

## การประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดแบบสองขั้นตอนเพื่อหาปริมาณกรดแลคติกในน้ำเสีย

### Application of 2-step extraction method for determination of lactic acid in wastewater

ฐาปนี พฤกษ์ตระกูล<sup>1</sup>

ปัทมาพร ภูพระอินทร์<sup>2</sup>

พิมพิใจ ใจเย็น<sup>3</sup>

ประพิณ วิไลรัตน์<sup>4</sup>

รัตติกาล จันทิวาสัน<sup>5</sup>

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและผลของการประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดแบบสองขั้นตอนในการหากรดแลคติกโดยใช้ HPLC การสกัดแบบสองขั้นตอน ประกอบด้วย 1. การสกัดด้วยตัวทำละลายที่บีเอ็มอี และ 2. การสกัดกรดด้วยสารละลายเบส โดยได้ศึกษาสภาวะของการทดลองในการสกัด คือ การเติมเกลือและจำนวนครั้งในการสกัดขั้นตอนของการสกัดด้วยที่บีเอ็มอี กรดแลคติกจะถูกตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC การทดสอบการนำไปใช้ได้ของวิธีการสกัด พบว่า ประสิทธิภาพการสกัด เท่ากับ  $87 \pm 1\%$  โดยความแม่นยำในการสกัดซ้ำ ค่าความจาก %RSD มีค่าต่ำกว่า  $1.15\%$  จะเห็นว่าวิธีการสกัดที่ได้พัฒนามีความแม่นยำและถูกต้อง โดยได้ศึกษาร้อยละของการได้กลับคืน (%recovery) เมื่อเติมสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 65 และ 128 มิลลิโมลาร์ พบว่า ร้อยละของการได้กลับคืน เท่ากับ  $96 \pm 2\%$  และ  $117 \pm 2\%$  จากนั้นจึงได้นำการสกัดแบบสองขั้นตอนไปประยุกต์ใช้กับน้ำเสียที่เก็บไว้ระยะเวลาที่ต่างกัน คือ 1 วัน และ 5 เดือน พบปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ  $66.9 \pm 1.6$  และ  $29.3 \pm 3.1$  มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** กรดแลคติก การสกัดแบบสองขั้นตอน น้ำเสีย ไฮเพอร์ฟอแมนซิลิควิดโครมาโทกราฟี

#### Abstract

This research to study an optimal condition and results its of application of 2-step the extraction method for determination of lactic acid in wastewater using HPLC-UV technique. The 2-step extraction method was developed; 1. TBME extraction (solvent extraction) and 2. Acid-base extraction (liquid-liquid back extraction). Investigation of extraction conditions of addition of salt (salting out effect) and numbers of multiple extractions were carried out for TBME extraction. Measurement of lactic acid in the extracts was performed by a HPLC-UV method. The performance of extraction method was validated by considering of extraction efficiency, precision and accuracy.

<sup>1-2</sup> นักศึกษา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและศูนย์ความเป็นความเลิศด้านวัฒนธรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กรุงเทพมหานคร E-mail: thapanee.pruek@gmail.com

<sup>3</sup> ศาสตราจารย์ ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์และหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน (CPSF) มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร E-mail: pimchai.cha@mahidol.ac.th

<sup>4</sup> รองศาสตราจารย์ ที่ปรึกษาผู้อำนวยการ ศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร E-mail: prapin.wil@mahidol.ac.th

<sup>5</sup> อาจารย์ ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และศูนย์ความเป็นความเลิศด้านวัฒนธรรมทางเคมี (PERCH-CIC) มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร E-mail: rattikan.cha@mahidol.ac.th

The efficiency of extraction was calculated based on ratio of peak area of extracted lactic acid to peak area of non-extracted (prepared content), it was  $87 \pm 1\%$  ( $n=3$ ). Repeatability of the extraction was 1.15% (%RSD,  $n=3$ ) and the accuracy was reasonably acceptable. The recovery study was investigated by determination of percentage of peak area ratio of lactic acid and internal standard before and after extraction. The recoveries were  $96 \pm 2\%$  and  $117 \pm 2\%$ , when spiking of lactic concentrations of 65 mM and 128 mM to the sample. The 2-step of extraction method was applied to determination of lactic acid in wastewater sample. Lactic acids contents were found to be  $66.9 \pm 1.6$  and  $29.3 \pm 3.1$  mM for the collected sample and kept for 1 day and 5 months.

**Keywords:** Lactic acid, wastewater, 2-step extraction method, HPLC

## บทนำ

กรดแลคติกเป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีหรือเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดผ่านกระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลัส (แลคติกแอซิดแบคทีเรีย) ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน กรดแลคติกเป็นสารตั้งต้นที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก โดยได้มีการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมหลายประเภท อาทิเช่น อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก การผลิตผ้าคุณภาพสูง และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (R. Mazzoli, F. Bosco, I. Mizrahi, E.A. Bayer and E. Pessione, 2014) (Y. Wang, Y. Tashiro and K. Sonomoto, 2015)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยทั่วไปจะนิยมใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิคควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) (S. De Baere, V. Eeckhaut, M. Steppe, et al., 2013) (A.R.-B. de Quirós, M.A. Lage-Yusty, J. López-Hernández, 2009) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ โดยการแยกกรดแลคติกด้วยเทคนิค HPLC ใช้ stationary phase ที่ไม่มีขั้ว เรียกว่า reverse phase เช่น C-18 และใช้ mobile phase มีขั้ว เช่น น้ำหรือบัฟเฟอร์ โดยใช้หลักการของแยกสารจากออกจากกันด้วยการกระจายตัว (distribution) ของสารระหว่างอยู่ที่ stationary phase และ mobile phase หากสารเกิด hydrophobic interaction กับ stationary phase ได้ดี จะทำให้สารเกิดการ retain ได้นานและเคลื่อนที่ออกมาช้า ในขณะที่เดียวกันสารที่เกิด hydrophobic interaction กับ stationary phase ได้น้อยจะเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วกว่า

ในการวิเคราะห์กรดแลคติกในน้ำเสียจะต้องมีการเตรียมตัวอย่าง (การสกัด) เนื่องจากในน้ำเสียอาจมีส่วนประกอบของสารที่อาจส่งผลการรบกวนต่อการวิเคราะห์กรดแลคติก ดังนั้น การสกัดก่อนการวิเคราะห์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เทคนิคอื่นที่ใช้ในการสกัดเพื่อแยกกรดอินทรีย์รวมทั้งกรดแลคติกได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ตัวดูดซับของแข็ง (W. Horwitz and A.o.O.A. Chemists, 2000) การกลั่น (J.B. Zijlstra, J. Beukema, B.G. Wolthers, et al., 1977) และการสกัดด้วยซอกเลท (J. McNichol, K. MacDougall, J. Melanson, et al., 2012) เป็นต้น โดยวิธีในการเตรียมตัวอย่างน้ำเสียเพื่อแยกกรดแลคติกซึ่งเป็นสารกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิกนิยมใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่ดี สำหรับการสกัดกรดแลคติกนั้น มีสองขั้นตอนที่ต่อเนื่องกัน คือ 1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย 2. การสกัดกรดด้วยเบส โดยจะเห็นว่าขั้นตอนที่ 1 มีความสำคัญเป็นอย่างมาก หากสกัดกรดแลคติกออกมาได้มากจะทำให้การสกัดกรดแลคติกในขั้นตอนที่ 2 ถูกสกัดออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเลือกตัวทำละลายในขั้นตอนที่ 1 พบว่าได้มีการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดกรดแลคติกด้วยตัวทำละลาย สำหรับวิธีการมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย โดยสมาคมสาธารณสุขแห่งอเมริกา (American Public Health Association หรือ APHA) ได้ใช้ตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ เพื่อ

สกัดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย (E.W. Rice, L. Bridgewater, A., 2012) ในปี 2011 Anna Banel และคณะ ได้ทำการ การศึกษาการสกัดกรดอินทรีย์ด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยนำตัวทำละลายชนิดอีเทอร์ 2 ชนิด คือ เทอร์เชียรี บิวทิลเมทิลอีเทอร์ (*tert*-butylmethylether) หรือ ทีบีเอ็มอี และไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) มาใช้เพื่อ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด (extraction efficiency) พบว่า ทีบีเอ็มอีให้ประสิทธิภาพการสกัดดีกว่า เนื่องจาก ทีบีเอ็มอีมีขั้วใกล้เคียงกับกรดอินทรีย์มากกว่าไดเอทิลอีเทอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าไดเอทิลอีเทอร์เป็นสารที่อันตรายไม่ เหมาะแก่การนำมาใช้สกัดอีกด้วย (A. Banel and B. Zygmunt, 2011) อีกรงานวิจัยหนึ่ง Nontando T. Mkhize และ คณะ ได้ทำการศึกษาการสกัดน้ำเสียเพื่อหาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยศึกษา เปรียบเทียบตัวทำละลายระหว่างทีบีเอ็มอีและไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) พบว่า ทีบีเอ็มอีให้ประสิทธิภาพ การสกัดสูงกว่าไดคลอโรมีเทนถึง 5 เท่า (N.T. Mkhize, et al., 2014) ดังนั้น ทีบีเอ็มอีจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด สำหรับขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการสกัดกรดด้วยเบสจะนิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการสกัดกรดอินทรีย์ ออกมาจากชั้นของตัวทำละลาย (S. De Baere, et al., 2013) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการเตรียมตัวอย่างน้ำ เสียด้วยการสกัดแบบสองขั้นตอนแบบต่อเนื่องคือ 1. การสกัดด้วยตัวทำละลายทีบีเอ็มอี 2. การสกัดกรดด้วยเบสโดยใช้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้ววิเคราะห์ปริมาณของกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียด้วยเทคนิค HPLC

#### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการสกัดกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียด้วยวิธีการสกัดแบบสองขั้นตอน คือ 1. การสกัดด้วยที บีเอ็มอี (โดยได้ศึกษาการเติมเกลือและจำนวนครั้งของการสกัด) 2. การสกัดด้วยตัวทำละลายเบส
2. นำวิธีการสกัดจากข้อที่ 1 ไปใช้ในการทดลองสกัดกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยจะศึกษาถึงผลกระทบของระยะเวลาหลังจากการเก็บตัวอย่าง ในระยะสั้นและระยะยาว

#### เนื้อหาที่เกี่ยวข้อง

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียด้วยเทคนิค HPLC จำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่าง ก่อนที่จะทำการตรวจวัด เนื่องจากน้ำเสียอาจมีสารรบกวนการวิเคราะห์ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัดแบบสอง ขั้นตอนเพื่อใช้ในการสกัดกรดแลคติกในน้ำเสีย โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับกรดแลคติกมาสกัดและใช้ค่าคงที่ การแตกตัว ( $pK_a$ ) ของกรดแลคติกมาเกี่ยวข้อง การสกัดแบบสองขั้นตอนประกอบด้วย 1. การสกัดด้วยทีบีเอ็มอี 2. การสกัดกรดด้วยเบส

1. การสกัดด้วยทีบีเอ็มอี ในขั้นตอนนี้กรดแลคติกที่อยู่ในชั้นน้ำจะถูกปรับ pH ให้เป็น 2 เพื่อให้ pH ของ สารละลายต่ำกว่า  $pK_a$  โดยกรดแลคติกจะไม่เกิดการแตกตัวและละลายในชั้นทีบีเอ็มอีได้ดี ดังนั้น กรดแลคติกจะ กระจายตัวเข้าสู่ชั้นทีบีเอ็มอี ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำการศึกษา การเติมเกลือและจำนวนครั้งของการสกัด

โดยทั่วไปการสกัดกรดอินทรีย์ด้วยตัวทำละลายนี้จะอธิบายได้ด้วยการกระจายตัวของกรดอินทรีย์ ซึ่งอยู่ใน เทอมของค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว  $K_d$  (distribution coefficient หรือ partition coefficient) โดย ค่า  $K_d$  หาได้ จาก อัตราส่วนของความสามารถของการละลายของสารที่สนใจในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความสามารถของการ ละลายของสารที่สนใจในชั้นน้ำ จากอัตราส่วนดังกล่าว พบว่า กรณีที่ค่า  $K_d=1$  กรดอินทรีย์จะมีความสามารถในการ ละลายได้ดีทั้งในชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายเท่าๆกัน กรณีที่ค่า  $K_d>1$  กรดอินทรีย์จะสามารถละลายในชั้นตัวทำละลาย อินทรีย์ได้ดีกว่าชั้นน้ำ และกรณีที่ค่า  $K_d<1$  กรดอินทรีย์จะละลายได้ในชั้นน้ำดีกว่าชั้นตัวทำละลาย โดยค่า  $K_d$  ที่ได้นี้ สามารถนำไปคำนวณหาจำนวนครั้งที่ใช้สกัดเพื่อให้ได้สารมากที่สุดได้ นอกจากนี้หากต้องการให้ประสิทธิภาพในการ สกัดกรดอินทรีย์ดีขึ้นสามารถทำได้โดยใช้การเติมเกลือ หรือที่เรียกว่า salting out effect ในขั้นตอนของการสกัดด้วย

ที่บีเอ็มอี เพราะเมื่อเติมเกลือที่อิ่มตัวลงในชั้นน้ำ เกลือจะแตกตัวเป็นไอออนจนชั้นน้ำเกิดการอิ่มตัว และทำให้กรดอินทรีย์เกิดการกระจายตัวไปอยู่ในชั้นของตัวทำละลายได้ดีขึ้น

การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด โดยการเพิ่มจำนวนครั้งของการสกัดด้วยตัวทำละลาย อาศัยหลักการกระจายตัวของสาร พบว่าการดอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่า  $K_D$  ซึ่งเป็นค่าคงที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาค่า  $K_D$  ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการละลายของกรดอินทรีย์ในชั้นตัวทำละลายและชั้นน้ำ พบว่า ในการสกัดกรดอินทรีย์ในครั้งแรก อาจจะมียังมีการดอินทรีย์เหลืออยู่ในชั้นน้ำ ดังนั้น จะต้องทำการสกัดซ้ำเพื่อให้กรดอินทรีย์ถูกสกัดออกมาจนหมด

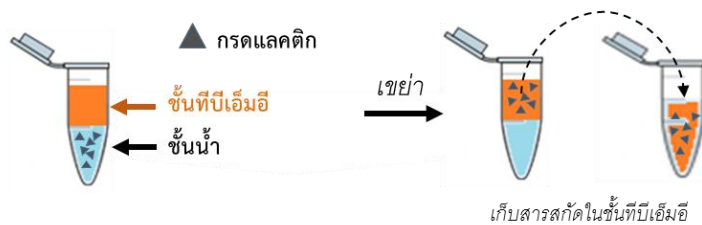
2. การสกัดกรดด้วยเบสโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดแลคติกที่อยู่ในชั้นที่บีเอ็มอีจะถูกสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งมี pH เป็น 6 และสูงกว่าค่า  $pK_a$  ของแลคติก ทำให้กรดแลคติกเกิดการแตกตัวและกลายเป็นไอออนละลายอยู่ในชั้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์

### วิธีดำเนินการวิจัย

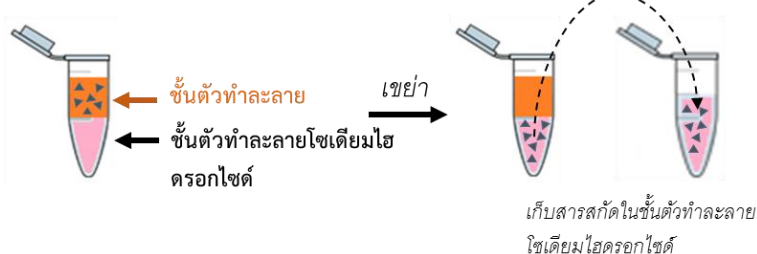
#### การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำเสียได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมแห่งหนึ่ง ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยทำการเก็บตัวอย่างด้วยอุปกรณ์ Ekman birge bottom sampler น้ำเสียที่เก็บได้จะบรรจุในขวดพลาสติกชนิดไฮเดนซิทีโพลีเอ-ทิลีน (HDPE) และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมตัวอย่างจะนำน้ำเสียมาชั่ง 3.0000 กรัม ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงและปรับ pH ให้เป็น 2 นำไปแยกส่วนระหว่างตะกอนชั้นล่างและส่วนของเหลวชั้นบนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 20 นาที แล้วจึงให้บีเปิดส่วนของเหลวที่แยกเหนือตะกอนมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงอีกหลอดหนึ่งและเติมกรดอะซิติกซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน 50 มิลลิโมลาร์ 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปสกัด ดังรูปที่ 1 ซึ่งผ่านการสกัดแบบสองขั้นตอน คือ 1. การสกัดด้วยตัวทำละลายที่บีเอ็มอี และ 2. การสกัดกรดแลคติกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

#### 1. การสกัดด้วยตัวทำละลายที่บีเอ็มอี (Solvent extraction)



#### 2. การสกัดกรดด้วยสารละลายเบส (Acid extraction)



รูปที่ 1 ภาพแสดงการสกัดกรดแลคติก

ประกอบด้วย 1. การสกัดด้วยตัวทำละลายที่บีเอ็มอี และ 2. การสกัดกรดด้วยสารละลายเบส

1. การสกัดด้วยตัวทำละลายที่บีเอ็มอี

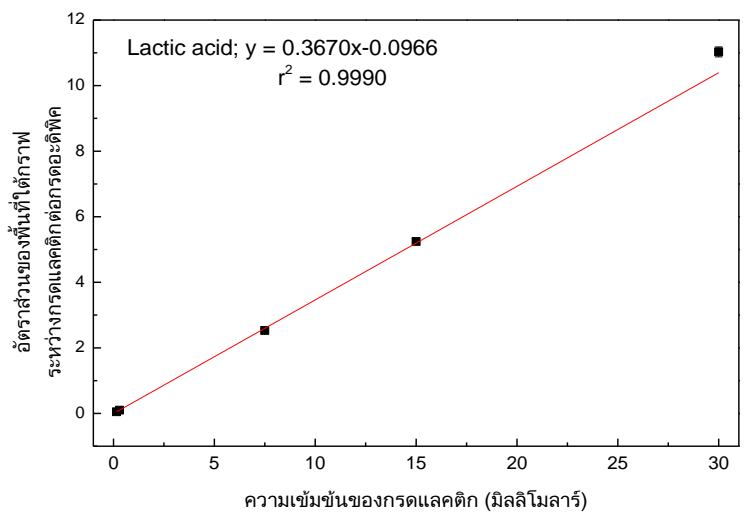
นำสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้นมาเติมตัวทำละลายที่บีเอ็มอี 4.00 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกระหว่างชั้นน้ำและที่บีเอ็มอี เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วเปิดชั้นที่บีเอ็มอีออกแล้วนำของเหลวส่วนล่าง (residual) ที่เหลือ นำมาสกัดซ้ำด้วยที่บีเอ็มอี ปริมาตร 2.00 และ 1.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายที่บีเอ็มอีที่ผ่านการสกัดมาเก็บรวมกันและนำไปสกัดด้วยเบสในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

2. การสกัดกรดด้วยสารละลายเบส

นำชั้นที่บีเอ็มอีที่ผ่านการสกัดจากข้อ 1 ปริมาตร 2.40 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 โมลาร์ 2.00 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกระหว่างชั้นน้ำและชั้นตัวทำละลายที่บีเอ็มอีแล้วเปิดชั้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 มิลลิลิตรและปรับพีเอชให้เท่ากับ 2 จากนั้นนำไปกรองและวิเคราะห์กรดแลคติกด้วย HPLC

การวิเคราะห์กรดแลคติกด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC รุ่น 2695 Alliance ของบริษัท Water (Massachusetts, US) โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) จากบริษัท GL science (Tokyo, Japan) โดยสภาวะการทดลองใช้กรดฟอสฟอริก 25 มิลลิโมลาร์ เป็น mobile phase ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ในระบบ gradient elution และตรวจวัดสัญญาณด้วยยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากสภาวะการทดลองดังกล่าว พบว่า กรดแลคติกมี retention time ที่เวลา 6.09 นาที และกรดอะซิติกซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายในมี retention time ที่เวลา 21.11 นาที ในการหาปริมาณกรดแลคติกใช้วิธีการทำกราฟมาตรฐานภายใน (internal standard calibration curve) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานภายในของกรดแลคติกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดแลคติก (แกน X) กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y)

เมื่อพิจารณากราฟมาตรฐานภายในของกรดแลคติกวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า มีค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี ( $r^2 > 0.9990$ ) ในช่วงความเข้มข้น 0.15-30 มิลลิโมลาร์ กราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์เชิงเส้น คือ  $y=0.3670x-0.0966$  ค่าความแม่นยำของอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (peak area ratio) และ retention time ในรูปของค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ในการทดลองซ้ำต่ำกว่า 0.95% และ 0.10% ตามลำดับ สำหรับเทคนิคดังกล่าวจะนำไปใช้แยกและวิเคราะห์กรดแลคติกต่อไป

### การศึกษาวิธีการสกัดแบบสองขั้นตอน

การศึกษาสภาวะของการสกัดของกรดแลคติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด มี 2 สภาวะ คือ 1. การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2. จำนวนครั้งในการสกัด ในขั้นตอนของการสกัดด้วยตัวทำละลายทีบีเอ็มอี เนื่องจากขั้นตอนการสกัดด้วยทีบีเอ็มอีสำคัญ หากสามารถสกัดกรดแลคติกได้มากในขั้นตอนนี้จะทำให้ในขั้นตอนที่ 2 คือ การสกัดกรดด้วยเบสมีประสิทธิภาพการสกัดใกล้เคียง 100% การศึกษาสภาวะของการสกัดทำได้โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแลคติก 60 มิลลิโมลาร์ ผ่านการสกัดแบบสองขั้นตอน นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อนำผลการทดลองไปคำนวณหาค่า “ประสิทธิภาพการสกัด” ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนร้อยละของอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟระหว่างกรดแลคติกและกรดอะซิติก (วัดได้หลังผ่านการสกัด) และ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟระหว่างกรดแลคติกและกรดอะซิติก (ทราบค่าก่อนสกัด) จากผลการทดลอง สภาวะที่ 1 การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0000 กรัม ลงในตัวอย่างจนขึ้นน้ำอิมัลชันและสกัดด้วยการสกัดแบบสองขั้นตอน พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดกรดแลคติกเพิ่มขึ้น 20% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเกลือก่อนการสกัด เมื่อพิจารณาสภาวะที่ 2 คือ จำนวนครั้งในการสกัด จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ทีบีเอ็มอีสกัดเป็นจำนวน 1 ครั้ง (7.00 มิลลิลิตร) ให้ประสิทธิภาพการสกัด เท่ากับ  $74 \pm 1\%$  ขณะที่การสกัดด้วยทีบีเอ็มอีจำนวน 3 ครั้ง (ครั้งที่ 1 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร ครั้งที่ 2 ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร และ ครั้งที่ 3 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร) ซึ่งให้ประสิทธิภาพการสกัด เท่ากับ  $87 \pm 1\%$  จากการศึกษาหากเปรียบเทียบจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดโดยใช้ปริมาตรของทีบีเอ็มอีเท่ากันคือ 7 มิลลิลิตร พบว่า การสกัดด้วยทีบีเอ็มอี 3 ครั้งให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีกว่า 1 ครั้ง 13% จากการศึกษาทั้งสองสภาวะพบว่า วิธีการสกัดนี้จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุดถึง  $87 \pm 1\%$  ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (80-120%) (L. Zuluaga-Idárraga, et al., 2014)

### การทดสอบการใช้ได้ของวิธีการสกัด (Method validation)

การทดสอบการนำไปใช้ได้ของวิธีการสกัดศึกษาได้จากความแม่นยำของการสกัด (precision) ความถูกต้องของการสกัด (accuracy) และร้อยละของการได้กลับคืน (%recovery) สำหรับการหาความแม่นยำและความถูกต้องในการสกัดโดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแลคติก 60 มิลลิโมลาร์ และคำนวณหาความแม่นยำในรูปแบบของค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยผลการทดลอง พบว่า วิธีการสกัดแบบสองขั้นตอน ให้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 1.15% และความถูกต้องของการสกัดหาได้จาก ค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ (relative error) โดยใช้ค่าที่สกัดได้และค่าที่แท้จริง ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า ความผิดพลาดสัมพัทธ์ ของการสกัดมีค่าน้อยกว่า -13% (ค่าที่ยอมรับได้ คือ -15%) (A. Gustavo González and M. Ángeles Herrador, 2007)

สำหรับร้อยละของการได้กลับคืน ซึ่งหาได้จากการเติมสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 65 และ 128 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างน้ำเสีย นำสารละลายดังกล่าวไปสกัดด้วยวิธีข้างต้น คำนวณหาร้อยละของการได้กลับคืนจากอัตราส่วนร้อยละของอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟระหว่างกรดแลคติกและกรดอะซิติก (วัดได้หลังการสกัด) และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกและกรดอะซิติก (ทราบความเข้มข้น) ผลการทดลองการเติมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 65 และ 128 มิลลิโมลาร์ ในตัวอย่างน้ำเสีย พบว่า ร้อยละของการได้กลับคืน เท่ากับ  $117 \pm 2$  และ  $96 \pm 6\%$  ตามลำดับ ดังนั้น จะเห็นว่าวิธีการสกัดดังกล่าวมีประสิทธิภาพดี (อยู่ในช่วง 80-120%) จึงจะนำไปใช้สกัดกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียต่อไป

### การประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดแบบสองขั้นตอนเพื่อหาปริมาณกรดแลคติกในน้ำเสีย วิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียโดยใช้วิธีการสกัดที่ได้พัฒนาขึ้น เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาหลังจากเก็บตัวอย่างโดยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ 1. ระยะสั้น (1 วัน) และ 2. ระยะยาว (5 เดือน) โดยพบว่าผลของการศึกษาระยะเวลาต่อปริมาณกรดแลคติกเป็นดังแสดงในตารางที่ 1



**ตารางที่ 1** แสดงปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างน้ำเสียด้วยการสกัดแบบสองขั้นตอนและหาปริมาณด้วย HPLC

ระยะเวลาหลังจากเก็บ	ปริมาณกรดแลคติก (มิลลิโมลาร์)
1 วัน	66.9±1.6
5 เดือน	29.3±3.1

จากตารางที่ 1 พบว่า ปริมาณของกรดแลคติกที่ตรวจวัดในตัวอย่างน้ำเสียหลังจากเก็บไว้ระยะเวลา 1 วัน เท่ากับ 66.9±1.6 มิลลิโมลาร์ และหลังจากเก็บไว้เป็นระยะเวลา 5 เดือน เท่ากับ 29.3±3.1 มิลลิโมลาร์ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าระยะเวลาที่มีผลต่อการหาปริมาณกรดแลคติก ดังนั้น ในการตรวจวัดปริมาณกรดแลคติกจะต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่นำตัวอย่างมาเก็บไว้ก่อนทำการวิเคราะห์ กล่าวคือ การเก็บตัวอย่างไว้นานอาจมีผลให้การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกไม่ถูกต้อง ดังเช่นในการรายงานของ Xiang Li และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาการลดลงของปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างของเสียที่มาจากอาหาร (food waste) โดยได้รายงานว่าเป็นผลมาจากการเปลี่ยนกรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิกด้วยแบคทีเรียบางชนิด (X. Li, et al., 2014)

### สรุปผลการวิจัย

จากศึกษาการสกัดกรดแลคติกในน้ำเสียด้วยวิธีการสกัดแบบสองขั้นตอน พบว่า ผลของการเติมเกลือและจำนวนครั้งของการสกัดในขั้นตอนของการสกัดด้วยทีบีเอ็มอี สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดได้และวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาสกัดกรดแลคติกตัวอย่างน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำไปทดสอบการใช้ได้ของวิธีการสกัดพบว่า วิธีนี้ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่มีประสิทธิภาพที่ยอมรับได้คือ 87±1% มีความแม่นยำและถูกต้อง นอกจากนี้ ข้อมูลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง (storage time) มีผลต่อปริมาณของกรดแลคติกที่วัดได้ในตัวอย่างน้ำเสีย

### อภิปรายและข้อเสนอแนะ

ในการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวอาจจะนำไปเพื่อพัฒนาให้เป็นระบบอัตโนมัติได้ เช่น การพัฒนาการระบบการไหล (Flow method) เพื่อใช้ในการสกัด โดยระบบการไหลนี้จะสามารถทำให้การสกัดเป็นระบบปิด (closed system) ซึ่งส่งผลทำให้การระเหยของตัวทำละลายที่ใช้สกัดลดลง อีกทั้งอาจลดระยะเวลาในการสกัด ทั้งนี้ระบบการไหลจะใช้ปริมาตรของตัวทำละลายลดลง (ปริมาตรที่ใช้ในระบบการไหล ~0.5 – 1.0 มิลลิลิตร)

### เอกสารอ้างอิง

- A. Banel, B. Zygmunt, (2011). Application of gas chromatography-mass spectrometry preceded by solvent extraction to determine volatile fatty acids in wastewater of municipal, animal farm and landfill origin. **Water Science and Technology**, 63: 590-597.
- A. Gustavo González, M. Ángeles Herrador, (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 26(3): 227-238.
- A.R.-B. de Quirós, M.A. Lage-Yusty, J. López-Hernández. (2009). HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase. **Talanta**, 78(2): 643-646.

- E.W. Rice, L. Bridgewater, A. American Public Health, A. American Water Works, F. Water Environment. (2012). **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington, D.C.: American Public Health Association.
- J.B. Zijlstra, J. Beukema, B.G. Wolthers, B.M. Byrne, A. Groen and J.D. Ankert. (1977, July 15). Pretreatment methods prior to gas chromatographic analysis of volatile fatty acids from faecal samples. **Clin Chim Acta**, 78(2): 243-250.
- J. McNichol, K. MacDougall, J. Melanson, P. McGinn. (2012). Suitability of Soxhlet Extraction to Quantify Microalgal Fatty Acids as Determined by Comparison with In Situ Transesterification. **Lipids**, 47(2): 195-207.
- L. Zuluaga-Idárraga, N. Yepes-Jiménez, C. López-Córdoba, S. Blair-Trujillo. (2014). Validation of a method for the simultaneous quantification of chloroquine, desethylchloroquine and primaquine in plasma by HPLC-DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 95: 200-206.
- N.T. Mkhize, T.A.M. Msagati, B.B. Mamba, M. Momba. (2014). Determination of volatile fatty acids in wastewater by solvent extraction and gas chromatography. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, 67-69: 86-92.
- R. Mazzoli, F. Bosco, I. Mizrahi, E.A. Bayer, E. Pessione. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. **Biotechnology Advances**, 32: 1216-1236.
- S. De Baere, V. Eeckhaut, M. Steppe, C. De Maesschalck, P. De Backer, F. Van Immerseel, S. Croubels. (2013). Development of a HPLC–UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 80: 107-115.
- W. Horwitz, A.o.O.A. Chemists. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC2000.
- X. Li, Y. Chen, S. Zhao, D. Wang, X. Zheng, J. Luo. (2014). Lactic acid accumulation from sludge and food waste to improve the yield of propionic acid-enriched VFA. **Biochemical Engineering Journal**, 84: 28-35.
- Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 119: 10-18.