

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Benzo(a)pyrene ในเนื้อสัตว์ปิ้งย่าง

จิตตภา สันต์ตรบ ทองสุข ปายะนันท์ และกนกพร อธิสุข

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Benzo(a)pyrene (BaP) เป็นสารประกอบในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์หรือการสลายทางเคมีของสารอินทรีย์จากความร้อน จัดเป็นสารพิษชนิด probable human carcinogen หากได้รับอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการปรุงอาหารโดยวิธีปิ้งย่างกับเปลวไฟโดยตรง อาจทำให้เกิดสารนี้ได้ จึงได้ทำการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยการย่อยสลายตัวอย่างด้วยด่าง (saponify) จากนั้นแยก BaP ออกจากตัวอย่างด้วยวิธี solid phase extraction และได้กำจัดสารเจือปนอื่นด้วย Sep-Pak ชนิด C₁₈ ตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วย HPLC-Fluorescence detector ได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) โดยใช้หมู่มู่งเป็นตัวแทนของอาหารปิ้งย่าง พบว่ามีค่า Limit of detection เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Limit of quantitation เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Linear working range) เท่ากับ 0.5 - 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.9893 และตลอดช่วง Linear working range มีความถูกต้องแสดงด้วย % Recovery เท่ากับ 88 - 95 มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) แสดงด้วยค่า % RSD เท่ากับ 4.8 - 15.4 จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของสหภาพยุโรปใน Commission Directive 2005/10/EC (4 February 2005) ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังอันตรายจากการได้รับสาร BaP จากการบริโภคอาหารปิ้งย่าง

บทนำ

เบนโซ(เอ)ไพรีน [benzo(a)pyrene; BaP] เป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีไซคลิก อะโรเมติก ไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีมากกว่า 100 ชนิด ประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป จัดเรียงเป็นเส้นตรง เป็นมุม หรือเป็นกลุ่ม เกิดจากการสันดาปที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete combustion) หรือการสลายทางเคมีของสารอินทรีย์โดยความร้อน (pyrolysis) อย่างไรก็ตาม เชื้อเพลิงจากถ่านหิน ไม้ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องทำให้เกิด aromatic compounds ได้ทั้งสิ้น โดยทั่วไป PAHs เป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำ ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะพบความเป็นพิษเรื้อรัง การได้รับอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบต่างๆ ของร่างกายได้

จากรายงานการทดลองเกี่ยวกับผลของสารกลุ่มนี้ ต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะของสัตว์ทดลอง ได้ข้อสรุปว่า สารกลุ่มนี้เป็น probable human carcinogen⁽¹⁾

สาร PAHs พบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อมและอาหารซึ่งเกิดจากกระบวนการแปรรูปและปรุงอาหาร เช่น การอบขนม การเคี่ยวน้ำตาลเป็นคาราเมล การคั่วกาแฟ การปรุงอาหารโดยการอบ ปิ้ง ย่าง ซึ่ง BaP เป็นสารที่ได้รับความสนใจมากที่สุด และใช้เป็น marker ของการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ในอาหาร Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) สรุปว่า สารนี้ก่อให้เกิดพิษในสัตว์ทดลองหลายระบบ เช่น ในหนู หากได้รับสารนี้ในขณะตั้งท้อง ตัวอ่อนจะมีลักษณะผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ไชสันหลัง

มีพิษต่อยีนส์ทางพันธุกรรม (genotoxic) และก่อมะเร็ง แต่ยังไม่มียาหรือสารที่เพียงพอว่า benzo(a)pyrene ก่อให้เกิดมะเร็งในคน⁽²⁾ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐาน (Official method) ที่ใช้วิเคราะห์การปนเปื้อนของ BaP ในอาหาร มีรายงานการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไว้หลายรูปแบบ ใช้การสกัด alkaline hydrolysis^(3, 4, 5), liquid-liquid extraction^(3, 5), Supercritical Fluid Extraction (SFE)⁽⁶⁾, Solid Phase Extraction (SPE)⁽⁷⁾ และ Gel Permeation Chromatography (GPC)⁽⁴⁾ ซึ่งสามารถหาชนิดและปริมาณได้โดยเทคนิค GC⁽⁸⁾, GC-MS^(4, 5) และ HPLC^(3, 6, 7, 8) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีโดยมีความมุ่งหมายต้องการวิธีวิเคราะห์ BaP ในอาหารปิ้งย่างที่มีวางขายอยู่ทั่วไป ซึ่งเป็นอาหารที่คนไทยนิยมบริโภค เนื่องจากหารับประทานได้ง่าย ประหยัดเวลา โดยวิธีดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับต่ำๆ ปราศจากสารรบกวน ซึ่งต้องเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนเกินไป และใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการแล้ว โดยการปรับปรุงวิธีการสกัดของ L. Rivera และคณะ⁽⁷⁾ แล้วใช้ SPE ชนิด C₁₈ ในการทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) โดยใช้หมู่มากเป็นตัวแทนของ matrix กลุ่มอาหารปิ้งย่าง ทำการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, limit of detection, limit of quantitation, linearity and working range, accuracy และ precision ตาม EURACHEM Guide 1998⁽⁹⁾ เมื่อวิธีที่ศึกษาและพัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและเหมาะสม จึงนำไปใช้วิเคราะห์ในอาหารปิ้งย่างที่มีขายทั่วไปตามตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร เช่น ไก่ย่าง ปลาตุ๋นย่างและหมูปิ้ง เพื่อสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของ BaP ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีข้อมูล

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : acetonitrile HPLC grade, dichloromethane HPLC grade, hexane HPLC grade, methanol HPLC grade, sodium hydroxide AR grade, extrelut NT20 (Merck, cat. no. 1.15096), C₁₈ (Waters, cat. no. WAT 020510)

สารมาตรฐาน : benzo(a)pyrene (BaP) ผลิตภัณฑ์ Dr. Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ 99.5%

การเตรียมสารละลายและสารมาตรฐาน

NaOH 1M : ชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารมาตรฐาน BaP 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน BaP 2.5 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ใช้เป็น stock standard solution

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดป่นอาหาร (Moulinex), เครื่องชั่ง 3 และ 5 ตำแหน่ง (Sartorius), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi), เครื่องเขย่า, vortex mixer, HPLC system (Agilent 1100 series) ประกอบด้วย vacuum degasser, quaternary pump, thermostatted column compartment และ fluorescence detector, diatomaceous earth extraction column (Merck, Germany), syringe filter PTFE 0.20 µm ขนาด 13 มิลลิเมตร, vial สีขาวขนาด 2 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง

ในส่วนของการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ได้ใช้หมู่มากโดยตัดส่วนที่ไหม้เกรียมทิ้งแล้วบดปั่นละเอียดประมาณ 1 กิโลกรัม ส่วนในการสำรวจ

ปริมาณการปนเปื้อนของ BaP ในอาหารปิ้งย่าง ได้เก็บตัวอย่างไก่ย่าง ปลาตุ๋นย่างและหมูปิ้งรวม 101 ตัวอย่าง จากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร รวม 42 แห่ง ได้แก่ ตลาดพร้าว กม.8, สะพาน 2, งามอินทรา, ปัฐวิกรณ์, สายไหม, คันนายาว, มีนบุรี, หนองจอก, ประชานิเวศน์, ศรีเขมา, บางขุนศรี, แสงฟ้า, ศิริชัย, ลาซาล 2000, ท่าเรือคลองเตย, บางจาก, ห้วยขวาง, สีแยกบ้านแขก, วัดจันทร์ สโมสร, สาทร, สวนพลู, เพชรพลอย, นางลิ้นจี่, บางคอแหลม, น้อย, วัดกลาง, หุ่นครุ, พระรามเก้า, สวนหลวงนาชัย, อดก., ลานบุญ, ปิ่นทอง, ท่าดินแดง, วัดแขก, ดาวคะนอง, พรานนก, พงษ์เทพฯ, ศรีราชวัตร, เงินวิจิตร, สามย่าน, สุขสวัสดิ์ และ พุทธมณฑลสาย 4

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 4 กรัม ใส่ใน screw cap Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม NaOH 1M, 12 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเท extrelute 20 NT refill 1 ซอง (น้ำหนักประมาณ 18 กรัม) ใส่ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงใน diatomaceous earth extraction column ใช้ vortex mixer ช่วยทำให้บรรจุได้สม่ำเสมอ ยิ่งขึ้น เติม dichloromethane : hexane (1 : 1) 100 มิลลิลิตร ลงใน diatomaceous earth extraction column รองรับด้วย round-bottom flask 250 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนแห้ง เติม acetonitrile 2 มิลลิลิตร เพื่อให้การทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยนำ sep-pak C₁₈ ต่อเข้ากับ syringe ปิเปต acetonitrile 5 มิลลิลิตร ลงใน syringe ดัน plunger เพื่อให้สารไหลผ่าน ประมาณ 2 หยดต่อวินาที ระวังกายให้ sep-pak C₁₈ แห้ง แล้วใส่ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดลงไป เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตรเป็นตัวชะ

(Eluent) เก็บสารละลายส่วนที่ผ่านออกมา นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง เติม methanol 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน syringe filter PTFE 0.20 µm ขนาด 13 มิลลิเมตรเก็บใน vial สีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับฉีดเข้าระบบ HPLC ต่อไป การตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC ใช้สภาวะดังนี้

Analytical column : PAHC₁₈, 5µm size 250mm.
X 4.6 mm.id. (Waters)
Mobile phase : 80% acetonitrile
Flow rate : 1 ml/min
Column oven : 40 °C
Injection volume : 10 µl
Detector : Fluorescence Ex 264 nm,
Em 410 nm

เมื่อสภาวะของเครื่อง HPLC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4 นาโนกรัม ต่อ มิลลิลิตร 3 ซ้ำ คำนวณ % RSD ของ retention time, peak area และค่า tailing factor เกิดที่ยอมรับ ค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ดังนี้

% RSD ของ retention time	< 1
% RSD ของ peak area	≤ 3
tailing factor	< 2

การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐาน BaP ความเข้มข้น 1 - 40 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient : r)

วิเคราะห์ Method Blank และ Matrix Blank

method blank : สกัดสารเคมีที่ใช้ทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

matrix blank : สกัดตัวอย่างหุ้บตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา (3 ซ้ำ) นิด method blank และ matrix blank เข้าระบบ HPLC เพื่อดูว่ามีพีคที่รบกวนสารมาตรฐานหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

ทดสอบโดยการนิตสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำๆ ค่า LOD เท่ากับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้พีคที่มีความสูงเท่ากับ 3 เท่า signal-to-noise ratio คำนวณต่อน้าหนักของตัวอย่าง

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานประมาณ 2 เท่าของค่า LOD ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และค่า RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Working Range)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับ 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างระดับที่เติมสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่า r

$$\text{ปริมาณ BaP ที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคสารที่พบ} \times \text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน} \times \text{ความเข้มข้นของตัวอย่าง}}$$

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับ 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และ RSD

การประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบที่ได้จะถูกประเมินดังนี้

% Recovery ช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ

60 - 120

RSD เปรียบเทียบกับ Predicted RSD_r ตาม Horwitz's equation โดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio)

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}_r}{\text{Predicted RSD}_r}$$

เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ที่ Codex กับ EU กำหนดไว้ที่ ≤ 2

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้วคำนวณความไม่แน่นอนขยาย โดยใช้ $k = 2$ ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ซึ่งปริมาณสารที่พบคำนวณได้จาก

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์

โดยวิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10% ของตัวอย่าง

ผล

จากการศึกษาสภาวะของเครื่องมือ HPLC พบว่า Chromatogram ของ method blank และ matrix blank ไม่มี peak รบกวนที่มี RT ตรงกับหรือใกล้สารมาตรฐาน และการสร้างกราฟมาตรฐานของ BaP ที่ความเข้มข้น 1, 2, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.9998

ผลการทดสอบได้ค่า LOD เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LOQ เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าความถูกต้องจาก % Recovery เฉลี่ยจากการเติมสาร BaP แล้ววิเคราะห์ 10 ซ้ำ เท่ากับ 89.6 และได้ค่า % RSD เท่ากับ 7.9

ในการทดสอบความตรงและช่วงการวิเคราะห์ พบว่าช่วงการวิเคราะห์ 0.5 – 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างหมูปังที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ซ้ำ ได้กราฟเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.9893

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (ตารางที่ 1) ด้วยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างหมูปังที่ความเข้มข้น 5 ระดับๆ ละ 10 ซ้ำ พบว่า % recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 88.5 – 95.1 ส่วนค่า RSD_r อยู่ในช่วง 4.8 – 15.4 % เมื่อคำนวณค่า Predicted RSD_r จาก Modified Horwitz's equation ซึ่งสมการที่ใช้คำนวณค่า predicts a standard deviation (σ_p) สำหรับสารที่ระดับ <120 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾

$$\sigma_p = \frac{0.22c}{mr}$$

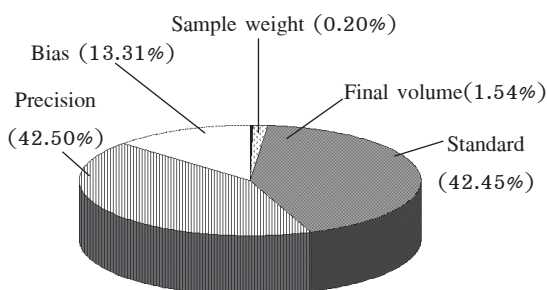
c = concentration

mr = dimensionless mass ratio เช่น
1 $\mu\text{g}/\text{kg} = 10^{-9}$

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงเมื่อเติมสารมาตรฐาน BaP ที่ระดับต่างๆ ในหมูปัง (n = 10)

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	% Recovery (mean $\pm$ SD)	% RSD	% Predicted RSD _r	HORRAT
0.5	89.6 $\pm$ 7.1	7.9	14.5	0.5
1.0	88.5 $\pm$ 10.1	11.4	14.5	0.8
2.5	95.1 $\pm$ 6.7	7.1	14.5	0.5
5.0	88.7 $\pm$ 13.7	15.4	14.5	1.1
10.0	92.4 $\pm$ 4.4	4.8	14.5	0.3

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้พัฒนานี้ ได้แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนจากการชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ ความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยง (repeatability) เมื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่า LOQ คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายได้เท่ากับ 0.12 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แหล่งความไม่แน่นอน (ตารางที่ 2) และสัดส่วนของแหล่งความไม่แน่นอน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ BaP ในอาหารปังอย่าง

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ BaP ในเนื้อสัตว์ปิ้งย่าง

Component	Value, x	Standard uncertainty, u (x)	Relative standard uncertainty, u(x)/x
1. Sample weight	4 g		
- tare		0.00109 g	0.00027
- gross		0.00109 g	0.00027
2. Final volume			
- Calibration (vol. pipette)	1 ml	0.00286 ml	0.00286
- temperature (vol. pipette)	1 ml	0.00048 ml	0.00048
3. Conc. of standard			
- purity	99.5 %	0.28868 %	0.00290
<u>Stock std.</u>			
Std. weight	0.0025 g		
- tare		0.00014 g	0.05636
- gross		0.00014 g	0.05636
- calibration (vol. flask)	25 ml	0.01633 ml	0.00065
- temperature (vol. flask)	25 ml	0.01212 ml	0.00048
<u>Intermediate std.</u>			
- calibration (vol. flask)	10 ml	0.01633 ml	0.00163
- temperature (vol. flask)	10 ml	0.00485 ml	0.00048
- calibration (vol. pipette)	1 ml	0.00286 ml	0.00286
- temperature (vol. pipette)	1 ml	0.00048 ml	0.00048
<u>Working std.</u>			
- calibration (vol. flask)	5 ml	0.01021 ml	0.00204
- temperature (vol. flask)	5 ml	0.00242 ml	0.00048
- calibration (vol. pipette)	1 ml	0.00286 ml	0.00048
- temperature (vol. pipette)	1 ml	0.00048 ml	0.00048
4. Precision (Repeatability)	0.45 µg/kg	0.03600 µg/kg	0.08000
5. Bias (Recovery)	89.6 %	2.24541 %	0.02506
Combined standard uncertainty			0.11586
Standard uncertainty (u_c), $0.11586 \times 0.5 \mu\text{g/kg}$			0.058 µg/kg
Expanded uncertainty (U), $k = 2$, $2 \times 0.058 \mu\text{g/kg}$			0.116 µg/kg

การสำรวจปริมาณ BaP ในอาหารปิ้งย่าง เช่น ไก่ย่าง ปลาตุ๋นย่างและหมูปิ้ง ที่มีจำหน่ายในตลาดสดจำนวน 42 แห่งในเขตกรุงเทพมหานคร รวมทั้งสิ้น 101 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์ พบว่าไก่ย่าง 35 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน 11 ตัวอย่าง ปลาตุ๋นย่าง 36 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน

29 ตัวอย่าง และหมูปิ้ง 30 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน 12 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยการตรวจพบในไก่ย่าง ปลาตุ๋นย่างและหมูปิ้ง < 0.5, 0.8 และ 0.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 3) จากการตรวจวิเคราะห์ห่ออาหารปิ้งย่างโดยการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ พบว่า ค่า % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 81.5 และค่า % RSD เท่ากับ 12.7

ตารางที่ 3 การสำรวจการปนเปื้อนของ BaP ในอาหารปิ้งย่างที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร

ชนิด	จำนวนตัวอย่าง		ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
	วิเคราะห์	ตรวจพบ	ต่ำสุด – สูงสุด	Mean	Median
ไก่ย่าง	35	11	< 0.5 – 0.7	< 0.5	< 0.5
ปลาตุ๋นย่าง	36	29	< 0.5 – 3.2	0.8	0.7
หมูปิ้ง	30	12	< 0.5 – 1.3	0.6	0.5
รวม	101	52	< 0.5 – 3.2	0.7	0.5

วิจารณ์

BaP ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์นั้นจะสะสมอยู่ทั้งในส่วนที่เป็นไขมันและเนื้อเยื่อ หลักการที่ใช้ทั่วไปจะต้องกำจัดไขมัน ใช้การต้มตัวอย่างด้วย methanol แล้ว hydrolyse ด้วย potassium hydroxide หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงแล้วแยกสาร BaP ออกมาโดยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยสารละลายที่เหมาะสม^(3, 4, 5) แล้วทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดย clean-up ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมกับวิธีการนั้นๆ ตรวจหาชนิดและปริมาณสารด้วยเทคนิค GC, GC-MS หรือ HPLC^(3, 6, 7, 8) จากการศึกษาเอกสารพบว่า Simko P. ได้ทดลองสกัดตัวอย่างปลารมควันด้วยวิธีการต้มกับ methanol และ potassium hydroxide ไม่ได้ผลดีเนื่องจากสกัดได้ 30% ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการปนเปื้อนในอาหารที่มีการปิ้งย่าง จึงนำหลักการย่อยสลายตัวอย่างด้วยต่าง แล้วใช้ solid phase extraction

เพื่อกำจัดไขมันออกจากตัวอย่าง หลังจากนั้นกำจัดสารบกวนอื่น โดยใช้ sep-pak C₁₈ ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก และใช้ solvent ในปริมาณที่น้อยกว่าการทำ liquid-liquid extraction

การทดสอบความถูกต้องของวิธี ได้ทดสอบ performance characteristics ที่กำหนดใน EURACHEM Guide⁽⁹⁾ ได้แก่ LOD, LOQ, accuracy, precision, linear & working range เพื่อแสดงว่าวิธีดังกล่าวเหมาะสมที่จะใช้กับวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ คือเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารปนเปื้อนปริมาณน้อยได้ถูกต้องและแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ อีกทั้งยังอยู่ในเกณฑ์ตามที่สหภาพยุโรปได้กำหนดใน Commission Directive 2005/10/EC⁽¹¹⁾ โดยจะต้องมีค่า LOD ไม่มากกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, LOQ ไม่มากกว่า 0.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, Precision มีค่า HORRAT_r หรือ HORRAT_R น้อยกว่า 1.5,

Recovery 50 - 120% และค่าความไม่แน่นอนสูงสุดที่ยอมรับได้คำนวณจาก

$$Uf = \sqrt{[(LOD/2)^2 + (0.2C)^2]}$$

เมื่อ Uf = maximum standard uncertainty

LOD = limit of detection of the method

C = concentration of interest

ดังนั้นถ้าตรวจพบ BaP ที่ระดับ LOQ คือ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม maximum standard uncertainty ต้องน้อยกว่า 0.18 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นที่ปริมาณตรวจพบดังกล่าวพบว่ามีค่า standard uncertainty เท่ากับ 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยสรุปแล้วผลการทดสอบ performance characteristics ทุกค่าเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของกลุ่มสหภาพยุโรป

การสำรวจการปนเปื้อนของ BaP ในไก่ย่าง ปลาตุ๋นและหมูปิ้งที่วางขายทั่วไปตามตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของ BaP ในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ไม่เกินค่ากำหนดของกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปที่ประกาศใน Commission Regulation (EC) No 208/2005⁽¹²⁾ โดยกำหนดปริมาณสูงสุดในเนื้อสัตว์รมควัน ปลารมควัน เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำค่าการตรวจพบสูงสุดที่พบในปลาตุ๋นคือ 3.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มาคำนวณการได้รับ BaP จากการบริโภคโดยใช้ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย⁽¹³⁾ โดยใช้ปริมาณการบริโภคสัตว์น้ำจืดประเภทปลา ลำตัวยาว ไม่มีเกล็ด เช่น ปลาตุ๋น ปลาสด ปลาแซลมอน ซึ่งค่าเฉลี่ยของการบริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด เท่ากับ 0.011 กิโลกรัม/คน/วัน คนไทยจะได้รับ BaP จะมีค่าเท่ากับ 0.03 ไมโครกรัม/คน/วัน และหากคิดคำนวณจากข้อมูล 97.5 percentile ของผู้บริโภคเท่านั้น (eater only) ซึ่งถือเป็น worst-case

ปริมาณการบริโภคเท่ากับ 0.156 กิโลกรัม/คน/วัน จะได้รับ BaP เท่ากับ 0.50 ไมโครกรัม/คน/วัน เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศออสเตรีย อิตาลี เนเธอร์แลนด์ อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา ปริมาณ BaP ที่ได้รับของประเทศเหล่านี้เท่ากับ 0.36, 0.2, 0.12 - 0.5, 0.48 และ 0.16 - 1.6 ไมโครกรัม/วัน/คน ตามลำดับ ส่วนประเทศเยอรมนีมีค่า 0.14 - 1.0 ไมโครกรัมต่อสัปดาห์⁽¹⁴⁾ จะเห็นได้ว่าปริมาณ BaP ที่คนไทยได้รับ ถ้าคำนวณจากค่าเฉลี่ยจะน้อยกว่ามาก แต่หากคิดใน worst-case ก็ไม่แตกต่างจากประเทศอื่น

จากการตรวจพบ BaP ในเนื้อสัตว์ปิ้งย่าง ซึ่งเป็นอาหารที่สัมผัสกับเปลวไฟโดยตรงหรือจากควันที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์จากปฏิกิริยาไพโรไลซิสของน้ำมันจากอาหารที่หยดลงบนแหล่งความร้อน จะเห็นได้ว่าปลาตุ๋นจะมีอัตราการตรวจพบมากกว่าไก่ย่างและหมูปิ้ง อาจเกิดจากปลาตุ๋นใช้เวลาในการย่างนาน สัมผัสกับควันที่เกิดจากการหยดของน้ำมันจากตัวปลา ทั้งยังไม่สามารถตัดแต่งในขณะจำหน่ายได้เหมือนกับไก่ย่างหรือหมูปิ้งซึ่งมักจะมีการตัดส่วนที่ไหม้เกรียมทิ้ง ฉะนั้นในการบริโภคอาหารปิ้งย่าง ควรตัดแต่งไขมันส่วนเกินในชิ้นเนื้อก่อนการปิ้งย่าง ทำให้ลดการเผาไหม้ของหยดน้ำมันในระหว่างให้ความร้อน หรือหลีกเลี่ยงการปรุงอาหารที่ถูกเปลวไฟโดยตรง เพื่อความปลอดภัยในการบริโภคและลดความเสี่ยงในการได้รับสารนี้สะสมในร่างกาย

สรุป

ผลจากการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์สรุปได้ว่ามีความถูกต้องและเหมาะสมเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของสหภาพยุโรปที่จะใช้ในการตรวจหาชนิดและปริมาณของสาร BaP ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยากและใช้สารเคมีปริมาณน้อยกว่าวิธีอื่น

สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของ BaP ในการสำรวจเพื่อเฝ้าระวังอันตรายจากการบริโภคอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังเป็นวิธีที่ตรวจอาหารนำเข้าในเกณฑ์เดียวกับที่สหภาพยุโรปใช้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาพัฒนางานดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการขยายขอบข่ายการวิเคราะห์ทั้งเพิ่มชนิดสารในกลุ่มของ PAHs และกลุ่มของอาหารประเภทอื่น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ที่สนับสนุนด้านงบประมาณและคุณจันทร์ฉาย แจ้งสว่าง อดีตผู้ทรงคุณวุฒิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ริเริ่มและให้การสนับสนุนงานศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services; 1995. p.1.
2. อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์, กนกพร อธิสุข, จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. สิ่งปนเปื้อนในอาหาร: ผลกระทบต่อสุขภาพคนไทย. กรุงเทพฯ: คณะกรรมการระบาดวิทยาแห่งชาติ สถาบันวิจัยสาธารณสุขไทย; 2537. หน้า 109-11.
3. Kangsadalamai K. Survey of some Thai market basket commodities for polycyclic aromatic hydrocarbon content: 1. development of fast screening methods for seafood. J Nutr Assoc Thai 1984; 18(2): 73-88.
4. Yurchenko S, Molder U. The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. J Food Comp Anal 2005; 18(8): 857-69.
5. Simon R, Palme S, Anklam E. Method validation for determination of the 15 European-Priority polycyclic aromatic hydrocarbons in primary smoke condensates by gas chromatography/ mass spectrometry: Interlaboratory study. J AOAC Int 2006; 89(3): 773-81.
6. Gonzalez AS, Lage Y, Simal LJ. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from buzzards (*Buteo buteo*) and tawny owl (*Strix aluco*) by liquid chromatography with fluorescence detector. J AOAC Int 2002; 85(1): 141-5.
7. Rivera L, Curto MJ, Pais P, Galceran MT, Puignou L. Solid-phase extraction for the selective isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes and heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled meat. J Chromatogr A 1996; 731(1-2): 85-94.
8. Simko P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoked flavouring food additives. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 770(1-2): 3-18.
9. The fitness for purpose of analytical method: A laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: EURACHEM Guide; 1998. p. 5-24.
10. Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst 2000; 125(3): 385-6.
11. Commission directive 2005/10/EC of 4 February 2005 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of benzo(a)pyrene in foodstuffs. Official Journal of European Union 2005; L 34/15-20.

12. Commission regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. Official Journal of European Union 2005: L 34/3–5.
13. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2549.
14. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental health criteria no. 202. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1998.

Method Development of Benzo(a)Pyrene in Charcoal–Grilled Animal Tissue

Jitpaka Suntudrob Thongsuk Payanun and Kanokporn Atisook

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Benzo(a)pyrene (BaP) is one of the compound of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal–grilled animal tissue as a result of incomplete combustion or pyrolysis of organic matter which are probable human carcinogen. Determination of benzo(a)pyrene was studied and developed. The sample was saponified with base and separated by solid phase extraction. Sep-Pak C₁₈ was used for clean-up procedure. BaP was detected and quantitatively determined by HPLC–Fluorescence detector. The method was validated by using grilled pork as represented matrix for charcoal–grilled animal tissue. The results showed that the limit of detection and limit of quantitation were 0.3 µg/kg and 0.5 µg/kg, respectively. The linear working range was 0.5 – 10.0 µg/kg with the correlation coefficient of 0.9893. Accuracy of the method was shown by % recovery of spiking BaP standard to sample matrix throughout the linear range was 88 – 95. Precision was shown by % relative standard deviation was 4.8 – 15.4. From validation data, the method's performance characteristics of the developed method were complied to Commission Directive 2005/10/EC (4 February 2005). On the conclusion, the developed method was valid and fit for using as analytical method for monitoring hazard of intake of BaP from charcoal grilled food.

Key words : Benzo(a)pyrene, Food, Method validation, Polycyclic aromatic hydrocarbons