ็มทีบีอี (MTBE; methyl tertiary butylether) เพื่อปรับปรุงคุณภาพแทนสารตะกั่วที่รัฐบาลประกาศให้เลิกใช้ตั้งแต่ปี พ.ศ.2539 จากรายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อมของกรุงเทพมหานคร¹ พบว่า สารอินทรีย์ระเหยง่ายต่างๆ เหล่านี้จะถูกปลดปล่อยจากแหล่งกำเนิดต่างๆเป็นจำนวนมากใกล้เคียงกับสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนที่ปล่อยออกมาจากท่อไอเสียรถยนต์ชนิดต่างๆ ซึ่งจะส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม² และสุขภาพอนามัยของประชาชนอีกด้วย³⁻⁶ ดังนั้นการหาวิธีการที่สามารถตรวจวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE เหล่านี้ในสารคัดหลั่งจากร่างกาย (biological fluid) ของมนุษย์ เช่น เลือด จักเป็นประโยชน์ในการศึกษาผลกระทบต่อร่างกายจากการรับสัมผัสสารเหล่านี้ซึ่งมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม

เทคนิคเฮดสเปซ (Headspace, HS) เป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้หาปริมาณสารต่างๆ ที่มีปริมาณน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารจำพวกสารระเหยง่าย (very volatile substance) เพราะจะให้ความไว (sensitivity) และความถูกต้อง (precision) ในการวัดสูง ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการโดยใช้เฮดสเปซร่วมกับโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (Solid Phase Micro-extraction, SPME) ซึ่งประกอบด้วยแท่งไฟเบอร์ขนาดเล็กและส่วนปลายเคลือบด้วยสารโพลีเมอร์ ที่สามารถดูดซับกับสารที่เราต้องการตรวจวิเคราะห์เพื่อทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารนั้นมากขึ้น โดยปริมาณที่ถูกดูดซับนั้นจะมีความสัมพันธ์โดยตรง กับความเข้มข้นของสาร เมื่อนำแท่งไฟเบอร์นี้เข้าเครื่อง GC หรือ HPLC ก็จะสามารถวิเคราะห์สารต่างๆ ได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยสารทำละลาย (solvent extraction) และให้ผลดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเคมีที่ใช้กันมา⁷⁻¹⁰

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการ เฮดสเปซโซลิดเฟส ไมโครเอกซ์แทรกชัน (HS-SPME) เพื่อตรวจวิเคราะห์เบนซีน โทลูอิน เอทิลเบนซีน ไซลีน และ เอ็มทีบีอี ระดับความเข้มข้นต่ำในเลือดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการรับสัมผัสของสารเหล่านี้ในการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สารเคมี

สารมาตรฐาน BTEX, MTBE และ Alpha, Alpha, Alpha-Trifluorotoluene (internal standard) ความเข้มข้นอย่างละ 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล ของบริษัท Supelco, เมทานอล (Methanol, AR grade) และ โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, AR grade) ของบริษัท Merck

เครื่องมือ

SPME ชนิด Polydimethylsiloxane (PDMS) ขนาด 100 ไมโครเมตร และ fiber holder ของบริษัท Supelco, Gas chromatograph รุ่น Chrompack Packard Model 438 A ตัวตรวจวัดชนิดเฟรม ไอออนไนเซชัน (Flam Ionization Detector, FID) คอลัมน์ชนิด CP-SIL 5 CB Low Bleed/MS ขนาด 25 เมตร x 0.32 มิลลิเมตร x 0.52 ไมโครเมตร ของบริษัท Supelco, Gas chromatograph รุ่น Varian CP 3800 ตัวตรวจวัดชนิดเฟรม ไอออนไนเซชัน

(Flam Ionization Detector , FID) คอลัมน์ชนิด CP-SIL 5 CB ขนาด 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร ของบริษัท Supelco

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ศึกษา

ใช้เลือดอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ที่ไม่ได้ทำงานสัมผัสสาร VOCs เจาะเลือดด้วยระบบสุญญากาศในหลอดแก้ว ปริมาตร 3 มิลลิตร ที่ใส่สารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บที่ -40°C

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับสาร (HS-SPME)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการดูดซับสาร

นำหลอดเลือด 3 มิลลิตร เติมสารมาตรฐาน BTEX และ MTBE ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร พร้อม trifluorotoluene 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปควบคุมที่อุณหภูมิ 30°C , 40°C , 50°C และ 60°C โดยใช้ SPME fiber ดูดซับไอสารเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟี (GC) ใช้เวลา ประมาณ 20 นาที คำนวณค่า relative intensity จาก chromatographic signal (relative intensity = substance peak area / internal standard peak area)

เวลาที่เหมาะสมในการดูดซับสาร

นำหลอดเลือด 3 มิลลิตร เติมสารมาตรฐาน BTEX และ MTBE ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร พร้อม trifluorotoluene ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C เป็นเวลา 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที โดยใช้ SPME fiber ดูดซับไอสาร แล้วฉีดเข้าเครื่อง GC เพื่อแยกสารต่างๆ คำนวณค่า relative intensity จาก chromatographic signal

ปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มการกลายเป็นไอของสาร (salting out)

เติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์ในหลอดเลือด 3 มิลลิตร ที่เติมสารมาตรฐาน BTEX และ MTBE ปริมาณ 0.05, 0.1, 0.3 และ 1.0 กรัม ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปควบคุมอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ SPME fiber ดูดซับไอสาร แล้วฉีดเข้าเครื่อง GC เพื่อแยกสารต่างๆ คำนวณค่า relative intensity จาก chromatographic signal

สภาวะของเครื่อง GC

เครื่องแกสโครมาโตกราฟีรุ่น Chrompack Packard Model 438 A ตั้งอุณหภูมิหัวฉีดสาร 200°C อุณหภูมิ หัววัด FID 200°C อุณหภูมิตู้อบเริ่มที่ 50°C นาน 5 นาที เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 5°C ต่อนาที จนถึง 180°C และคงไว้ นาน 10 นาที คอลัมน์ที่ใช้คือ CP-SIL 5 CB Low Bleed/ MS ฉีดสารแบบ Split ด้วยสัดส่วน 20 : 1

การทำกราฟมาตรฐาน

นำหลอดเลือดที่เจาะได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากัน แล้วดูด 0.5 มิลลิตร ลงในขวดแก้ว ขนาด 2 มิลลิตร เติมสารมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัม/ลิตร และ trifluorotoluene 2,500 นาโนกรัม/ลิตร และเติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0.2 กรัม แล้วนำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C โดยใช้เวลา 20 นาที แล้ว ใช้ SPME fiber ดูดไอสารแบบอัตโนมัติ ในเวลา 5 นาที พร้อมทั้งเขย่าขวด เพื่อนำไปวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง GC โดยใช้เวลาประมาณ 40 นาที

การวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE

นำขวดหรือหลอดตัวอย่างเลือดที่เตรียมได้ไปควบคุมอุณหภูมิในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ SPME fiber ดูดซับ ไอระเหยของสาร (gas phase) และฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ รุ่น Varian CP 3800 อุณหภูมิหัวฉีดสาร 220°ซ อุณหภูมิหัววัด FID 220°ซ อุณหภูมิตู้อบเริ่มที่ 50°ซ นาน 10 นาที เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 5°ซ ต่อนาที จนถึง 90°ซ แล้วเพิ่มอุณหภูมิต่อในอัตรา 30°ซ ต่อนาที จนถึง 250°ซ และคงไว้ นาน 17 นาที คอลัมน์ที่ใช้คือ CP-SIL 5 CB ฉีดสารแบบ Splitless

การหาค่าขีดต่ำสุดของการวัด (Limit of Detecton , LOD_(s))

จากกราฟมาตรฐานที่ทำซ้ำ 4 ครั้ง (แบบ inter-assay) นำมาหาค่า slope (m) และ intercept (b) จากสมการ $y = mx + b$ เมื่อ $y = \text{relative intensity}$ และ $x = \text{ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดในเลือด}$ หาค่า LOD จากสูตร¹²

$$\text{LOD}_{(s)} = (3 \text{ SE}_b + b) / m \text{ เมื่อ } \text{SE}_b = \text{standard error of the intercept}$$

การประเมินความถูกต้อง

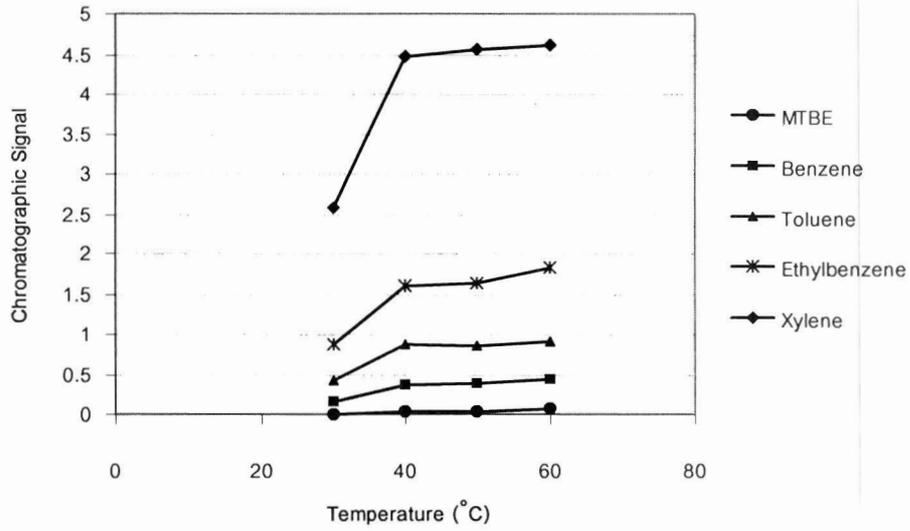
การประเมินค่าความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE ในเลือด โดยการเติมสาร BTEX และ MTBE ลงในเลือดควบคุม ที่ความเข้มข้น 100 และ 500 นาโนกรัม/ลิตร วิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 6 ครั้ง (แบบ inter-assay) หาค่าความถูกต้อง (accuracy) โดยคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ซึ่งเท่ากับร้อยละของปริมาณสารที่วัดได้ต่อปริมาณสารที่เติมลงไป และหาค่าการทำซ้ำ (repeatability) หรือความแม่นยำ (precision) ในการวิเคราะห์ โดยคำนวณร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of variation, %CV) ซึ่งเท่ากับร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่อค่าเฉลี่ย

ผล

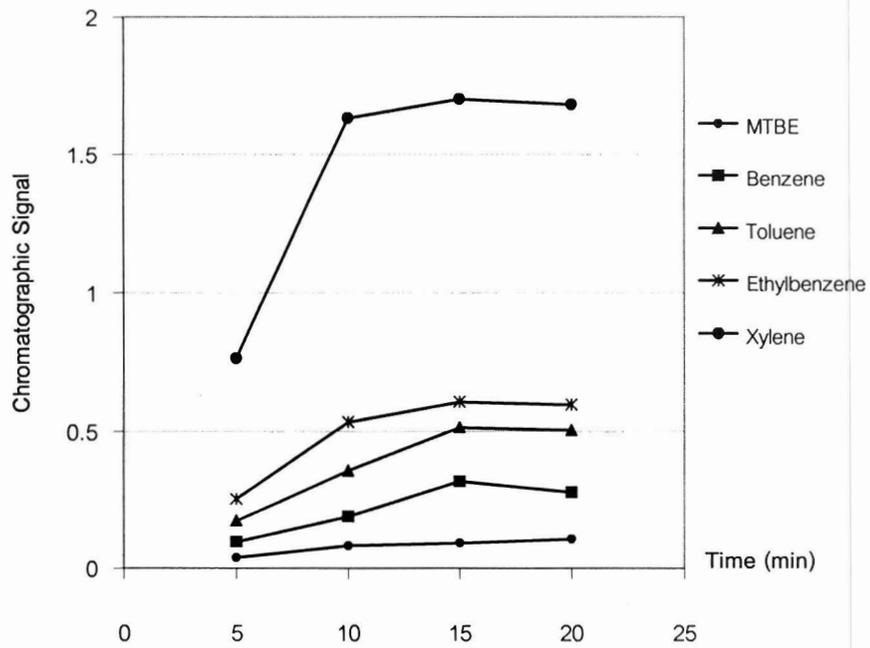
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับสาร (HS-SPME) เมื่อเปรียบเทียบการควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ, 40°ซ, 50°ซ และ 60°ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 40°ซ เหมาะสมที่สุดที่จะแยกสาร BTEX และ MTBE ในตัวอย่างเลือด โดยไม่ทำให้ส่วนประกอบต่างๆ ในเลือดถูกทำลายด้วยความร้อนและนอกจากนี้ เป็นอุณหภูมิที่ทำให้สารต่างๆ อยู่ในสภาพเป็น ไอมากที่สุด (รูปที่ 1)

การทดลองเมื่อเปรียบเทียบการควบคุมเวลา 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40°ซ ในการที่จะทำให้อ่างน้ำ BTEX และ MTBE ระเหยจากตัวอย่างเลือดอยู่ในรูปไอสาร (gas phase) คงที่ มากที่สุด ใช้เวลา 20 นาที ก่อนที่จะนำมาฉีดเข้าเครื่อง GC เพื่อหาปริมาณของสารเหล่านั้น (รูปที่ 2)

การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในหลอดเลือด 3 มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.05, 0.1, 0.3 และ 1.0 กรัม ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปควบคุมอุณหภูมิที่ 40°ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 1.0 กรัม เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการ salting out สารต่างๆ ในเลือด นอกจากนี้ การเขย่าขวดตัวอย่างระหว่างที่ให้ SPME fiber ดูดซับสาร ในสภาวะสมดุล (kinetic equilibration) เป็นเวลา 5 นาที สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ได้



รูปที่ 1 Equilibration kinetics ของ BTEX และ MTBE ในเลือดที่อุณหภูมิต่างๆกัน



รูปที่ 2 Equilibration kinetics ของ BTEX และ MTBE ในเลือด ที่ 40 °ซ ในเวลาต่างๆกัน

การแยกสาร BTEX และ MTBE ด้วยเครื่อง GC-FID โดยเทคนิค HS-SPME นี้ สามารถแยกสารดังกล่าวออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยมีค่า Retention Time (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า Retention Time (RT) ในการวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE

สารมาตรฐาน	Retention Time (นาที)
MTBE	2.874
Benzene	3.621
α, α -Trifluorotoluene	4.299
Toluene	5.632
Ethylbenzene	9.730
m-, p-Xylene	10.338
o-Xylene	11.583

ผลการทำกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 นาโนกรัม/ลิตร และนำมาคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวัด ($LOD_{(s)}$) และ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) พบว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวัดของเบนซิน, โทลูอีน, เอทิลเบนซิน, เอ็ม-,พี-ไซลีน, โอ-ไซลีน และ เอ็มทีบีอี มีค่า 23.5, 40.6, 48.3, 68.1, 77.6 และ 39.1 นาโนกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าขีดต่ำสุดในการตรวจวัด ($LODs$) และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของ BTEX และ MTBE

สารมาตรฐาน	Limit of Detection ($LODs$) (นาโนกรัม/ลิตร)	Coefficient of correlation (r)
MTBE	39.1	0.9988
Benzene	23.5	0.9995
Toluene	40.6	0.9990
Ethylbenzene	48.3	0.9983
m-,p-Xylene	68.1	0.9993
o-Xylene	77.6	0.9970

ผลการประเมินความถูกต้อง (accuracy) ในการวิเคราะห์พบว่า ในระดับความเข้มข้นที่ 100 นาโนกรัม/ลิตร ร้อยละการคืนกลับ (% recovery) อยู่ระหว่าง 101.8 ถึง 111.6 และที่ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/ลิตร ร้อยละการคืนกลับ (% recovery) อยู่ระหว่าง 98.0 ถึง 101.6 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าความถูกต้องในการวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE

สารมาตรฐาน	% recovery	
	ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ลิตร	ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/ลิตร
MTBE	107.7	101.4
Benzene	108.1	103.0
Toluene	111.4	99.7
Ethylbenzene	98.0	97.9
m-, p-Xylene	112.1	98.9
o-Xylene	102.9	98.1
Mean \pm S.D.	106.7 \pm 4.9 (101.8-111.6)	99.8 \pm 1.8 (98.0-101.6)

ค่า การทำซ้ำ (repeatability) ในการวิเคราะห์ ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (precision) ในการวิเคราะห์ พบว่า ในระดับความเข้มข้นที่ 100 นาโนกรัม/ลิตร ร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) อยู่ระหว่าง 5.7 ถึง 10.2 และที่ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/ลิตร ร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) อยู่ระหว่าง 5.1 ถึง 8.4 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE

สารมาตรฐาน	% coefficient of variation (%CV)	
	ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ลิตร	ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม/ลิตร
MTBE	9.4	8.9
Benzene	4.0	4.8
Toluene	9.3	7.2
Ethylbenzene	9.2	7.2
m-, p-Xylene	10.0	4.4
o-Xylene	5.8	8.0
Mean \pm S.D.	8.0 \pm 2.2 (5.7-10.2)	6.7 \pm 1.6 (5.1-8.4)

วิจารณ์

การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการหาปริมาณเบนซิน โทลูอิน เอทิลเบนซิน ไซลีน (BTEX) และเอ็มทีบีอี (MTBE) ในเลือด ในระดับความเข้มข้นเป็นนาโนกรัมต่อลิตร พบว่ามีความจำเป็นในการหาภาวะที่เหมาะสม ของ การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างเลือดจะมีคุณสมบัติแตกต่างจากของเหลวชนิดอื่น เลือดมีความหนืด เพราะมีสารต่างๆ ในเลือดมากมาย การใช้ความร้อน 40°C ในเวลาที่เหมาะสม 20 นาที จะทำให้ สาร BTEX และ MTBE ระเหยมาอยู่ในรูปของไอ และเกิดสภาวะสมดุล (kinetic equilibration) ระหว่าง gas phase

และ SPME fiber และ GC โดยสารถูกดูดซับ (adsorbed) ด้วย SPME fiber จนถึงจุดสมดุล หลังจากนั้นเมื่อฉีด SPME fiber เข้า GC injection port จะเกิดการคายสาร (desorbed) จาก fiber เมื่อได้รับความร้อนสูงขึ้น เข้าสู่คอลัมน์ของ GC¹¹ (three phase system) เวลาที่ใช้ในการทำให้ BTEX และ MTBE ในเลือดมาอยู่ในรูปของไอมากที่สุดจะใช้เวลามากกว่า การหาปริมาณ BTEX และ MTBE ในน้ำหรือปัสสาวะ¹² นอกจากนี้การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH และ เป็นการเพิ่ม ionic strength ของสารละลาย ทำให้ลดการละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเลือดให้กลับไปอยู่ในรูปของไอทำให้สามารถสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเลือดได้ดีขึ้น และทำให้ relative intensity สูงขึ้น และจากการทดลองพบว่า ปริมาณเกลือ 1 กรัม เหมาะสมในการเติมในตัวอย่างเลือด 3 มิลลิลิตร ดังนั้นการวิเคราะห์เลือดจากสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จึงใช้เกลือ 0.2 กรัม จากการทดลองยังพบอีกว่าถ้าเติมเกลือปริมาณต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 °ซ และ 60°ซ จะมีผลทำให้ relative intensity ลดลง เนื่องจาก SPME fiber จะเกิดการคายสารที่อุณหภูมิสูงขึ้น นอกจากนี้การเขย่าขวดสารตัวอย่างระหว่างควบคุมอุณหภูมิทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ในรูปของไอมากขึ้น ดังนั้นเมื่อเกิดสภาวะสมดุลของไอสารกับ SPME fiber จะทำให้เพิ่มความเข้มข้นของสารในการดูดซับด้วย SPME fiber มีผลทำให้เพิ่ม chromatographic signal ด้วย

การวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE ด้วยการสกัดแบบ SPME แล้ววิเคราะห์ด้วย GC โดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัด (solvent extraction) นั้น ลดขั้นตอนในการวิเคราะห์ และทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความเข้มข้นขึ้นภายในเวลาเร็ว¹³ และสามารถพัฒนาให้วิเคราะห์ได้ในช่วงความเข้มข้นต่ำ ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection) ของสาร BTEX และ MTBE อยู่ในช่วง 23.4-77.6 นาโนกรัมต่อลิตร ความถูกต้องในการวิเคราะห์มีค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) มากกว่าร้อยละ 98 และค่าความแม่นยำ (% CV) อยู่ระหว่าง 4.0 ถึง 10.0 ไซลินเป็นสารที่มีขีดจำกัดสูงสุดในการวัดสูงกว่าสารตัวอื่นๆ เช่นเดียวกับผลการศึกษาในต่างประเทศ¹⁴ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขนาด โมเลกุลที่ใหญ่กว่าสารอื่นๆทำให้คุณสมบัติการระเหยและการแยกช้ากว่าสารตัวอื่น

ข้อควรระวังในการวิเคราะห์สาร BTEX และ MTBE ด้วย GC โดยเทคนิค HS-SPME มีดังนี้

1. เลือกเส้นใยของ SPME ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวัด เช่น พวกไฮโดรคาร์บอน นิยมใช้ PDMS (Polydimethylsiloxane) โดยยึดหลัก สารไม่มีขั้วละลายได้ดีในสาร ไม่มีขั้ว
2. ต้องปรับเครื่อง GC ให้เหมาะสมกับการใช้งานเพื่อวิเคราะห์ รวมถึงการเลือกคอลัมน์ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์
3. จะต้องหาภาวะที่เหมาะสม (optimum condition) ในการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เพราะตัวอย่างแต่ละชนิดมีความหนืด และตัวรบกวน หรือสารต่างๆที่ผสมอยู่แตกต่างกัน
4. ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างต้องทำอย่างระมัดระวัง และรวดเร็ว เพราะสาร BTEX และ MTBE เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่ายในอุณหภูมิห้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น MTBE และ เบนซิน ดังนั้น ต้องพยายามลดการรั่วไหล (leak) ของสารเหล่านี้จากตัวอย่างให้มากที่สุด
5. การเตรียม SPME และ GC จะต้องทำให้ไม่มีสารปนเปื้อนติดอยู่ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลดลง หรือทำให้ค่าผิดพลาด นอกจากนี้อายุการใช้งานของ SPME และ คอลัมน์จะลดลง

โดยสรุป การหาปริมาณเบนซีน โทลูอิน เอทิลเบนซีน ไซลีน และเอ็มทีบีอี ในเลือดโดยใช้เทคนิคเฮคตเพช โซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน สามารถทำได้ในระดับต่ำถึงหนึ่งในล้านล้านส่วน (ppb) ซึ่งจำเป็นประโยชน์สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาการรับสัมผัสสารของกลุ่มคนซึ่งเสี่ยงต่อการรับสัมผัสสารเหล่านี้จากสิ่งแวดล้อม¹⁵⁻¹⁷ และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาเชื่อมโยงถึงผลกระทบต่อสุขภาพได้¹⁸ นอกจากนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารอื่นๆ ในสารตัวอย่าง หรือใน matrix ต่างๆ เช่น อาหาร ยา ปัสสาวะ หรือน้ำ โดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และลดขั้นตอนการสกัดสาร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ส่วนส่งเสริมและพัฒนาวิจัย สำนักบริหารวิชาการ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ศาสตราจารย์นายแพทย์ จิตร สิทธิอมร ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภิญชิตรา เกตุแก้ว และนางสาว วรรณภา คุ่มจินดา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการวิเคราะห์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. กองควบคุมและจัดการคุณภาพสิ่งแวดล้อม สำนักปลัดกรุงเทพมหานคร. 2544. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อมของกรุงเทพมหานคร 2544. กรุงเทพฯ; หน้า 21-27.
2. กาญจนศักดิ์ ผลบูรณ์. 2543. การจัดการสิ่งแวดล้อมในระบบสุขภาพ ชุดสุขภาพคนไทย ปี พ.ศ.2543. สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข; 78 หน้า.
3. ดุษฎี หมั่นห่อ. 2542. การวัดความเข้มข้นของโทลูอิน และไซลีนในอุ้งฟันซอมสัตว์ฟันแทะ. วิทยานิพนธ์ ประจำปีการศึกษา 2542 ภาควิชาสหสาขา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
4. สมเกียรติ สิริรัตนพฤกษ์. 2544. เอกสารประกอบการอบรมเทคโนโลยีควบคุม และป้องกันมลพิษจากสถานบริการน้ำมันเชื้อเพลิง. สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 16 -18 กรกฎาคม, โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช พัทยา; หน้า 1-9.
5. Yoon BI., Li AX., Kitada K., Kawasaki Y., Igarashi K., Kodama Y., *et al.* 2003. Mechanism of benzene induced hematotoxicity and leukomogenicity : DNA microarray analysis using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect* 111(11) : 1411 – 1420.
6. Yang CY., Wang JD., Chan CC., Chen PC., Huang JS. And Cheng MF. 1997. Respiratory and irritant health effects of a population living a petrochemical – polluted area in Taiwan. *Environ Res* 74 : 145 – 149.
7. ศศิธร แทนทอง, สุรพล นวการกิจกุล, นุชนารถ จงเสขา, ปรัชญา คงทวีเลิศ. 2545.เทคนิคการสกัดแบบโซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน. ว กรมวิทย์ พ. 44 (4) : 279 – 288.
8. Supelco. 2003. A practical guide to quantitation with solid phase microextraction : [www. Supelco – reporter eu.com](http://www.Supelco-reporter.eu.com).

9. Ulrich S. 2000. Solid phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr. A* 902 : 167 – 194.
10. Farajzadeh M. and Mardani A. 2001. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes by headspace spectrophotometry with an atomic absorption apparatus. *Analy Sci* 17 : 1059 – 1062.
11. Zhang Z. and Pawliszyn J. 1996. Sampling volatile organic compounds using a modified solid phase microextraction device. *J High Anal. Chem* 65 : 1843.
12. Fustinoni S., Giampiccolo R., Pulvirenti S, Buratti M. and Colombi A. 1999. Headspace solid phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in urine. *J Chromatogr. B* 723 : 105 – 115.
13. Supelco.1999. Solid phase microextraction/capillary GC analysis of drugs, alcohols and organic solvents in biological fluids. Bulletin 901A, Sigma Aldrich Co.
14. Perbellini L., Pasini F., Romani S., Princivalle A. and Brugnone F. 2002. Analysis of benzene , toluene , ethylbenzene and m-xylene in biological samples from the general population. *J Chromatogr B* 778: 199 – 210.
15. Ashley DL., Bonin MA., Cardinali FL., McCraw JM., Holler JS., Needham LL., *et al.* 1992. Determining volatile organic compounds in human blood from large sample population by us purge and trap gas chromatography-massspectrometry. *Anal Chem* 64 : 1021 – 1029.
16. Ashley DL., Bonin MA., Cardinali., McCraw JM. And Wooten JV. 1996. Measurement of volatile organic compounds in human blood. *Environ Health Perspect* 104(supp):871 – 877.
17. Backer IC., Egeland GM. And Ashley DL. 1997. Exposure to regular gasoline and ethanol oxyfuel during refueling in Alaska. *Environ Health Perspect* 105 :85 – 855.
18. Isabella R., Matiana R. and Fernando M. 1999. Environmental exposure to volatile organic compounds among workers in Mexico city as assessed by personal monitors and blood concentrations. *Environ Health Perspect* 107 (7) : 511 – 515.