



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาการปนเปื้อนสารฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ปีงบประมาณ 2560 :

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในรูปอิสระ (free-formaldehyde)

และสำรวจปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร

Development of analytical method for free-formaldehyde and
survey of formaldehyde in foods

คณะผู้วิจัย

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

- | | |
|-----------------------|-------------------------------|
| 1. นางอุมมา บริบูรณ์ | 2. นางสาวปุษยา แสงวิรุฬห์ |
| 3. นางสาวนิตา ยุธยาติ | 4. นางสาวพนาวลัย กลิ่งกลางดอน |
| 5. นายวรพงศ์ พรหมณา | 6. นางสาววันวิสา สนิทเชื้อ |

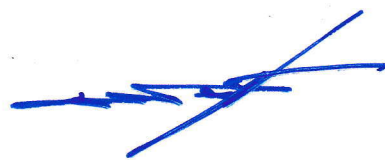
ภายใต้งบประมาณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในโครงการบูรณาการอาหารปลอดภัย (Food Safety)

คำปรารภ

ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร เป็นประเด็นที่หลายหน่วยงานให้ความสำคัญ องค์การนาชาติสากล ตระหนักถึงพิษและอันตรายของฟอร์มาลดีไฮด์ และพบว่าเป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์ ดังนั้น กระทรวงสาธารณสุขจึงได้กำหนดฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลิน เป็นสารห้ามใช้ในอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่151 (พ.ศ. 2536) และปรับเป็นฉบับที่ 391 (พ.ศ. 2561) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย อนึ่งภายใต้นโยบาย“อาหารปลอดภัย : food safety” ของกระทรวงสาธารณสุข มีคณะทำงานพัฒนากลไกการบริหารจัดการความเสี่ยงปัญหาสารฟอร์มาลินในอาหาร กำหนดแนวทางป้องกันและแก้ไขปัญหาฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารในเชิงนโยบายของประเทศ เพื่อให้อาหารมีคุณภาพ ปลอดภัย และยั่งยืน ส่งเสริมให้ประชาชนมีสุขภาพดี ถ้วนหน้า

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในบริบทที่เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านอาหาร และเป็นหน่วยงานหลักที่ร่วมดำเนินการในมาตรการทางกฎหมาย และการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ได้จัดทำโครงการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ในรูปสารอิสระ (free – FA) เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้ตรวจวิเคราะห์ และได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้สำรวจปริมาณ free – FA ในอาหาร เพื่อกำหนดเงื่อนไขที่เกี่ยวข้องในการพัฒนากลไกการบริหารจัดการความเสี่ยงปัญหาสารฟอร์มาลินในอาหารของประเทศตามกฎหมาย

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการศึกษาการปนเปื้อนสารฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ปีงบประมาณ 2560 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในรูปอิสระ (free-formaldehyde) และสำรวจปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารนี้ จะเป็นประโยชน์ สำหรับหน่วยงานทั้งภาครัฐและภาคเอกชนในการนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ และเป็นแนวทางในการควบคุม กำกับ ดูแล ความปลอดภัยของอาหารเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคต่อไป



(นายแพทย์บัลลังก์ อุปพงษ์)

ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

29 มี.ค. 2562

บทคัดย่อ

ฟอร์มาลดีไฮด์จัดเป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์ กลุ่มที่1 โดย International Agency for Research on Cancer (IARC) และประเทศไทยกำหนดเป็นสารห้ามใช้กับอาหาร ขณะที่สารนี้เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตทั้งในรูปสารอิสระ และรวมอยู่กับสารอื่น จากการศึกษาพบว่าฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (free-FA) มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดพิษ ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ free-FA ในอาหารเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ตามโครงการอาหารปลอดภัย โดยการสกัด free-FA ในปลาหมึก และสไลนง (เครื่องในวัว) ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา ด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v) ภายใต้คลื่นความถี่สูง (sonicate) เป็นเวลา 10 นาที ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ 2,4-Dinitrophenylhydrazine และ Nash's Reagent วัดปริมาณด้วย HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ช่วงของการวัดมีความเป็นเส้นตรง ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) และความเที่ยง (precision) ได้ตามเกณฑ์กำหนดและตรงตามวัตถุประสงค์ อย่างไรก็ตาม % recovery มีช่วงกว้างตั้งแต่ 33.6 ถึง 89.0 ขึ้นอยู่กับสภาพของตัวอย่าง เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV ไปสำรวจปริมาณ free-FA ในปลาหมึก สไลนง และเห็ด จำนวน 118 ตัวอย่าง ผลที่ได้ตรวจพบ free-FA ในปลาหมึก จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.7) ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง <5.0 - 7.14 ค่าเฉลี่ย 4.36 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เห็ดตรวจพบ 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85.7) ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง <5.0 - 22.89 ค่าเฉลี่ย 10.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจไม่พบ free-FA ในสไลนง

คำสำคัญ : อาหาร ฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ คลื่นความถี่สูง HPLC-UV LC-MS/MS Spectrophotometer

Abstract

Formaldehyde was classified as a carcinogen to humans (group 1) by the International Agency Research on Cancer (IARC) and it is illegally added to food in Thailand. Meanwhile it occurs and is present in organism itself naturally in both free and bound forms. The literatures state that free formaldehyde (free-FA) is sensitive to react with biomolecules in organisms, which is of toxicological interesting substance. The aim of this study was to develop a free-FA testing procedure for food matrices and then to use it for monitoring formaldehyde contamination in food in accordance with the food safety programs. The developed method was conducted to the free-FA extraction and analysis of squid and rumen (Sabainang) as the food specimens. The producer used 0.1% acetic acid (v/v) solution as an extractant and extracted under sonication for 10 min, after that the 2,4-Dinitrophenylhydrazine and Nash's reagent were used as derivative for HPLC-UV, LC-MS/MS and Spectrophotometer measurement respectively. The method validation data of working range, specificity, LOD, LOQ and precision were accepted and fitted for purpose. However, the recovery was found in a wide range from 33.6 to 89.0 % that was depending on condition of the sample. In addition the HPLC-UV method was carried out for free-FA determination of 118 samples of squid, Sabainang and mushroom. The results were found free-FA in 8 squids (12.7%) and 18 mushrooms (85.7%) which the levels were in the range of <5.0 - 7.14 mg/kg and <5.0 - 22.89 mg/kg respectively and the average values were 4.36 mg/kg and 10.81 mg/kg respectively. It was not found free -FA in Sabainang.

Keywords: food, free formaldehyde, sonicate, HPLC-UV, LC-MS/MS, Spectrophotometer

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยงบประมาณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในโครงการบูรณาการอาหารปลอดภัย (Food Safety) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ขอขอบพระคุณผู้บริหารที่ให้การสนับสนุนทรัพยากรต่างๆในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายสารพิษสารปนเปื้อนและไดออกซิน และฝ่ายตรวจวิเคราะห์และรับรองอาหารปลอดภัย สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้ร่วมกันในการเก็บตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ และดำเนินการในส่วนต่างๆ จนการศึกษาวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 14 ศูนย์ ที่ได้ร่วมกันเรียนรู้และเข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะความร่วมมือและความอนุเคราะห์ จากท่านทั้งหลายดังที่กล่าวมา คณะผู้ดำเนินโครงการ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้ดำเนินโครงการ

2562

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ฟอร์มาลดีไฮด์	5
2.2 ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร	13
2.3 วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร	20
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ	33
3.1 ลำดับขั้นตอนการดำเนินงาน	33
3.2 ตัวอย่าง	34
3.3 สารมาตรฐาน สารเคมี และอุปกรณ์	34
3.4 การดำเนินงาน	40
3.5 การฝึกอบรม	47
บทที่ 4 ผลการศึกษา	48
4.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร	48
4.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)	51
4.3 ผลการศึกษาปริมาณ free-FA ในปลาหมึกจากการทดลองที่สภาวะต่างๆ	67
4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก สไปนาง และเห็ด เพื่อการสำรวจเบื้องต้นของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหาร	69

สารบัญ (ต่อ)	หน้า
4.5 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร : ปลาหมึก และ สไปนาง	70
บทที่ 5 วิจัยและสรุป	71
5.1 วิจัย	71
5.2 สรุป	77
5.3 ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารอ้างอิง	79
ภาคผนวก ก	86
ภาคผนวก ข	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติของทางกายภาพของฟอร์มาลดีไฮด์	5
2.2	ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบในอาหารประเภทต่าง ๆ	15
2.3	ผลการตรวจเฝ้าระวังสารฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารกลุ่มเสี่ยงทั่วประเทศโดยใช้ชุดทดสอบในช่วงเดือนธันวาคม 2558 - กุมภาพันธ์ 2559	16
2.4	ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อและอวัยวะภายในของปลาหมึกต่างสายพันธุ์	19
2.5	วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร	28
3.1	สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งผลิตไอออนสำหรับวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ในโหมดประจุลบ (negative mode)	37
3.2	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (multiple reaction monitoring, MRM) การวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS	37
3.3	เกณฑ์การยอมรับ % recovery ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จาก Horwitz's equation (expected % RSD _r) และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	44
3.4	สภาวะทดลองของปลาหมึก ก่อนการตรวจวิเคราะห์ free-FA	46
4.1	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก จากการสกัดด้วยน้ำ และสารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v)	49
4.2	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในสไปนาง จากการสกัดด้วยน้ำ และสารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v)	49
4.3	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก จากการสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v) ใช้คลื่นความถี่สูง เป็นเวลา 10 20 และ 40 นาที	50
4.4	ปริมาณ free-FA ในสไปนางที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer	51
4.5	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก และสไปนาง ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)	57
4.6	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD)	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก และสับปะรด ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD)	59
4.8	ผลการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสับปะรด	60
4.9	ผลการทดสอบความเที่ยง (%RSD) และความแม่นยำ (%recovery) ของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสับปะรดด้วยเครื่อง HPLC-UV	61
4.10	ผลการทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกด้วยเครื่อง LC-MS/MS	62
4.11	ผลการทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสับปะรด ด้วยเครื่อง Spectrophotometer	63
4.12	แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง HPLC-UV	64
4.13	แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง LC-MS/MS	65
4.14	แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหารด้วยเครื่อง Spectrophotometer	66
4.15	ปริมาณ free-FA ในปลาหมึกจากการทดลอง ในสภาวะต่างๆ	68
4.16	ผลการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก สับปะรด และเห็ด	69
๗. 1	ผลวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกนำเข้าจากต่างประเทศ	88
๗. 2	ผลวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก แหล่งจับในประเทศ	90
๗. 3	ผลวิเคราะห์ free-FA ในสับปะรด (สีดำ)	92
๗. 4	ผลวิเคราะห์ free-FA ในเห็ด	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	วิธีวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ตามรูปแบบของสารที่มีอยู่ในเนื้อปลา	22
2.2	การทำปฏิกิริยาระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ กับ acetyl acetone	23
2.3	การทำปฏิกิริยาระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ กับ Chromotropic acid	23
2.4	การทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) กับ 2,4-DNPH	25
4.1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์กับพื้นที่ใต้พีค ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร (ก) Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residual รอบค่า 0 (ข)	52
4.2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์กับพื้นที่ใต้พีค ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่การทรานสิชัน m/z 209/163 (ก) และ Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residual รอบค่า 0 (ข)	52
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ กับ absorbance (Abs) ตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร (ก) และ Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residual รอบค่า 0 (ข)	53
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติม และปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่าง เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV	54
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติม และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ตรวจพบในตัวอย่าง เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS	54
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติม และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ตรวจพบในตัวอย่าง เมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer	55
4.7	โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างที่เติมอัลดีไฮด์ 3 ชนิด ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV : ฟอร์มาลดีไฮด์ (FA) อะซีทาลดีไฮด์ (AA) โปรพิโอนาลดีไฮด์ (PA)	56
4.8	โครมาโทแกรมของฟอร์มาลดีไฮด์ ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่ m/z 209/163 และ 209/133 (ก) สารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) สารละลายตัวอย่างที่เติมฟอร์มาลดีไฮด์ อะซีทาลดีไฮด์ และโปรพิโอนาลดีไฮด์	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.9	ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง HPLC-UV	64
4.10	ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง LC-MS/MS	65
4.11	ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer	66
4.12	การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร: ปลาหมึก และสับปะรด วันที่ 18-19 ธันวาคม 2560 ณ ห้องประชุม 806 อาคาร 8 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ. นนทบุรี	70

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

การปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร เป็นประเด็นที่หลายหน่วยงานให้ความสำคัญต่อเนื่องมานาน International Agency for Research on Cancer ; IARC ⁽¹⁾ กำหนดฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารก่อมะเร็ง กลุ่มที่ 1 ที่ทำให้เกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก ขณะที่ The United State Environmental Protection Agency ; U.S. EPA ⁽²⁾ จัดให้เป็นสาร ที่มีโอกาสก่อมะเร็งต่อมลูกหมาก ในกลุ่ม B1 (probable human carcinogen) และกำหนดค่ายอมรับให้บริโภคได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือผลเสียต่อร่างกาย (Reference dose; RfD) ไว้ ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน World Health Organization; WHO ⁽³⁾ กำหนดค่าปริมาณได้รับประจำวันที่ทนได้ (Tolerable daily intake; TDI) ไว้ไม่เกิน 0.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในส่วนของประเทศไทยมีหลายหน่วยงาน ที่ดำเนินการเฝ้าระวัง ตรวจสอบติดตามการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารตามแผนการเฝ้าระวังประจำปีอย่างต่อเนื่อง โดยที่ฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลินเป็นสารห้ามใช้ในอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 391 (พ.ศ.2561) เรื่องกำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย⁽⁴⁾ (เดิม ฉบับที่ 151 (พ.ศ. 2536)) ซึ่งหากตรวจพบ หรือพบว่ามีสารลักลอบใส่ในอาหาร จัดเป็นการผลิตหรือจำหน่ายอาหารไม่บริสุทธิ์ มีโทษจำคุกไม่เกิน 2 ปี หรือปรับไม่เกิน 20,000 บาท กระทรวงสาธารณสุข มีนโยบายส่งเสริมให้ประชาชนมีสุขภาพแข็งแรง ลดความเสี่ยงอันตรายจากสารเคมีในอาหาร โดยขับเคลื่อนนโยบาย “อาหารปลอดภัย : food safety” ให้ประชาชนทั่วไปมีสุขภาพดีถ้วนหน้า และมีคณะกรรมการวิเคราะห์ความเสี่ยงด้านความปลอดภัยอาหาร ดำเนินงานด้านอาหารปลอดภัยอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้อาหารมีคุณภาพปลอดภัย และยั่งยืน ถึงกระนั้น ยังคงมีรายงานการตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารหลายประเภท ข้อมูลจากสำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย กระทรวงสาธารณสุข รายงานว่าจากการสอบถามและรับทราบประเด็นความเสี่ยงในอาหารที่เป็นปัญหาของจังหวัดเมื่อจัดเรียงลำดับความสำคัญพบว่า การตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเป็นปัญหาลำดับต้นๆของประเทศ เพื่อแก้ปัญหาจึงได้มีคำสั่งกระทรวงสาธารณสุขที่ 1003/2559 ลงวันที่ 5 มิถุนายน 2559 เรื่องแต่งตั้งคณะทำงานพัฒนากลไกการบริหารจัดการความเสี่ยงปัญหาสารฟอร์มาลินในอาหารขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา รวบรวม วิเคราะห์และประเมินสถานการณ์ความเสี่ยงของสารฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารในระดับประเทศ เพื่อเสนอแนวทางการป้องกันและแก้ไขปัญหาฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารในเชิงนโยบายของประเทศ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมเป็นคณะกรรมการ และเป็นหน่วยงานหลักที่ร่วมดำเนินการมาตรการทางกฎหมายและการเฝ้าระวัง ในกิจกรรมการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และศึกษาการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร เพื่อสนับสนุนการกำหนดกฎหมายและเงื่อนไขที่เกี่ยวข้อง ซึ่งสถานการณ์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารรายงานโดยหน่วยงานของกระทรวงสาธารณสุข ทั้งในส่วนกลาง

และ ส่วนภูมิภาค ได้จัดเรียงลำดับปัญหาฟอรัมาลดีไฮด์ในแต่ละประเภทอาหาร พบว่า ประเภทเนื้อสัตว์พบในสับนาง ประเภทพืช ผัก ผลไม้ พบในเห็ดชนิดต่างๆ ได้แก่ เห็ดหอม และ เห็ดฟาง ประเภทสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์พบในปลาหมึกกรอบ ปลาหมึกสดและแมงกะพรุน ^(5, 6)

ฟอรัมาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในอาหารอาจมาจากหลายปัจจัยเช่น เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการหมักเพื่อฆ่าแมลง จากการปรุงอาหาร จากการเติมเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆในการผลิตอาหาร หรืออาจแพร่ออกมาจากภาชนะบรรจุที่ทำจากเรซิน ซึ่งมีฟอรัมาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ โดยที่ฟอรัมาลดีไฮด์เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นฟอรัมาลดีไฮด์ที่มีในอาหารจึงเกิดขึ้นได้ด้วยกลไกทางชีวเคมีและทางกายภาพ พบได้ทั้งในรูปสารอิสระ (free-FA) และในรูปที่รวมอยู่กับสารอื่น (bound-FA) เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) กรดอะมิโน (amino acid) และครีเอติน (creatine) เป็นต้น ^(7,8) ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ที่มีในอาหารตามธรรมชาติต่างกันตามชนิด แหล่งกำเนิด และการเก็บรักษา พบได้น้อยในนมสด และเนื้อสัตว์ ขณะที่ในผลิตภัณฑ์เช่น แฮม และไส้กรอกจะพบมากกว่า เห็ดหอมพบฟอรัมาลดีไฮด์สูงกว่าผักและผลไม้ และพบฟอรัมาลดีไฮด์ปริมาณสูง ในปลาทะเล ^(9,10)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นหน่วยงานหลักที่อยู่ในแผนดำเนินการเพื่อแก้ไขปัญหาฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหารของประเทศ ในกลยุทธ์ด้านการศึกษาประเด็นปัญหาฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหารที่ยังไม่มีข้อมูลชัดเจน และในด้านวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นเพื่อดำเนินการตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข และขับเคลื่อนแผนการแก้ไขปัญหาฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหาร ภายใต้โครงการ บูรณาการอาหารปลอดภัย (Food Safety) สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงได้จัดทำโครงการศึกษาการปนเปื้อนฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหารต่อเนื่อง 2 ปี คือปีงบประมาณ 2559 ถึง 2560 ผลการดำเนินงานในช่วงปีแรก ได้จัดทำหนังสือเพื่อเผยแพร่ความรู้ เรื่องฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหาร ซึ่งรวบรวมองค์ความรู้เกี่ยวกับฟอรัมาลดีไฮด์ ที่ประกอบด้วย คุณสมบัติ ข้อเท็จจริงของการเกิดขึ้น ความคงอยู่ ความเป็นพิษ ค่าพื้นฐานที่มีในอาหารตามธรรมชาติ การประเมินการได้รับสารจากการบริโภค เกณฑ์ความปลอดภัย และปริมาณที่กำหนดตามกฎหมายในอาหารและน้ำดื่มของประเทศต่างๆ รวมทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และระหว่างเดือนธันวาคม 2558 ถึง กุมภาพันธ์ 2559 ได้ตรวจคัดกรองฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหารโดยชุดทดสอบ ผลการตรวจอาหารจำนวน 1,666 ตัวอย่างซึ่งเก็บจากท้องตลาด ประกอบด้วย ปลาหมึกกรอบ สับนางขาว สับนางดำ ปลาหมึกสด เครื่องในรวม เล็บมือนาง แมงกะพรุน ปลา เนื้อวัว เนื้อไก่ เห็ด กุ้ง กุ้ง ปู หอย และผักต่างๆ พบว่า ชนิดอาหารที่พบฟอรัมาลดีไฮด์เรียงตามจำนวนที่พบจากมากไปน้อย มีดังนี้ ปลาหมึกกรอบ สับนางขาว ปลาหมึกสด และสับนางดำ จัดเป็นอาหารกลุ่มเสี่ยงที่ต้องเฝ้าระวังและแก้ปัญหา ⁽¹¹⁾

การตรวจเฝ้าระวังฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหารโดยหน่วยงานภายใต้กระทรวงสาธารณสุข ใช้วิธีตรวจคัดกรองด้วยชุดทดสอบ (test kit) กรณีที่ตรวจพบจะนำตัวอย่างไปตรวจยืนยันในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำผลที่ได้ไปดำเนินการตามกฎหมายต่อไป วิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์มีความสำคัญในการบ่งบอกปริมาณของฟอรัมาลดีไฮด์แต่ละรูป Bechmann IE ⁽¹²⁾ เสนอว่า การรายงานผลวิเคราะห์ฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหาร ควรรายงานวิธีการตรวจวิเคราะห์ควบคู่ไปด้วย และแนะนำให้ตรวจวิเคราะห์

free – FA หากว่าต้องการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสาร ซึ่งจากการศึกษาพบว่าฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (free-FA) มีความไวต่อการจับกับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลต่อสุขภาพ เพื่อให้การเฝ้าระวังการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่สามารถบ่งชี้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดจากการเติมโดยผิดกฎหมาย ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลต่อสุขภาพได้หากผู้บริโภคได้รับ สอดรับกับการตรวจคัดกรองเบื้องต้น และเป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถดำเนินการได้โดยห้องปฏิบัติการทั่วไป ใช้เครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ ใช้เวลาวิเคราะห์ไม่มากนัก และผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ตามหลักเกณฑ์สากล ด้วยรูปแบบของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารมีหลายลักษณะ การตรวจคัดกรองโดยชุดทดสอบ และการตรวจยืนยันโดยห้องปฏิบัติการ อาจจะวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่อยู่ในรูปแบบต่างกัน โดยที่การตรวจคัดกรองด้วยชุดทดสอบเป็นการตรวจ free – FA ขณะที่การตรวจยืนยันในห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้วิธีการแยกฟอร์มาลดีไฮด์โดยการกลั่นตามวิธี AOAC ⁽¹³⁾ และตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) เป็นการตรวจวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ที่บอกได้ยากว่าอยู่ในรูปแบบใด เนื่องจากใช้วิธีแยกสารออกมาโดยการกลั่นตามปกติ ในเวลาสั้นๆ อาจจะมีทั้ง free – FA และ bound-FA ปริมาณที่พบจึงสูงกว่าการตรวจวัดค่า free – FA เพียงอย่างเดียว ดังนั้นโดยวิธีการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันจึงได้ค่าฟอร์มาลดีไฮด์ที่ไม่สอดคล้องกัน เพื่อให้ห้องปฏิบัติการใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในรูปอิสระที่สอดคล้องกับวิธีตรวจคัดกรองเบื้องต้น และเป็นวิธีวิเคราะห์ที่วัดสารในรูปแบบที่ก่อให้เกิดพิษหรืออันตรายได้ ในปีงบประมาณ 2560 จึงได้จัดทำโครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ในรูป free – FA และสำรวจปริมาณ free – FA ในอาหารกลุ่มเสี่ยงที่เป็นปัญหาของประเทศ ที่ประเมินได้จากผลการสำรวจในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 และจากรายงานสถานการณ์การเฝ้าระวังการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารของประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ free – FA ในอาหาร และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์
- 1.2.2 ตรวจวิเคราะห์ free – FA ในอาหารกลุ่มเสี่ยงได้แก่ ปลาหมึกสด สับปะรด และเห็ด เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของปริมาณ free – FA ที่มีในอาหารตามธรรมชาติ
- 1.2.3 พัฒนาห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหารกลุ่มเป้าหมาย (กลุ่มเสี่ยงที่ตรวจพบ) ได้ เพื่อการเฝ้าระวังและคุ้มครองผู้บริโภค

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

- 1.3.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ free – FA ในอาหาร โดยมีปลาหมึกสดเป็นตัวแทนอาหารทะเล และสับปะรดเป็นตัวแทนอาหารประเภทเนื้อสัตว์บก
- 1.3.2 ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ที่ได้พัฒนาแล้วในด้านคุณลักษณะเฉพาะของวิธี ได้แก่ ช่วงของการวัด (working rang) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ความจำเพาะเจาะจง

(specificity/selectivity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความเที่ยง (precision) ความแม่นยำ (accuracy) และการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

1.3.3 ตรวจวิเคราะห์ free – FA ในปลาหมึก สับปะรด และเห็ด เพื่อการสำรวจเบื้องต้นของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์พื้นฐานที่มีในอาหาร

1.3.4 ผักกอบรม วิธีวิเคราะห์ free – FA ในอาหาร ให้แก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีวิธีวิเคราะห์ free-FA ในอาหารที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ซึ่งจะโยงไปถึงโอกาสที่ได้รับจากการเติมสารลงในอาหารที่ไม่สมควรทำ และอาจเกิดพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกาย เป็นการวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณมากในการเฝ้าระวังความปลอดภัยของอาหาร และสามารถจัดทำเป็นวิธีมาตรฐานของประเทศได้ต่อไป

1.4.2 มีค่าพื้นฐานของปริมาณ free- FA ในอาหารกลุ่มเสี่ยง เพื่อใช้ในการกำหนดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาจมีในอาหารเหล่านั้น

1.4.3 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการเครือข่าย ได้รับการพัฒนา ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free- FA ในอาหารได้

1.4.4 ผลการดำเนินงานตอบสนองมาตรการทางกฎหมาย ในกิจกรรมการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และการพัฒนาองค์ความรู้ ตามแผนงานแก้ไขปัญหาฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารและผลิตภัณฑ์ของประเทศ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฟอร์มาลดีไฮด์

2.1.1 ลักษณะและคุณสมบัติ

ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) เป็นชื่อเรียกตาม International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC หรือชื่อเรียกอื่น คือ สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde solution) ฟอร์มาลีน (Formalin) ฟอร์มอล (Formol) ฟอร์มาลิต (Formalith) แพนโนฟอร์ม (Fannoform) ฟอร์มิกอัลดีไฮด์ (Formic aldehyde) ไฟด์ (Fyde) เมทานาล (Methanal) เมทิลอัลดีไฮด์ (Methyl aldehyde) เมทิลีนออกไซด์ (Methylene oxide) มอร์บิซิด (Morbicid) ออกโซมีเทน (Oxomethane) ออกซีเมทิลีน (Oxymethylene) ไลโซฟอร์ม (Lysoform) ซุปเปอร์ไลโซฟอร์ม (Superlysoform) ⁽¹⁴⁾

CAS Number 50-00-0 สูตรเคมี CH₂O



เป็นก๊าซที่มีกลิ่นฉุน ละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซิโตน ไม่เสถียร การซื้อขายและขนส่งจึงอยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 37-55 โดยน้ำหนัก และมีส่วนผสมเมทานอลอยู่ระหว่างร้อยละ 1-14 เรียกว่า “ฟอร์มาลีน”

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพของฟอร์มาลดีไฮด์ ⁽¹⁴⁾

สมบัติของสาร	ก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์	ฟอร์มาลีน
สภาพที่ปรากฏ	ไม่มีสี	ไม่มีสี
น้ำหนักโมเลกุล	30.03	30.03
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	-19.5 ที่ความดันบรรยากาศ	96 ที่ความดันบรรยากาศ
จุดหลอมเหลว/จุดเยือกแข็ง (องศาเซลเซียส)	-	-92
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	2.8 – 4.0
ความหนาแน่นไอสัมพัทธ์	1.08 ที่ 20 องศาเซลเซียส	1.04 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความดันไอ (มม.ปรอท)	3,890 ที่ 25 องศาเซลเซียส	1.52 ที่ 20 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิที่ติดไฟได้เอง (องศาเซลเซียส)	424	424

ฟอร์มาลดีไฮด์ สามารถเกิดปฏิกิริยาโพลีเมโรไลเซชัน ออกซิเดชัน และแอตติชชัน ในรูปของสารละลายสามารถเกิดปฏิกิริยาโพลีเมโรไลเซชัน ดีคอมโพสิชัน รีดักชัน ออกซิเดชัน แอตติชชัน และคอนเดนเซชัน เมื่อถูกความร้อนจะสลายตัวเป็นกรดฟอร์มิก และหากอุณหภูมิจะสลายตัวให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน เกิดหมอกควันที่เป็นพิษ⁽¹⁴⁾ จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 ตาม พ.ร.บ. วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535⁽¹⁵⁾ การผลิต การนำเข้า-ส่งออก หรือมีไว้ครอบครอง ต้องแจ้งให้พนักงานเจ้าหน้าที่ทราบก่อน และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ ซึ่งต้องขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย และเป็นสารห้ามใช้ในอาหาร ในประเทศไทยมีโรงงานผลิตฟอร์มาลดีไฮด์โดยใช้เมทานอล เป็นวัตถุดิบหลักที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยกระบวนการสำคัญ 2 กระบวนการ⁽¹⁴⁾ คือ

1) ซิลเวอร์ โพรเซส เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเมทานอล กับออกซิเจนภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ใช้โลหะเงินเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เมทานอลเปลี่ยนเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ได้ประมาณ ร้อยละ 77-78 มีคาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดฟอร์มิกเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง

2) ออกไซด์ โพรเซส เป็นกระบวนการที่ทำให้เมทานอลเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับอากาศ โดยมีเหล็ก โมลิบดีนัม และวานาเดียมออกไซด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 300-400 องศาเซลเซียส ทำให้เมทานอลเปลี่ยนเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ได้สูงถึงร้อยละ 93 มีคาร์บอนมอนอกไซด์ และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง

2.1.2 การใช้งาน

มีการนำฟอร์มาลดีไฮด์ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ จำนวนมาก เช่น เป็นวัตถุดิบในการผลิตเรซินชนิดยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ ฟีนอลฟอร์มาลดีไฮด์ เมลามีนฟอร์มาลดีไฮด์ โพลีอะซีทัล และเคมีภัณฑ์อื่น ๆ เรซินที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบจะนำไปใช้ผลิตสินค้าได้มากมาย เช่น ถ้วยชาม ผ้าเบรกรถยนต์ ใบลื้อ ใบลึง ใบดีดทราย แบบหล่อโลหะ ฉนวนกันความร้อน ชิ้นส่วนยานยนต์ ชิ้นส่วนเครื่องใช้ไฟฟ้า อิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น ใช้เป็นสารเชื่อมประสานในการทำพาดิเกิลบอร์ด สารเคลือบ ไม้อัด และเฟอร์นิเจอร์ ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอเพื่อรักษาผ้าไม่ให้ยับย่น ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษเพื่อให้กระดาษลื่นและกันน้ำได้ ใช้ผสมในสีทาบ้าน วอลเปเปอร์ พลาสติก กาว ผ้าใยสังเคราะห์ น้ำยาเคลือบเงาไม้ พรมสังเคราะห์ น้ำยาทำความสะอาด และกระดาษทิชชู ใช้ในการย้อมเพื่อให้สีย้อมติดแน่น ใช้ในการฟอกสี งานด้านการพิมพ์ การฟอกหนัง และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ^(14, 16, 17) ด้านการเกษตร ใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อรักษาคุณภาพของโปรตีนในอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ใช้ในการผลิตสารที่ทำลายหรือป้องกันจุลินทรีย์ที่ทำให้ดินไม่เกิดโรค ใช้ฆ่าเชื้อราในดิน ใช้เป็นปุ๋ย ใช้ในการป้องกันผลผลิตทางการเกษตรจาก ความเสียหาย ระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษา โดยใช้เป็นสารรมในที่เก็บผลผลิตทางการเกษตร ใช้ทำความสะอาดถังไม้ รวมถึงนำไปผสมสารละลายที่ใช้เคลือบผัก ผลไม้ เพื่อยับยั้งการเน่าเสีย ใช้ในบ่อเลี้ยงปลาเพื่อป้องกันโรค⁽¹⁶⁾ กำจัดปรสิตต่าง ๆ ตามผิวหนังและเหงือก และฆ่าเชื้อปลิงในบ่อขณะที่มีปลาอยู่ ด้านการแพทย์ ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อสำหรับทำความสะอาดอุปกรณ์และเครื่องมือทางการแพทย์ ใช้สำหรับฆ่าเชื้อรา นอกจากนี้ไอระเหยของฟอร์มาลดีไฮด์สามารถนำมาอบห้องเพื่อฆ่าเชื้อโรคในโรงพยาบาล ใช้ในการเก็บรักษาศพ เก็บรักษาสภาพตัวอย่างเนื้อเยื่อทางกายวิภาค (anatomical specimens) เพื่อนำไปวิเคราะห์และการวินิจฉัย ด้านเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารกันบูด สารฆ่าเชื้อ และป้องกันเหงื่อออก

มาก เป็นส่วนผสมของยาสีฟัน น้ำยาล้างปาก สบู่ ครีมโกนหนวด และน้ำยาดับกลิ่นตัว^(14,16) ด้านอาหาร ใช้เป็นสารกันเสียในการผลิตเนยแข็งมีการเติมฟอร์มาลดีไฮด์ในรูปของเฮกซะเมทิลีนเตตรามิน (hexamethylenetetramine) ซึ่งเป็นของแข็ง เพื่อค่าเชื้อแบคทีเรียและป้องกันรุกรุนที่เกิดจากแก๊ส ซึ่งแบคทีเรียบางกลุ่มสร้างขึ้นทำให้เนยแข็งแตก⁽¹⁸⁾

2.1.3 การเกิดในสิ่งแวดล้อม

พบได้ทั้งในอากาศ น้ำ และดิน แหล่งกำเนิดสำคัญในชั้นบรรยากาศ เกิดจากการสลายตัวของก๊าซมีเทน (methane) ที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปและมีค่าครึ่งชีวิตหลายปี ดังนั้นฟอร์มาลดีไฮด์จึงมีอยู่ทั่วโลก พบในกระบวนการสันดาปอาหารของพืชและสัตว์ และจากการกระทำของคนซึ่งเป็นแหล่งสำคัญ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงของรถยนต์ ในควันบุหรี่ การเผาไหม้พืชและสัตว์ในเตาหม้อน้ำอุตสาหกรรมที่ใช้ก๊าซ การระเหยออกมาจากผลิตภัณฑ์ที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ เช่น เรซิน กาว ไม้อัด เสื้อผ้า เป็นต้น⁽¹⁹⁾ ในน้ำ เกิดจากการออกซิเดชันของสารอินทรีย์ในระหว่างการฆ่าเชื้อโรคด้วยโอโซน และคลอรีน นอกจากนี้ฟอร์มาลดีไฮด์อาจจะปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำได้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆ และการละลายออกจากพลาสติกที่ใช้ในการส่งน้ำ รวมทั้งข้อต่อ⁽³⁾ ในดินจะเกิดขึ้นในช่วงต้นของการย่อยสลายพืช และอาจปนเปื้อนมาจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้เช่นกัน⁽¹⁷⁾

2.1.4 ความเป็นพิษ

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่สิ่งมีชีวิตได้รับมีแหล่งที่มา 2 ลักษณะ คือ ฟอร์มาลดีไฮด์จากภายนอกร่างกาย (exogenous formaldehyde) และฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (endogenous formaldehyde)

2.1.4.1 ฟอร์มาลดีไฮด์จากภายนอกในร่างกาย

ฟอร์มาลดีไฮด์เข้าสู่ร่างกายได้ทางการหายใจ การกิน และทางผิวหนัง ในสัตว์ทดลองเมื่อได้รับไอของสารจะถูกดูดซึมที่บริเวณทางเดินหายใจส่วนบน บริเวณโพรงจมูก รวมถึงบริเวณหลอดลมใหญ่ (trachea) และหลอดลมฝอย (proximal bronchi) ฟอร์มาลดีไฮด์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลใหญ่ เช่น ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน โดยจับกันในรูปแบบคืนกลับได้ (reversible adduct) หรือเกิดการเชื่อมโยงแบบคืนกลับไม่ได้ (irreversible cross-link)⁽²⁰⁾ เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) และจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะในรูปเกลียวฟอร์เมต หรือหายใจออกในรูปคาร์บอนไดออกไซด์^(20, 21) แม้จะถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว แต่ยังคงมีบางส่วนที่สะสมในร่างกายในรูปของกรดฟอร์มิก ซึ่งอาจทำให้เกิดพิษทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง อาการพิษที่เกิดจะมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณที่รับสัมผัส ความไวเฉพาะบุคคล และช่วงเวลาของการรับสัมผัส ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เข้าสู่ร่างกายผ่านทาง การกิน ในลักษณะของเหลว ส่งผลให้เกิดการระคายเคืองทางเดินอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน (อาจพบอาเจียนเป็นเลือด) ท้องเสีย ปวดอย่างรุนแรงบริเวณปาก คอ และกระเพาะอาหาร อาจเกิดการบาดเจ็บจากการกัดกร่อน เกิดแผลและเลือดออกในกระเพาะอาหาร อาจส่งผลกระทบต่อตับ ระบบปัสสาวะหรือไต ระบบเลือด ระบบต่อมไร้ท่อ เป็นต้น

หากได้รับในปริมาณที่สูง หรือประมาณ 30-60 มิลลิลิตร ทำให้ ปวดท้องอย่างรุนแรง อาเจียน ท้องเดิน หมดสติ เกิดแผลในกระเพาะอาหาร และทำให้เสียชีวิตได้⁽¹⁷⁾

1) ค่าความเป็นพิษ LD₅₀ (ปริมาณที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50) ทาง การกินในหนูแรท เท่ากับ 600-800 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (mg/kg b.w.) ทางผิวหนังใน กระต่าย เท่ากับ 270 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม การศึกษาในหนูแรทโดยให้ทางการหายใจ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 578 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร หรือ 480 ส่วนในล้านส่วน (ppm)⁽²¹⁾

2) ความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ทาง การหายใจ: ฟอร์มาลดีไฮด์ใน รูปก๊าซจะทำให้เกิดการระคายเคืองตา จมูก และระบบทางเดินหายใจ โดยถูกดูดซึมอย่างรวดเร็ว บริเวณปอด เมื่อสูดดมในปริมาณน้อยจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อจมูกและลำคอ มีอาการไอ เจ็บหน้าอก หายใจไม่อึด หากสัมผัสในปริมาณที่สูงขึ้นจะสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบของระบบ ทางเดินหายใจส่วนล่าง ช่องคอพวม เกิดการอักเสบของหลอดลม ปอด และเกิดการสะสมของ ของเหลวในปอด⁽¹⁷⁾ อาการความเป็นพิษขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส

3) ความเป็นพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) IARC จัดฟอร์มาลดีไฮด์อยู่ในกลุ่ม 1 ของ การเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ คือ โรคมะเร็งโพรงจมูก ซึ่งมีสาเหตุจากการสูดหายใจ ฟอร์มาลดีไฮด์เข้าไป ทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีน (DNA-protein crosslink) ในเนื้อเยื่อหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal tissue)⁽¹⁾ การศึกษาในหนูแรทที่ได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ ทาง การหายใจ 17 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมงต่อวัน จำนวน 5 วันต่อสัปดาห์ เป็น เวลา 2 ปี พบว่าเพิ่มอุบัติการณ์การเกิด squamous cell carcinoma ในช่องจมูก⁽³⁾

Yu G-Y⁽²²⁾ อ้างถึงการศึกษาทางระบาดวิทยาและข้อมูลที่ได้จากการทดลอง แสดงให้ เห็นว่าการสัมผัสฟอร์มาลดีไฮด์ในการประกอบอาชีพและจากสิ่งแวดล้อม จะเพิ่มความเสี่ยงของ การเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) ซึ่ง IARC (monographs, 2012) ได้จัดให้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็น สาเหตุให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่กระบวนการเกิดนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเนื่องจากการ เกิดความเป็นพิษต่อระบบเลือด (hematopoietic system) จากภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในไขกระดูก (bone marrow) ที่สร้างเม็ดเลือด ผลกระทบดังกล่าวจึงอาจเป็น สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว

2.1.4.2 ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตจากกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกาย ทั้งที่อาศัยเอนไซม์ และไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง ซึ่งพบได้ดังนี้

1) ในสัตว์ทั่วไป: การสังเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์พบได้บริเวณภายในเซลล์ซึ่งมี ความเข้มข้นถึง 12 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 400 ไมโครโมลาร์ (μM) โดยเกิดออกซิเดทีฟดีแอมิเนชัน (oxidative deamination) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสำคัญของการสร้างฟอร์มาลดีไฮด์ที่อาศัยเอนไซม์เซมิคาร์ บาไซด์-เซนซิทีฟ เอมีน ออกซิเดส (semicarbazide-sensitive amine oxidase; SSAO) เอนไซม์ SSAO มีทองแดงเป็นส่วนประกอบ พบได้ในกล้ามเนื้อหัวใจ กระดูกอ่อน ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ปอด

ตับ ลำไส้ใหญ่ ไต ต่อมหมวกไต และในกระแสเลือด เอนไซม์ SSAO จะทำปฏิกิริยากับเอมีน ได้แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสุดท้ายคือฟอร์มาลดีไฮด์ ขณะที่เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase; MAO) A และ B สามารถสร้างฟอร์มาลดีไฮด์ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ในปฏิกิริยาดีเมทิลเลชัน (demethylation) ของวัฏจักรเมไทโอนิน โฮโมซิสเตอีน (methionine-homocysteine cycles) การใช้หมู่เมทิล (methyl group) นำไปสู่การสร้างฟอร์มาลดีไฮด์ นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาดีเมทิลเลชันของสารอื่นที่ให้ฟอร์มาลดีไฮด์ เช่น ฮิสโตน ดีเมทิลเลชัน (Histone demethylation) ดีเอ็นเอ ดีเมทิลเลชัน (DNA demethylation) อาร์เอ็นเอ ดีเมทิลเลชัน (RNA demethylation) และไมโครโซมอล ไซโตโครมพี 450 ดีเพนเดนท ออกซิเดชัน (microsomal cytochrome P-450 dependent oxidation) เป็นต้น แหล่งอื่นที่สร้างฟอร์มาลดีไฮด์ในร่างกาย คือ one carbon pool เมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (amino acid metabolism) เช่น เซอรีน (serine) ไกลซีน (glycine) เมไทโอนิน (methionine) และ โคลีน (choline) เมแทบอลิซึมของเมทานอล (methanol metabolism) ขบวนการ lipid peroxidation และขบวนการ P-450 dependent demethylation (O-, N-, S-methyl)⁽²³⁾ มีรายงานการศึกษาระดับความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจากการสร้างขึ้นเองภายในร่างกาย มีปริมาณ 2.2, 2.4 และ 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในหนูแรท ลิง และคน ตามลำดับ โดยในคนมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 1-1.5 นาที⁽²⁴⁾

2) ในสัตว์ทะเล: จะมีไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide; TMAO) เป็นสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนแต่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (non-protein nitrogen) ซึ่งเป็นสารที่ป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากตัวสัตว์โดยกลไกทางออสโมซิส ปริมาณความเข้มข้นของ TMAO ที่พบในเนื้อปลาทะเลอยู่ระหว่าง 1-5 % และแปรผันตามชนิด อายุ ขนาด ความเค็มของน้ำทะเล^(25,26) เมื่อสัตว์ทะเลตาย TMAO จะเปลี่ยนไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์โดยผ่าน 3 กระบวนการ ดังนี้

(1) โดยเอนไซม์: เอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกซิเดส (Trimethylamine oxidase: TMAOase) สามารถเปลี่ยน TMAO เป็นไดเมทิลเอมีน (Dimethylamine: DMA) ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine; TMA) และฟอร์มาลดีไฮด์ ปกติ TMAO ที่พบในปลาจะมีปริมาณแตกต่างกัน เช่นเดียวกับ TMAOase ที่มีปริมาณแตกต่างกันในสัตว์ทะเลแต่ละชนิด หรือแม้แต่ชนิดเดียวกัน และจะพบมากในอวัยวะมากกว่าในเนื้อ TMAOase พบได้มากในปลาคอดและปลาหมึก แต่จะพบน้อยในปลาน้ำจืด⁽²⁶⁾

(2) โดยแบคทีเรีย: แบคทีเรียประเภท *alteromonas tetrodonis* และ *putrefaciens* จะเปลี่ยน TMAO ไปเป็น TMA และฟอร์มาลดีไฮด์ ทั้งนี้ TMA ทำให้เกิดกลิ่นคาวซึ่งใช้เป็นดัชนี แสดงถึงความสดของปลาได้ การเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกยับยั้งในสภาพแช่แข็ง ดังนั้นในกระบวนการนี้ฟอร์มาลดีไฮด์จึงเกิดขึ้นได้ไม่มากนัก⁽²⁶⁾

(3) ปัจจัยอื่น : การสลาย TMAO เป็นฟอร์มาลดีไฮด์เพิ่มขึ้นโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร แต่ขณะเดียวกันการเติมสารปรุงแต่ง (additive) บางชนิด เช่น โพลีฟีนอลจากชา (tea polyphenol) แคลเซียมคลอไรด์ (calcium

chloride) กรดซิตริก (citric acid) ไตรโซเดียม ซิเตรท (trisodium citrate) และเรสเวราทรอล (resveratrol) จะทำให้การเปลี่ยนของ TMAO เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ลดลง (25,26)

3) ในพืช: ฟอร์มาลดีไฮด์ในพืชเป็นผลพลอยได้จากการสังเคราะห์แสง ปริมาณที่มีอยู่ในช่วง 0.5-1.0 มิลลิโมลาร์ (mM) ทันทีกที่พืชสังเคราะห์อัลดีไฮด์ขึ้นก็จะไปรวมกับแอล อาร์จินีน (L-arginine) เป็น เอ็นจี ไตรไฮดรอกซีเมทิล แอล อาร์จินีน (N(G)-trihydroxymethyl-L-arginine; TriHMA) เข้าสู่การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไปตามลำดับ และโดยผ่าน 2 กระบวนการ คือ เมทิลเลชัน และดีเมทิลเลชัน ซึ่งเป็นเส้นทางสำคัญการเกิดสารประกอบ เอ็น-เอส-โอ-เมทิลเลท (N-,S-,O-methylated compounds) อันเป็นสารตั้งต้นของฟอร์มาลดีไฮด์ (23)

2.1.4.3 กลไกการทำลายพิษ

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายอาจทำลายเซลล์ได้ เมื่อจับกับดีเอ็นเอ และโปรตีน จึงมีกระบวนการที่ช่วยป้องกันการทำลายเซลล์และการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ โดยกำจัดฟอร์มาลดีไฮด์ผ่านการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส II (alcohol dehydrogenase; ALDH II) และ เอนไซม์อัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส I และ II (aldehyde dehydrogenase; ADH I and II) (23) ส่วนฟอร์มาลดีไฮด์ที่ไม่ถูกกำจัดจะทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายขึ้นได้ จึงมีกระบวนการที่ช่วยซ่อมแซมดีเอ็นเอ เรียกว่า Fanconi system of DNA repair โดยกระบวนการเหล่านี้ทำให้ฟอร์มาลดีไฮด์ถูกกำจัดออกจากร่างกาย และไม่ทำความเสียหายต่อเซลล์ ในกรณีที่กระบวนการดังกล่าวทำงานผิดปกติหรือทำงานไม่สมบูรณ์ จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเกิดพิษต่อร่างกายขึ้นได้ (27)

2.1.5 ความเป็นพิษจากการบริโภค

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เข้าสู่ร่างกาย ผ่านระบบทางเดินอาหาร ส่วนใหญ่มาจากการกินอาหาร และน้ำดื่มที่ปนเปื้อนซึ่งการศึกษาความเป็นพิษทางด้านนี้มีไม่มากนักด้วยเป็นที่ทราบกันว่าการสัมผัสของคนทางการบริโภคมีความสำคัญน้อยกว่าทางการหายใจ ที่อาจก่อมะเร็งโพรงจมูกได้ ผลการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าเฉพาะการบริโภคในปริมาณมากเกินระดับปกติในชีวิตประจำวันเท่านั้นจึงจะมีผลต่อร่างกายที่สามารถบ่งชี้ได้ ความเป็นพิษที่ผ่านการกินมาจากการได้รับ 2 รูปแบบคือ

2.1.5.1 ในน้ำดื่ม

ฟอร์มาลดีไฮด์ละลายได้ดีในน้ำ ส่วนใหญ่พบในรูปเมทิลีนไกลคอล (methylene glycol) และโอลิโกเมอร์ (oligomers) ในสภาวะปกติปริมาณที่พบในน้ำดื่มมีน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นการได้รับสารฟอร์มาลดีไฮด์จากน้ำจึงประเมิน ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อวัน (mg/day) (16)

2.1.5.2 ในอาหาร

ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารพบทั้งในรูปสารอิสระและในรูปที่รวมอยู่กับสารอื่น เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) กรดอะมิโน (amino acid) เอมีน (amine) ครีเอติน (creatine) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นต้น นักวิจัยพบว่าฟอร์มาลดีไฮด์จับกับสารชีวภาพ โดย

พันธะเคมี 3 แบบ คือ รีเวอร์สซิเบิล (reversible bond) แอซิด ลาไบล์ (acid-labile bond) และ แอซิด รีซิสแทนท์ (acid-resistant bond)^(7,28) มีลักษณะดังนี้

1) reversible bond เป็นการเกิดพันธะเคมีที่ผันกลับได้ในรูปของ N - (hydroxymethyl) ระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์และโปรตีนในส่วน ϵ -amino group ของ lysine, α -amino group ของ N-terminal amino acid, guanidyl group ของ arginine และ aromatic ring nitrogen ของ histamine และ tryptophan ฟอร์มาลดีไฮด์ส่วนนี้สามารถแยกได้โดยการแพร่ผ่านเมมเบรน (dialysis) และการสกัด

2) acid-labile bond เป็นการเกิดพันธะเคมี ระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์กับ โปรตีน โดยการเชื่อมกันของไลซีน (lysine) กับอาร์จินีน (arginine) แอสพาราจีน (asparagine) หรือ กลูตามีน (glutamine) โดยหมู่เมทิลีน (methylene bridges) ฟอร์มาลดีไฮด์ส่วนนี้สามารถแยกได้ โดยการกลั่นภายใต้ไอน้ำ (steam distillation)

3) acid-resistant bond เป็นการเกิดพันธะระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์กับโปรตีน เกิดเป็นเมทิลไลซีน (methyl-lysine) ฟอร์มิล ไลซีน (formyl-lysine) และไลซีน ไทโรซีน (lysine-tyrosine) ที่เชื่อมกันด้วยหมู่เมทิลีน (methylene bridges) ฟอร์มาลดีไฮด์ส่วนนี้ สามารถแยกได้ โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.5.3 ผลกระทบจากสารอนุพันธ์ของฟอร์มาลดีไฮด์ (FA- Derivatives)

จากการศึกษาในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งได้รับอาหารที่มีการเติมฟอร์มาลดีไฮด์ เพื่อ ป้องกันแบคทีเรียในกระเพาะ rumen และทำให้โปรตีนเข้าไปสู่ระบบย่อยอาหารได้ดีขึ้น พบว่า อัตราส่วนการกระจายตัวของ FA- Derivatives มี 3 รูปแบบขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ใช้ เติมในอาหารสัตว์ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การได้รับ FA- Derivatives ซ้ำๆ ในปริมาณที่ มาก ทำให้เกิดความสามารถของเมทาบอลิซึมในร่างกายที่จะเปลี่ยน ฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็น กรดฟอร์มิก และ คาร์บอนไดออกไซด์ ได้หมดจึงเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้⁽¹⁸⁾

การเติมฟอร์มาลดีไฮด์ และ เฮกซามีนเทตราซีน ในการผลิตเนยแข็ง เพื่อฆ่า เชื้อแบคทีเรียและป้องกันรุกรานที่เกิดจากแก๊ส ซึ่งแบคทีเรียบางกลุ่มสร้างขึ้นทำให้เนยแข็งแตก ในการ ผลิตจะเติมให้มีปริมาณ 15-25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการศึกษายืนยันว่า ภายใน 3 เดือน free-FA จะหายไปอย่างรวดเร็วในระหว่างการบ่มเนยแข็ง กลายเป็น FA- Derivatives ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติมใน นม ไม่มีผลกระทบต่อการบ่มหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของผลผลิต และเมื่อนำไปทดลองเลี้ยง สัตว์ก็ไม่มีผลที่แตกต่างจากการเลี้ยงด้วยเนยแข็งที่ไม่ผ่านการเติมฟอร์มาลดีไฮด์ เมื่อทำการศึกษาโดย นำเนยแข็งที่ผ่านการบ่มด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ ที่ติดสารรังสี ^{14}C -FA ไปเลี้ยงหนูแรทเพื่อติดตามเมทาบอลิซึมในร่างกาย ผลการศึกษาพบว่าฟอร์มาลดีไฮด์ ร้อยละ 63-67 จะถูกกำจัดไปทางอุจจาระและ ปัสสาวะ ภายใน 32 ชั่วโมง ร้อยละ 24-28 จะถูกกำจัดไปทางลมหายใจในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีครึ่งชีวิต ประมาณ 27 ชั่วโมง และไม่มีการสะสมของสารในอวัยวะใดๆ ภายใน 32 ชั่วโมง แต่อาจพบการตกค้างของสารที่อยู่ในเคซีนบ้างจากการที่ย่อยได้ไม่สมบูรณ์ การศึกษาความเป็น พิษจากการได้รับ spinacine ซึ่งเป็น cyclic derivative ของ ฮีสติดีนกับฟอร์มาลดีไฮด์ โดยการฉีด

สารนี้ให้กับหนูเม้าท์ที่ระดับ 5 มิลลิกรัม ไม่มีผลกระทบใด และไม่มีผลกระทบใดในการให้สารนี้กับกลุ่มหนูแรท โดยการป้อนเข้าช่องท้อง (gavage) ในช่วงความเข้มข้น 0-5000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเช่นกัน การศึกษาความเป็นพิษช่วงสั้น ของ spinacine โดยการให้อาหารที่ผสมสารในระดับ 0 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (คำนวณได้เป็น 0 - 1000 เท่าของคนน้ำหนัก 70 กิโลกรัม กิน Grana Padano cheese 100 กรัมต่อวัน) ผลการศึกษาพบว่าไม่มีผลกระทบต่อการรอดชีวิต การเจริญเติบโต หรือการกินอาหารของสัตว์ทดลอง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดอวัยวะต่างๆ รวมทั้งระบบเลือด สรุปค่า no-effect dose เป็น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ⁽¹⁸⁾

ผลการศึกษาความเป็นพิษจากการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ผ่านทางกรกิน สรุปได้ว่า โดยระบบทางเดินอาหารเป็นเส้นทางการได้รับที่น้อยมากเนื่องจากมีการเจือจางสารที่มาจากปัจจัยต่างๆ อีกทั้งฟอร์มาลดีไฮด์จะรวมกับสารอื่นๆ ที่มีโมเลกุลใหญ่ ทำให้ลดสารอิสระที่จะไปสัมผัสกับอวัยวะในระบบย่อยอาหารได้

2.1.6 การประเมินการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์จากการบริโภค

เมื่อบริโภคฟอร์มาลดีไฮด์เข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร รวมเข้ากระบวนการที่เกิดฟอร์มาลดีไฮด์ทั้งหมดในร่างกาย และจะออกซิไดส์ไปเป็นกรดฟอร์มิกอย่างรวดเร็ว จากนั้นจะเข้าสู่ระบบ one-carbon pool และจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ European Food Safety Authority (EFSA) ประเมินการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์จากปริมาณที่พบได้ในธรรมชาติของอาหารทั้งพืชและสัตว์ ประมาณ 1.7-1.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (mg/kg b.w./day) สำหรับคนน้ำหนัก 60-70 กิโลกรัม ⁽²⁴⁾ ก่อนหน้านั้นในปี 2006 EFSA ได้สรุปว่าไม่มีหลักฐานแสดงว่าฟอร์มาลดีไฮด์จากการบริโภคทำให้เกิดมะเร็ง ขณะที่ European Commission (EC) ประเมินค่าการได้รับอยู่ในช่วง 4.35 - 41.9 มิลลิกรัมต่อคนต่อวัน คำนวณจากค่าต่ำสุดและสูงสุดที่มีในอาหารจากข้อมูลที่มีการสำรวจไว้ ซึ่งนม เนื้อ และปลาเป็นอาหารที่มีอัตราส่วนการบริโภคสูง ⁽²⁹⁾

EFSA (ปี ค.ศ.2014) มีข้อคิดเห็นสรุปไว้ดังนี้ ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และมีความเข้มข้นประมาณ 400 ไมโครโมลาร์ (12 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาจากการสังเคราะห์ขึ้นเองภายในเซลล์ ซึ่งมาจากกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้ one carbon pool เมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน เมแทบอลิซึมของเมทานอล ขบวนการ lipid peroxidation และขบวนการ P450 dependent demethylation เมแทบอลิซึมของฟอร์มาลดีไฮด์ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ถูกเร่งโดยเอนไซม์ในร่างกายให้กลายเป็นกรดฟอร์มิก และจะเข้าสู่ one carbon pool แล้วจะถูกขับออกในรูปปัสสาวะ หรือกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาทางลมหายใจ ด้วยคุณสมบัติที่นำไฟฟ้าทำให้ฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ภายในร่างกายได้ เช่น กลูตาไธโอน โปรตีน กรดนิวคลีอิก และกรดโฟลิก ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ทั้งหมดที่มีอยู่ในร่างกายมนุษย์ประเมินโดยสมมติให้มีอยู่ในของเหลวทั้งหมด ที่มีปริมาตร 42 และ 49 ลิตรสำหรับผู้ใหญ่ น้ำหนัก 60 และ 70 กิโลกรัม ตามลำดับ ตามคุณสมบัติของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ละลายได้ดีในน้ำ และมีค่าครึ่งชีวิต 1-1.5 นาที คำนวณได้ปริมาณที่มีอยู่ในร่างกายเท่ากับ 1.82 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยใช้สภาวะเสถียรที่ 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะมีค่าของการหมุนเวียน (turnover) ที่ 0.61-0.91 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว

1 กิโลกรัมต่อน้ำหนัก (mg/kg b.w./min) หรือ 878-1,310 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เพื่อ
 ความสะดวกของฟอรัมาลดีไฮด์ไว้ที่ 2.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในกระแสเลือด ⁽²⁴⁾

2.1.7 เกณฑ์ความปลอดภัย และค่าที่กำหนดตามกฎหมายในอาหารและน้ำดื่ม

2.1.7.1 เกณฑ์ความปลอดภัย

1) U.S. EPA กำหนดค่าขนาดของสารที่ยอมรับให้บริโภคได้ต่อวันแล้วไม่
 ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือผลเสียใด ๆ ต่อร่างกาย (Reference dose; RfD) ไว้ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม
 ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ⁽²⁾

2) World Health Organization; WHO กำหนดค่าปริมาณได้รับประจำวัน
 ที่ทนได้ (Tolerable daily intake; TDI) ไว้ไม่เกิน 0.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ⁽³⁾

3) The Food Safety Commission of Japan; FSCJ (FS/42/2008)
 กำหนดค่า TDI ในอาหารและน้ำดื่มไว้ที่ 15 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (0.015
 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน) ⁽³⁰⁾

2.1.7.2 ค่าที่กำหนดตามกฎหมาย

1) European Commission Directive (95/2/EC) กำหนดค่าฟอรัมาลดีไฮด์
 ตกค้างในเนยแข็งไว้ไม่เกิน 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽³¹⁾

2) Italian Health Department ประเทศอิตาลี กำหนดค่าฟอรัมาลดีไฮด์ที่ให้
 มีได้ในปลาสดไว้ ไม่เกิน 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่มีเปลือก ไม่เกิน 10
 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽⁷⁾

3) Chinese Ministry of agriculture ประเทศจีน กำหนดค่าฟอรัมาลดีไฮด์ที่
 ให้มีได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลไว้ ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽⁸⁾

4) Ministry of Health; MOH. Chinese National Standard ประเทศจีน
 กำหนดค่าฟอรัมาลดีไฮด์ที่ให้มีได้ในน้ำดื่ม และในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ไว้ ไม่เกิน 0.9 และ
 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ^(32, 33)

5) China Quality Inspection Administration ประเทศจีน กำหนดค่า
 ฟอรัมาลดีไฮด์ที่ให้มีได้ (ชั่วคราว) ในเห็ดสดและแห้งไว้ ไม่เกิน 63 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
 ตามลำดับ ⁽⁷⁾

6) Malaysian Food Regulation ประเทศมาเลเซีย กำหนดค่าฟอรัมาลดีไฮด์
 ที่ให้มีได้ในปลาและผลิตภัณฑ์ไว้ ไม่เกิน 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽³⁴⁾

2.2 ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหาร

ในอาหารอาจมีฟอรัมาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ จากการรวมเพื่อฆ่าแมลง จากการปรุง
 อาหาร หรือมาจากภาชนะบรรจุที่ทำจากเรซินที่มีฟอรัมาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ ในเนยบางชนิด

มีการใช้เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย ฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบได้ในอาหารตามธรรมชาติ พบน้อยสุดในนมสด คือ $0.03 - <1$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบในอวัยวะของหมู ได้แก่ ตับ ไต และเนื้อ มีปริมาณ 11.8 ± 0.17 , 8.75 ± 0.28 และ 6.24 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในแฮมที่ทำจากหมู และไก่วง $2.9-4.6$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในไส้กรอก $10-20.7$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในแฮมรมควันมีปริมาณสูงถึง $224-267$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽²⁴⁾

ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาจะพบสูงกว่าอาหารประเภทอื่น มีรายงานว่าในกลุ่มปลา *Gadidae* เช่น ปลาแฮค (hake) ปลาแฮคตัด (haddock) และปลากระบอก (mullet) พบฟอร์มาลดีไฮด์ตั้งแต่ 6.4 ± 1.2 ถึง 293 ± 26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽³⁵⁾ ในอาหารประเภทผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล และแครรอต พบอยู่ในช่วง $6.3-6.8$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในแตงโม แอปริคอต มะเขือเทศ กัลย และมันฝรั่ง พบฟอร์มาลดีไฮด์เท่ากับ 9.0, 9.5, 13.3, 16.3 และ 19.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ กลุ่มผัก เช่น กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี และบรอกโคลี พบฟอร์มาลดีไฮด์เท่ากับ 26.9, 31 และ 35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ⁽²⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีข้อมูลปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบในอาหารประเภทต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.2

2.2.1 ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่สะสมในนม เลือด อวัยวะ และเนื้อสัตว์

การศึกษาในวัวที่ให้หางนมเป็นอาหาร ซึ่งมีฟอร์มาลดีไฮด์ 0.05, 0.10 และ 0.15 % เมื่อเลี้ยงวัวได้ 33 วัน พบฟอร์มาลดีไฮด์ในเลือดของวัวที่ได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ (ระดับ 0.15 %) สูงกว่าวัวในกลุ่มควบคุม ขณะที่พบฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อลูกวัวสด ที่ได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ (ระดับ 0.10 %) สูงกว่าเนื้อลูกวัวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ที่ระดับ 0.05 % อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลที่มีนัยสำคัญ ในส่วนของเลือด เนื้อแช่แข็ง ไต ตับ และหัวใจ ⁽³⁶⁾ การใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารสัตว์ที่ปริมาณ 200 ถึง 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถป้องกันการเน่าเสียของอาหารจากแบคทีเรียได้ EFSA อ้างถึงการศึกษาระยะยาว (12 เดือน) โดยการเลี้ยงวัวด้วยอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ 1 กรัมต่อวัน (จากถั่วเหลืองที่เติมฟอร์มาลีน) พบว่ามีฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อเพิ่มขึ้นเป็น 0.167 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากเดิมที่มี 0.065 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยการศึกษาที่จำกัดนี้อาจสรุปได้ว่า มีการตกค้างของฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อ และน้ำนมของวัวได้เมื่อให้อาหารที่มีการเติมฟอร์มาลดีไฮด์ อย่างไรก็ตามปริมาณที่พบไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽¹⁰⁾ ซึ่งน้อยกว่าค่าที่พบตามธรรมชาติของอาหารอื่น

ตารางที่ 2.2 ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ที่พบในอาหารประเภทต่างๆ ^(9, 19)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ผลิตภัณฑ์ที่พบ สูงสุด
เนื้อสัตว์ (เนื้อทำแซนวิช เนื้อดัดเย็น แฮม ไส้กรอก แฮมรมควัน)	2.5-267	แฮมรมควัน
นมและผลิตภัณฑ์นม (นมแพะ นมวัว นมสด นมปรุงแต่ง ชีส)	0.041-3.3	ชีส
อาหารทะเล		
- ปลา	6.4-293	ปลาทะเลน้ำลึก
- Crustaceans (กุ้ง กั้ง ปู)	1-98	แช่แข็ง (deep frozen hake)
- ปลาหมึกสด	0.26-19.7	
- ปลาหมึกแห้งฉีก	0-169.6	
ผลไม้และผัก (แอปเปิ้ล แครรอต แตงโม แอปปริคอต มะเขือ เทศ ถั่วฝักยาว มันฝรั่ง กะหล่ำปลี บัทรูด ลูกแพร์ หัวหอม ผักกาดหัว เห็ดชิตาเกะ)	6.3-406	เห็ดชิตาเกะ (เห็ดหอม)
กาแฟ (กาแฟพร้อมดื่ม กาแฟผงสำเร็จรูป)	3.4-16.3	กาแฟผงสำเร็จรูป
เครื่องดื่ม (ผสมแอลกอฮอล์ ไม่ผสมแอลกอฮอล์ เบียร์)	0.02-8.7	เครื่องดื่มไม่ผสม แอลกอฮอล์ (soft drink)
น้ำตาลและสารให้ความหวาน	0.75	-

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหารทั่วไป (ในรายงานประจำปีงบประมาณ 2555-2557) จำนวน 72 ตัวอย่าง มีอาหาร 10 ชนิด และ น้ำแช่อาหาร ไม่ผ่านเกณฑ์ (ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ห้ามใช้ฟอรัมาลดีไฮด์ ในอาหาร) 14 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้ประกอบด้วย ปลาหมึกกรอบ ปลาหมึกสด เครื่องใน และน้ำแช่อาหาร พบสูงเกิน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในปลาหมึกกรอบ (260 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และเครื่องใน (251 และ 195 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)⁽³⁷⁾ และต่อมา ในปี 2559

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่งทั่วประเทศ ร่วมกับสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและกรุงเทพมหานคร จัดทำโครงการสำรวจการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารโดยใช้ชุดทดสอบ ตรวจน้ำที่แช่อาหาร และอาหารกลุ่มเสี่ยงที่จะมีการปนเปื้อนหรือมีโอกาสนำฟอร์มาลดีไฮด์มาใช้ในทางที่ผิด เช่น ปลาหมึกสด ปลาหมึกกรอบ สไลนาง เป็นต้น เก็บตัวอย่างจากตลาดสด ตลาดค้าส่ง ตลาดนัด รถเร่ ฯลฯ โดยวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้สถานการณ์ความเสี่ยงที่เป็นปัจจุบัน เพื่อวางแผนแนวทางการบริหารจัดการแก้ไขปัญหาได้อย่างเหมาะสม ซึ่งจากผลการตรวจเฝ้าระวังพบว่า ปลาหมึกกรอบ พบร้อยละ 48 สไลนางขาว พบร้อยละ 42 ปลาหมึกสด พบร้อยละ 10 และสไลนางดำ พบร้อยละ 8 ดังตารางที่ 2.3 สำหรับตัวอย่างอาหารอื่นๆ ตรวจไม่พบฟอร์มาลดีไฮด์

ตารางที่ 2.3 ผลการตรวจเฝ้าระวังฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารกลุ่มเสี่ยงทั่วประเทศโดยใช้ชุดทดสอบ ในช่วงเดือนธันวาคม 2558 - กุมภาพันธ์ 2559 ⁽¹¹⁾

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	
	ทั้งหมด	พบฟอร์มาลดีไฮด์ (ร้อยละ)
ปลาหมึกกรอบ	268	130 (48)
สไลนางขาว	263	111 (42)
ปลาหมึกสด	739	74 (10)
สไลนางดำ	71	6 (8)
เครื่องในรวม	9	0
เส้นมือนาง	35	0
กุ้ง กุ้ง ปู หอย	157	0
แมงกะพรุน	14	0
ปลา	87	0
เนื้อวัว	1	0
เนื้อไก่	1	0
ผัก (ถั่วงอกยาว ผักกาดหอม ขึ้นฉ่าย	14	0
ชะอม ผักชี)		
เห็ด	6	0
รวม	1,666	321 (19)

2.2.3 ฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึก

เว็บไซต์ ปศุสัตว์. คอม ⁽³⁸⁾ ให้รายละเอียดเกี่ยวกับปลาหมึกไว้ดังนี้ ปลาหมึก (Cuttlefish, Octopus) เป็นสัตว์ทะเลที่มีลำตัวนิ่ม ไม่มีกระดูกสันหลัง มีเปลือกแบนอยู่กลางลำตัว เพื่อให้คงรูปร่างได้ (บางชนิดไม่มีเปลือก) มีระยะยางค์หรือที่เรียกทั่วไปว่าหนวด รอบปาก 8-10 เส้น ปาก เป็นปากดูดที่มีปุ่มดูด (sucker) ช่วยในการจับ และยึดเกาะ ปลาหมึกจัดอยู่ในไฟลัม Mollusca คลาส Cephalopoda ที่เป็นคลาสที่มีพัฒนาการสูงสุดในไฟลัมนี้ แบ่งย่อยได้ 2 คลาส คือ

1) ชั้นคลาส Nautiloidea หรือ Tetrabranchina มีลักษณะประจำชั้นคลาส คือ มีระยะยางค์รอบปาก 10 เส้น มีเหงือก 2 คู่ ไม่มีกระดูกตา

2) ชั้นคลาส Coleoidea หรือ Dibranchina มีลักษณะประจำชั้นคลาส คือ มีระยะยางค์รอบปาก 8-10 เส้น มีเหงือก 1 คู่ มีกระดูกตา มีเปลือกอยู่ภายในลำตัว แต่บางชนิดไม่มีเปลือก

ชนิดปลาหมึกตามลักษณะรูปร่าง

1) ปลาหมึกกล้วย (squid) ปลาหมึกกล้วยมีลักษณะลำตัวค่อนข้างยาว มีครีบก้นไปด้านท้ายลำตัว มีระยะยางค์ล้อมรอบปาก ประกอบด้วยระยะยางค์สั้นที่เป็นแขน 4 คู่ มีปุ่มดูดที่ประกอบด้วย chitinous ring ซึ่งจะพบบนแขนจำนวน 2-4 แถว แต่บางชนิดอาจพบมีตะขอ (hook) มีระยะยางค์ยาวที่เรียกว่า หนวด (tentacle) 1 คู่ บนหนวดมีปุ่มดูด 2 แถว หรือมากกว่า

2) ปลาหมึกกระดอง (cuttlefish) ปลาหมึกกระดอง เป็นปลาหมึกที่มีลักษณะแบนกว้าง คล้ายถาด มีกระดองสีขาวขุ่น มีครีบบนข้าง หากมีครีบลอดลำตัวจัดเป็น sepiidae หากมีครีบล้นกลม จัดเป็น sepiolidae ปลาหมึกกระดองมีระยะยางค์เหมือนปลาหมึกกล้วย มีแขน 4 คู่ หนวด 1 คู่ แต่ไม่มีตะขอ

3) ปลาหมึกสาย (octopus) ปลาหมึกสาย มีลักษณะลำตัวกลม คล้ายถาด ไม่มีครีบก้น มีระยะยางค์ รอบปาก 4 คู่ ปุ่มดูดไม่มี chitinous ring เหมือนปลาหมึกกล้วย

ปลาหมึกที่จำหน่ายในท้องตลาดมีทั้งที่จับได้จากทะเลภายในประเทศ และนำเข้าจากต่างประเทศ ปลาหมึกที่มีการจับในทะเลของอ่าวไทย และทะเลอันดามันทางฝั่งพม่า ได้แก่ ปลาหมึกกล้วย ปลาหมึกกระดอง และปลาหมึกสาย ซึ่งปริมาณการจับของปลาหมึกกล้วย และปลาหมึกกระดองมีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนปลาหมึกสายพบปริมาณการจับน้อยที่สุด มีการนำเข้าปลาหมึกมาจากหลายประเทศเพื่อการบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ปลาหมึกแช่เย็น ปลาหมึกแช่แข็ง ปลาหมึกแห้ง ปลาหมึกกระป๋อง รายงานการศึกษาในระหว่างปี พ.ศ. 2556-58 พบว่ามีการนำเข้าส่งออกปลาหมึกทั้งหมด 6 กลุ่ม 25 ชนิด ได้แก่ กลุ่มปลาหมึกกระดอง 4 ชนิด กลุ่มปลาหมึกกล้วย 10 ชนิด กลุ่มปลาหมึกกล้วยยักษ์ 3 ชนิด กลุ่มปลาหมึกสาย 3 ชนิด กลุ่มปลาหมึกสายยักษ์ 4 ชนิด และกลุ่มปลาหมึกหอม 1 ชนิด โดยมีปริมาณการนำเข้ารวมทั้งสิ้น 452,094.53 ตัน มูลค่ารวม 35,337.86 ล้านบาท ปริมาณเฉลี่ย 150,698.18 ตันต่อปี มูลค่าเฉลี่ย 11,779.29 ล้านบาทต่อปี โดยในปี พ.ศ. 2556 มีการนำเข้าปลาหมึกกล้วยแช่แข็ง จากประเทศจีนมากที่สุด ⁽³⁹⁾

2.2.3.1 ปัจจัยที่ทำให้เกิดฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึก

ปลาหมึกเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่ในทะเล น้ำเค็ม มี TMAO เพื่อป้องกันการสูญเสีย น้ำออกจากตัวโดยกลไกทางออสโมซิส เช่นเดียวกับสัตว์ทะเลอื่นๆ TMAO เป็นสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนแต่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (non-protein nitrogen) ปริมาณความเข้มข้นของ TMAO แปรผันตามปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์และการดำรงชีวิต Seibel BA และ Walsh PJ ⁽⁴⁰⁾ รายงานปริมาณ TMAO ของหมึกต่างกลุ่ม และสปีชีส์ ตั้งแต่ 0 - 377 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม (mmol/kg) ซึ่งสัมพันธ์ กับ ชนิด ปริมาณไขมัน ปริมาณสารชีวเคมี และเมตาบอริซึม แหล่งที่อยู่อาศัย การอพยพ ย้ายถิ่น อายุ ขนาด อวัยวะ เช่น กลุ่มหมึกน้ำลึก สปีชีส์ *Moroteuthis robusta* และ *Gonatopsis borealis* จะมี TMAO ปริมาณสูง เนื่องจากอาศัยอยู่ในสภาวะที่มีความกดดันอากาศสูง TMAO เป็นสารตั้งต้นที่จะเปลี่ยนไปเป็น DMA และฟอร์มาลดีไฮด์ ในอัตราส่วนที่เท่ากันด้วยกลไกทั้งทางชีวภาพและกายภาพ ผ่านกระบวนการ 3 กระบวนการเช่นเดียวกับสัตว์ทะเลอื่นที่กล่าวมาแล้ว คือ โดยเอนไซม์แบคทีเรีย และความร้อน มีการศึกษาพบว่าหมึก *Illex argentinus* เป็นเวลา 45 นาที พบทั้ง DMA และฟอร์มาลดีไฮด์เพิ่มขึ้นถึง 18 และ 2 เท่าตามลำดับ ⁽⁴¹⁾

2.2.3.2 ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึก

Zhang X และคณะ⁽⁴²⁾ วิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก และปลา bummalo ที่วางจำหน่ายในตลาดเมืองเชียงใหม่ พบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ในปลาหมึกอยู่ในช่วง 15.1 - 146 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย 42.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลา bummalo อยู่ในช่วง 17.5 - 374 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย 164 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อเก็บในสภาวะแช่แข็งเป็นเวลา 20 วัน และ 3 เดือน จะพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึกในอัตราเฉลี่ย 649% และ ในปลา bummalo ในอัตราเฉลี่ย 523% ผู้วิจัยสรุปว่าฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีทั้งในปลาหมึก และปลา bummalo เกิดขึ้นภายในตัวสัตว์ตั้งแต่วางจำหน่ายในตลาด หรือจากเรือประมง และจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บแช่แข็ง ในประเทศจีนมีการศึกษา ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึกแช่แข็งและปลาหมึกแห้งฉีก จำนวน 4 สายพันธุ์คือ *Dosidicus gigas*, Japanese Ocean, *Illex argentinus* และ North Pacific Ocean ผลการศึกษาพบว่า มีความแตกต่างของระดับฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึกทั้ง 4 สายพันธุ์ และพบปริมาณสูงในอวัยวะภายในมากกว่าบริเวณกล้ามเนื้อ ส่วนปลาหมึกแห้งฉีกซึ่งทำมาจากเนื้อปลาหมึก 2 สายพันธุ์จะพบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์สูงกว่าเนื้อปลาหมึกสด ดังตารางที่ 2.4 ในการศึกษาที่ผู้วิจัยอธิบายว่า ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบมีค่าแตกต่างกันนั้น เป็นความแตกต่างจากระดับของ TMAO ที่มีอยู่ในปลาหมึกแต่ละสายพันธุ์ และจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เปลี่ยน TMAO ไปเป็น DMA และฟอร์มาลดีไฮด์ นอกจากนี้มีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ เช่น ขนาดของปลาหมึก คุณภาพของอาหารที่กิน บริเวณที่พบ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นอิทธิพลของระดับ TMAO ในปลาหมึก ปริมาณ

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบในการศึกษานี้มีค่าเกินจากค่าที่กำหนดโดยกระทรวงเกษตรแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (Ministry of Agriculture in China) ในปี 2002 ซึ่งกำหนดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในสัตว์น้ำไว้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ⁽⁴³⁾

ตารางที่ 2.4 ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อและอวัยวะภายในของปลาหมึกต่างสายพันธุ์ ⁽⁴³⁾

สายพันธุ์	*ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	กล้ามเนื้อ	อวัยวะภายใน	ปลาหมึกแห้งฉีก
<i>Dosidicus gigas</i>	17.3±1.62	165±15.2	35.3±1.92
<i>Japanese Ocean</i>	10.7±0.16	42.2±1.52	34.4±0.81
<i>Ilex argentinus</i>	19.7±0.58	412±59.6	-
<i>North Pacific Ocean</i>	10.9±0.22	119±11.2	-

* mean ± SD from n=6, – Not determined

2.2.4 ฟอร์มาลดีไฮด์ในสโบนาง

สโบนางคือส่วนของกระเพาะวัว ซึ่งเป็น กระเพาะห้องแรกเรียกว่า รูเมน (Rumen) หรือ ผ้าขี้ริ้ว หรือสโบนาง หรือสามสิบกลีบ ส่วนนี้เป็นกระเพาะที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีผนังยื่นออกมาเพื่อทำหน้าที่หมักอาหารด้วยจุลินทรีย์ประเภทที่ย่อยสลายโปรตีนจากพืชที่วัวกินเข้าไป และยังสามารถสารถอาหารออกมาเคี้ยวเอื้องเพื่อบดเส้นใยให้ละเอียด ก่อนจะส่งต่อไปยังกระเพาะห้องต่อไป สโบนางเป็นส่วนที่นิยมนำมาทำอาหารหลายอย่าง ปกติจะมีสีดำ การทำให้สโบนางเปลี่ยนจากสีดำเป็นสีขาวจะใช้วิธี ล้างให้สะอาดแล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นๆ นำไปลวกพอสุก ตักขึ้นพอให้หายร้อน นำมิดมาชุบส่วนที่เป็นสีดำออก ก็จะได้สโบนางสีขาวไปทำอาหารต่อได้

การตกค้างของฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์มีข้อมูลไม่มากนัก Buckley KE และคณะ⁽³⁶⁾ พบว่าฟอร์มาลดีไฮด์ในเนื้อและอวัยวะของวัวตามธรรมชาติ มีปริมาณน้อยอยู่ในช่วง 0.133-3.623 ไมโครกรัม/กรัม รายงานผลการตรวจสอบระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2553 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2556 โดยหน่วยตรวจสอบเคลื่อนที่เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร (Mobile Unit For Food Safety) ในเขตบริการสุขภาพที่ 7 และ 8 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ยังคงพบฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารสด อาหารที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ สโบนาง ปลาหมึกกรอบ และปลาหมึกสด ตามลำดับนอกจากนี้จากผลการตรวจของหน่วยเคลื่อนที่เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร เขตภาคเหนือตอนบน ซึ่งได้ดำเนินการตรวจสอบอาหารใน 7 จังหวัดภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน พะเยา แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ และน่าน ในปีงบประมาณ 2556-2558 พบการปนเปื้อน

ฟอร์มาลดีไฮด์ในสไลม์ร้อยละ 14.2, 17.2 และ 26.7 ตามลำดับ⁽⁶⁾ สมัชชาสุขภาพจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์รายงานสถานการณ์ปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ ในสไลม์ ระหว่างปี 2555-2558 พบร้อยละ 23.09, 23.86 และ 23.17 ตามลำดับ ซึ่งพบเป็นลำดับ 2 ของอาหารที่มีการปนเปื้อน ฟอร์มาลดีไฮด์⁽⁴⁴⁾ นพ.สุวรรณชัย วัฒนายิ่งเจริญชัย รองปลัดกระทรวงสาธารณสุข และโฆษก กระทรวงสาธารณสุขกล่าวในหนังสือพิมพ์นิวริยแปด รายการภัยอาหารปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ วันที่ 30 กันยายน 2559 ว่าจากการคุมเข้มแก้ไขปัญหการปนเปื้อนสารเคมีในอาหาร เช่น ยาฆ่าแมลง บอแรกซ์ สารฟอกขาว สารฟอร์มาลดีไฮด์ในรอบปีที่ผ่านมาพบว่า ยังมีการปนเปื้อนสารฟอร์มาลดีไฮด์ มากในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะ สไลม์ หรือ ผ้าขี้ริ้ว ตรวจพบในตัวอย่างที่เก็บมาตรวจ วิเคราะห์ถึงร้อยละ 95.49⁽⁴⁵⁾

กนกพร ธีรมณีนสิน⁽⁶⁾ รายงานว่าสไลม์ที่ปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ผลิตจากสไลม์แห้งแห้งซึ่งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศที่ผ่านด่านท่าเรือและนำมาพักที่ห้องเย็น การผลิตทำโดย แช่น้ำ ผสมโซดาไฟ 2-3 วันหลังจากนั้นเทน้ำออกแล้วผสมน้ำแข็งและ ฟอร์มาลีนที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม ที่มีความเข้มข้นสูงและต้นทุนถูกกว่าฟอร์มาลีนที่ใช้ในทางการแพทย์ แช่ไว้ 1 ชั่วโมง คุณสมบัติของ ฟอร์มาลีนซึ่งเป็น สารคงสภาพเนื้อเยื่อทำให้โปรตีนแข็งตัวและช่วยชะลอการเสียของอาหารสด ทำให้ สไลม์อยู่ในสภาพที่สดและกรอบ นอกจากนั้นสไลม์จะมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นด้วย จากการแช่น้ำ ทำให้สามารถเพิ่มกำไรในการขาย

2.3 วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร

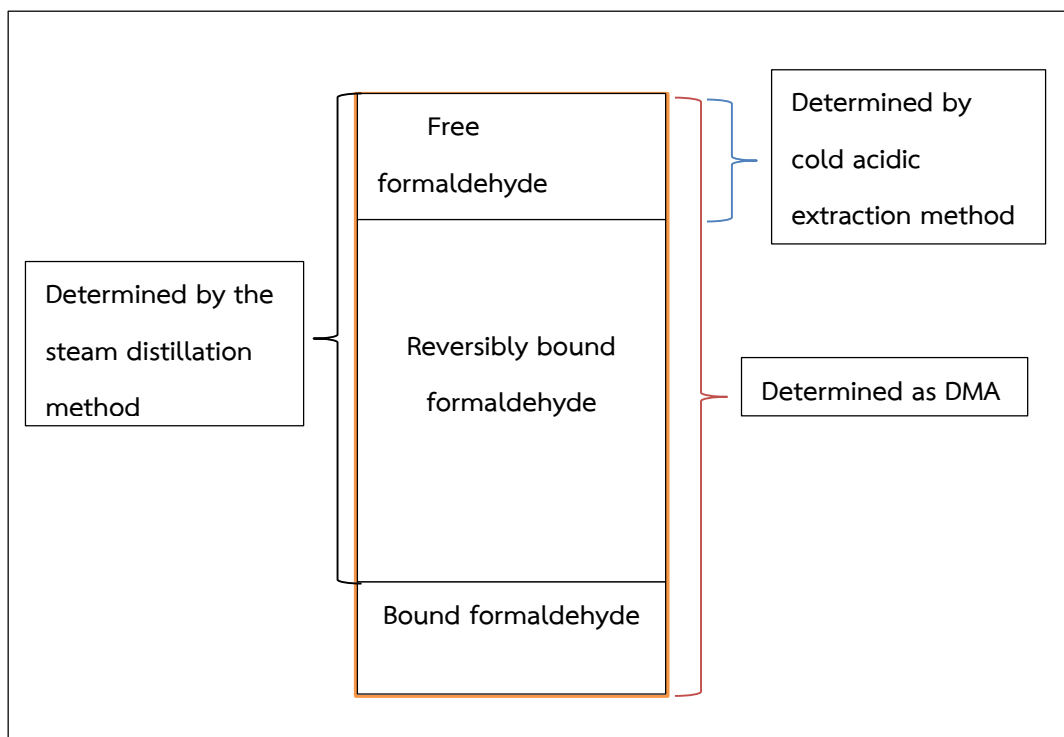
วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารประกอบด้วย 2 ขั้นตอนสำคัญคือการแยกฟอร์มาลดีไฮด์ ออกมาจากอาหาร และการตรวจวัดปริมาณ โดยอาศัยเทคนิคต่าง ๆ ซึ่งมีความไว ความถูกต้อง แม่นยำ ความรวดเร็ว ข้อดี ข้อเสีย ความเหมาะสมต่อชนิดและสถานการณ์ของตัวอย่างแตกต่างกันไป

2.3.1 การแยกฟอร์มาลดีไฮด์ออกจากอาหาร

เป็นขั้นตอนการเตรียมสารให้สะอาด และมีความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อการวัดปริมาณ ในขั้นต่อไป ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารอาจมีทั้งในรูป free-FA และ bound-FA ซึ่งพันธะเคมีในส่วนนี้ มี 3 ลักษณะคือรีเวอร์สซิเบิล (reversible bond) แอซิด ลาไบล์ (acid-labile bond) และ แอซิด รีซิสแทนท์ (acid-resistant bond) การตรวจวิเคราะห์จะตรวจได้ 2 แบบ คือ ตรวจวัด free-FA และ ฟอร์มาลดีไฮด์ทั้งหมด (total-FA) ซึ่งรวมทั้ง 2 แบบของฟอร์มาลดีไฮด์ (รูปที่ 2.1) ดังนั้นหากมี วัตถุประสงค์ เพื่อวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือการเตรียม ตัวอย่างเพื่อแยกฟอร์มาลดีไฮด์ออกจากอาหาร โดยใช้วิธีที่แตกต่างกันดังนี้

2.3.1.1 เพื่อการวิเคราะห์ free-FA จะทำการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย เช่น น้ำ หรือสารละลายกรด โดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonicate) เขย่า (shaker) การแพร่ (dialysis) หรือปั่น (homogenize) เพื่อให้ฟอร์มาลดีไฮด์แยกออกมาจากตัวอย่าง ละลายลงสู่ตัวทำละลาย แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิคที่เหมาะสมต่อไป ข้อเสียคือ โดยวิธีสกัดตัวอย่างอาจไม่สามารถกำจัดสารรบกวนออกไปได้หมด ต้องมีขั้นตอนแยกสารรบกวนออกไปเพื่อลดปัญหาในช่วงการวัด

2.3.1.2 เพื่อการวิเคราะห์ total-FA (free-FA รวมกับ bound-FA) เตรียมตัวอย่างโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เพื่อแยกฟอร์มาลดีไฮด์ทั้ง free-FA และ bound-FA ส่วน reversible bond ออกมาจากตัวอย่าง และนำไปตรวจวัดปริมาณ แต่ในส่วน acid-resistant bond นั้นจะไม่สามารถแยกออกมาได้ ดังนั้น ปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากการกลั่นจึงไม่ได้เป็นปริมาณรวมทั้งหมดที่แท้จริง ซึ่งการวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ทั้งหมดในทางปฏิบัติทำได้ไม่ง่าย ต้องใช้วิธีการอื่นเช่น Nuclear magnetic resonance (NMR) ⁽⁷⁾ โดยทฤษฎี total-FA อาจคำนวณได้มาจากปริมาณ DMA ที่วิเคราะห์ได้ ⁽⁴⁶⁾ ซึ่งกล่าวว่าเมื่อ TMAO แตกตัวจะได้ฟอร์มาลดีไฮด์และ DMA ในหน่วยโมลที่เท่ากัน โดยวิธีการกลั่นตัวอย่างเป็นการกำจัดสารรบกวนได้ดี แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน และความร้อนภายใต้สภาวะที่มีสารละลายกรดจะไปกระตุ้นให้เกิดการแตกตัวของสารอื่นออกมาเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ได้ ทำให้ผลที่ได้มีค่าสูงเกินความเป็นจริง อีกทั้งผลวิเคราะห์มีความแปรปรวนที่ควบคุมยาก



ภาพที่ 2.1 วิธีวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ตามรูปแบบของสารที่มีอยู่ในเนื้อปลา

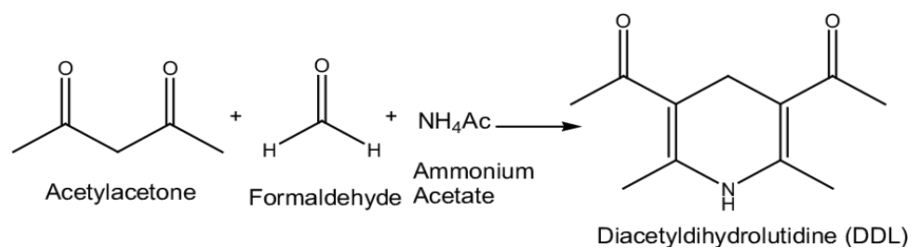
ที่มา: Bechmann IE. Lebensm.-Wiss. u.-Techol., 1998⁽¹²⁾

2.3.2 เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์⁽⁴⁷⁾

2.3.2.1 สเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์มานาน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์กับสารเคมีที่จำเพาะ เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ ที่มีหรือไม่มีสีก็ได้ และวัดความเข้มข้นหรือการเปลี่ยนแปลงของสารผลิตภัณฑ์ ตรวจวัดด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นเหมาะสมกับสารนั้น ซึ่งแปรผันกับปริมาณสารในตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยากับสารเคมีจำเพาะ แบ่งตามวิธีการทำปฏิกิริยาของสารได้ ดังนี้

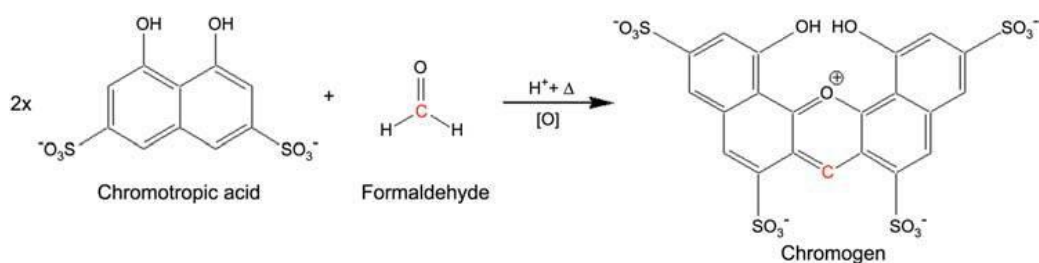
1) Nash method: เป็นวิธีที่ง่าย ค้นพบโดย Nash T⁽⁴⁸⁾ มาตั้งแต่ปี 1953 เป็นปฏิกิริยา Hantzsch ระหว่างอะเซติลอะซิโตน (acetyl acetone) แอมโมเนีย และฟอร์มาลดีไฮด์ ในสภาวะที่ใช้ความร้อนเพื่อเร่งปฏิกิริยา ให้เป็น 3,5-ไดอะซิetyl-1,4-ไดไฮโดรลูติดีน (3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine; DDL) (ภาพที่ 2.2) มีสีเหลือง และวัดปริมาณที่ความยาวคลื่นประมาณ 412 นาโนเมตร (nm) เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ จะต้องปรับความเป็นกรด-ด่าง

โดยแอมโมเนียม อะซิเตต (ammonium acetate) และให้ความร้อน ความไวของการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นได้เมื่อวัดฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม (fluorescence spectrum) วิธีนี้มีความจำเพาะ มีความไวในการตรวจวัด และกระทำภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง มีความถูกต้อง และเป็นที่ยอมรับ ข้อเสียคือต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ ใช้ความร้อนในการทำปฏิกิริยา จึงมีข้อจำกัดในการที่จะพัฒนาไปสู่การวิเคราะห์แบบอัตโนมัติหรือนำไปใช้ภาคสนาม



ภาพที่ 2.2 การทำปฏิกิริยาระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ กับ acetyl acetone⁽⁴⁹⁾

2) Chromotropic acid method : chromotropic acid เตรียมได้โดยละลาย 1,8-dihydroxy naphtha- lene-3-6-disulphonic acid, disodium salt ในสารละลายกรดซัลฟริก เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์จะได้โครโมเจน (chromogen) สารสีแดงอมน้ำตาล (รูปที่ 2.3) วัดปริมาณที่ความยาวคลื่น ประมาณ 570 - 580 nm^(13,50) วิธีนี้มีความจำเพาะ กับฟอร์มาลดีไฮด์และจะไม่มีการรบกวนของ เมทานอล อะซิโตนไดไฮดรอกไซด์ และ กรดฟอร์มิก เมื่อมีความเข้มข้นในอัตราส่วน 10:1 แต่ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง ใช้ความร้อนในการทำปฏิกิริยา ขณะเดียวกันมีความไวในการตรวจวัด และเป็นที่ยอมรับ ข้อเสียคือต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ จึงมีข้อจำกัดในการที่จะพัฒนาไปสู่การวิเคราะห์แบบอัตโนมัติหรือนำไปใช้ภาคสนาม



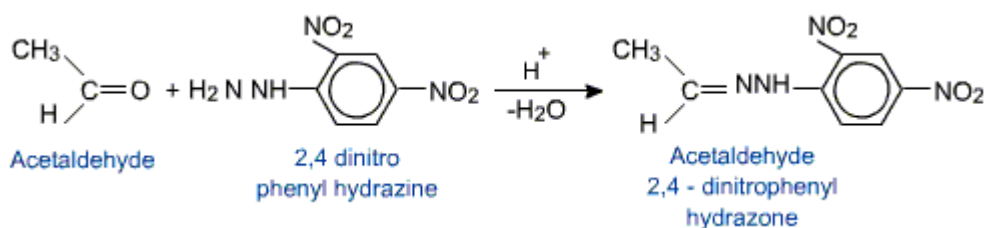
ภาพที่ 2.3 การทำปฏิกิริยาระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ กับ Chromotropic acid⁽⁵⁰⁾

3) 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (AHM; Purpald) method: โดยการทำปฏิกิริยาของฟอร์มาลดีไฮด์ที่สกัดได้จากตัวอย่างกับ AHMT ในสภาวะที่เป็นต่างเข้มข้น และวัดสารสีม่วงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิธีนี้มีความไวในการตรวจวัดในระดับความเข้มข้นเป็นส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความถูกต้อง และเป็นที่ยอมรับ นิยมใช้วิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารทั่วไป และอาหารทะเล เช่น ปลา ปลาหมึก เป็นต้น ข้อเสียคือต้องปฏิบัติในสภาวะที่เป็นต่างเข้มข้น และมีสารคาร์บอนเนตเกิดขึ้น

4) Kinetic spectrophotometric method: เป็นวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีที่วัดผลการเร่งปฏิกิริยา (catalytic effect) ในการทำปฏิกิริยาของสารโดยอาจจะเกิดผลผลิตที่มีสีหรือไม่มีสีก็ได้ ขึ้นอยู่กับสารที่มาทำปฏิกิริยากัน วิธีนี้มีข้อดีคือ ช่วยเพิ่มความไว และความจำเพาะของการวิเคราะห์ เช่น การทำปฏิกิริยาของโรดามีน บี (Rhodamine B; RhB) กับ โพแทสเซียม โบรเมต (potassium bromate) โดยมีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การวัดทางสเปกโตรโฟโตเมทรี เป็นการตรวจติดตามการจางลงของสารสีม่วงจนกระทั่งไม่มีสี ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร วิธีนี้สามารถวัดสารได้ต่ำที่ความเข้มข้น 2.90 ไมโครกรัมต่อลิตรหรือส่วนในพันล้านส่วน (ppb) เป็นวิธีที่ง่าย เร็ว มีความถูกต้อง สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารทะเล โดยเฉพาะปลาได้เป็นอย่างดี

2.3.2.2 โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นการแยกฟอร์มาลดีไฮด์ หรือสารอนุพันธ์ (derivatized) ออกจากส่วนผสมอื่นให้บริสุทธิ์ด้วยสารพาที่เคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคนิ่ง และตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด (detector) ที่เหมาะสมกับสารที่แยกได้ เทคนิคที่นิยมคือ ไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography; HPLC) และแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography; GC)

1) HPLC เทคนิคนี้อาศัยการเปลี่ยนรูปของฟอร์มาลดีไฮด์ ในกระบวนการทำให้เกิดสารอนุพันธ์ (derivatization) โดย 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน (2,4 - Dinitrophenylhydrazine ; DNPH) จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลเช่นเดียวกับสารอัลดีไฮด์อื่น (ภาพที่2.4) แยกสารอนุพันธ์ด้วย HPLC ตรวจวัดสารด้วยยูวี ดีเทคเตอร์ (UV detector) ที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร โดยวิธีนี้จะมีค่าจำเพาะเจาะจงสูง มีความแม่นยำ ความเที่ยง และความไวในการตรวจวัด เหมาะต่อการวิเคราะห์กลุ่มอาหารทะเลเช่น ปลาหมึกได้ ที่ความเข้มข้นต่ำในระดับส่วนในพันล้านส่วน (ppb) และที่ความเข้มข้นสูงในระดับส่วนในล้านส่วน (ppm) ข้อเสียคือ DNPH สามารถทำปฏิกิริยากับสารประเภทอัลดีไฮด์บางชนิด และคีโตนได้เช่นกัน และในกระบวนการทำให้เกิดสารอนุพันธ์ ต้องใช้เวลาค่อนข้างนาน (ไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิปกติ) นอกจากนี้ยังมีสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์อื่นอีก เช่น ไดมีโดน (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione)



ภาพที่ 2.4 การทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) กับ 2,4-DNPH ⁽⁵¹⁾

2) GC ปัจจุบันนิยมใช้โซลิดเฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน-แก๊สโครมาโตกราฟี (Solid Phase Microextraction (SPME)-GC-MS): วิธีนี้ใช้วัสดุไฟเบอร์ชนิดพิเศษมาจับฟอร์มาลดีไฮด์ จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้น และทำให้เกิด สารอนุพันธ์ได้ต่อเนื่องในขั้นตอนเดียว โดยใช้เพนตะฟลูออโรเบนซิล ไฮดรอกซิลลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Pentafluorobenzyl-hydroxylamine Hydrochloride; PFBHA) แล้วแยกสารอนุพันธ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแก๊สภายใต้การเร่งด้วยความร้อนจากส่วนเตรียมตัวอย่างชนิด เฮดสเปซ (headspace) และตรวจวัดด้วยแมส ดีเทคเตอร์ (Mass detector) หรือ เอฟไอดี ดีเทคเตอร์ (FID-detector) ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำการวิเคราะห์ได้ต่อเนื่อง ประหยัดเวลา มีความไวสูงสามารถวิเคราะห์สารที่ปริมาณต่ำที่ระดับส่วนในพันล้านส่วนได้ดี ข้อเสียคือ วัสดุไฟเบอร์และเครื่องมือที่ใช้ยังมีราคาแพง

2.3.2.3 ฟลูออโรเมทรี (Fluorometry) เป็นวิธีที่อาศัยการวัดด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ (fluorometer) หลังจากฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยาโดยสารเคมีมาแล้ว สามารถทำการวัดแบบต่อเนื่องได้เมื่อทำในระบบ flow injection สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีหลายชนิด เช่น 2,4-เพนเทนไดโอน (อะซีติลอะซิโตน) (2,4-pentanedione (acetylacetone)), 5,5-ไดเมทิล-1,3-ไซโคลเฮกเซนไดโอน ไดมิโดน (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione dimedone), 1,3-ไซโคลเฮกเซนไดโอน (ซีเอชดี) (1,3-cyclohexanedione (CHD)), 4-อะมิโน-3-เพนเทน-2-ออล (ฟลูออราล-พี) (4-amino-3-pentene-2-ol (Fluoral-P)), อะซีโตอะซิทานิลด์ (acetoacetanilide) เป็นต้น ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์จะมีราคาแพงเมื่อเทียบกับเครื่อง spectrophotometer แต่มีความไวในการวิเคราะห์ดีกว่า

2.3.2.4 จมูกอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic nose; E-nose) วิธีนี้มีการพัฒนานำมาใช้กันมากขึ้นโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อการควบคุมคุณภาพ มีหลักการทำงานโดยใช้เซนเซอร์ที่ความต้านทานไฟฟ้าเปลี่ยนไปเมื่อดูดซับสารระเหย มาเป็นตัววัดแก๊สฟอร์มาลดีไฮด์ เทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้ง่ายเมื่อเชื่อมกับเทคนิคทางเคโมเมตริก (chemometric) ประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวางในด้านการตรวจสอบการปลอมปนอาหาร ตัวอย่างที่มีการพัฒนานำมาใช้ เช่น การพัฒนาแก๊ส เซ็นเซอร์ (gas sensor) แบบ solid-state-based ชื่อ FishNose ที่ใช้ตรวจ

ปลาแชลมนอรรณวีน ซึ่งสามารถวัดโดยตรงจากตัวอย่างได้ โดยไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการดึงตัวอย่างออกมาวัด จึงประหยัดเวลา และมีความแม่นยำ อีกชนิดคือ E-nose กับ 6 TGS gas sensor เพื่อวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ และการเสื่อมสภาพของปลาหมึกยักษ์ ได้ประสบผลสำเร็จ

2.3.2.5 ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) วิธีนี้เป็นการใช้เทคนิคทางอิเล็กโตรเคมีสทรี (electrochemistry) ซึ่งประกอบด้วยโพเทนชิโอเมตริก (potentiometric), แอมเพโรเมตริก (amperometric), คอนดักติเมตริก (conductimetric) เป็นต้น โดยใช้สารทางชีวมวลมาจับฟอร์มาลดีไฮด์ แล้วเกิดกระบวนการทางชีวภาพทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้น เช่น มีความร้อน มีการส่งผ่านอิเล็กตรอน การดูดกลืนพลังงานแสง เป็นต้น จึงสามารถตรวจวัดได้โดยเทคนิคข้างต้น สารทางชีวภาพอาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ ไบโอคะตะไลติก (biocatalytic) ไบโอแอฟฟินิตี (bioaffinity) และไฮบริด รีเซปเตอร์ (hybrid receptor) ซึ่งจะถูกตรึงโดยการดูดซับ หรือโดยพันธะโควาเลนต์ ให้ติดกับวัสดุที่มีความไวในการตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้น ไบโอเซนเซอร์ยังไม่ค่อยมีการพัฒนามาใช้เพื่อตรวจฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร

2.3.3 การตรวจคัดกรอง (Screening test)

ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่สามารถเห็นผลการตรวจได้รวดเร็วด้วยชุดทดสอบ (test kits) โดยการเปรียบเทียบสี หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีของสารเคมีกับฟอร์มาลดีไฮด์แล้วเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงที่ทราบปริมาณ เช่น โดยเทคนิคคลอริเมตรี (Colorimetry) จากปฏิกิริยา pararosaniline-based reaction วิธีนี้มีความไวน้อย และถูกรบกวนด้วย ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีในอาหาร สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาเป็น Chromogenic agents ชนิดต่าง ๆ เช่น 3-เมทิล-2-เบนโซไทอาโซโลนไฮดราโซน (3-methyl-2-benzothiazolonehydrazone; MBTH) สาร MBTH มีราคาค่อนข้างแพง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ช้า และมีข้อจำกัดในด้านความไวของการวัด วิธีนี้อาจใช้วัดตัวอย่างที่อยู่ในสถานะแก๊สได้ หรือใช้ 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,3-triazol ในการทำให้เกิดสี จะเป็นการทำปฏิกิริยาค่อนข้างเร็วแต่มีข้อจำกัดในด้านความไวของการวัด และอาจถูกรบกวนด้วยอัลดีไฮด์อื่น

2.3.4 วิธีอื่น

อาศัยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค และเครื่องมือที่แตกต่างออกไปเช่น การวัดด้วยอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Infrared spectrometer) ใช้อินฟราเรด สเปกตรัมที่แสดงหมู่ฟังก์ชันของฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสิ่งบ่งชี้เบื้องต้นและหาปริมาณโดยใช้โปรแกรม Partial least squares (PLS)⁽⁵²⁾ การวัดด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR)⁽²⁸⁾ หรือ Thin layer chromatography-Densitometer⁽⁵³⁾ เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารที่มีการศึกษาและแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ สามารถนำไปใช้ตรวจวัดได้มีหลายการศึกษา ส่วนใหญ่เป็นการวิเคราะห์ free-FA และตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟี และ สเปกโทรโฟโตเมทรี ดังที่แสดงใน ตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร

รูปแบบของสาร	ชนิดและวิธีเตรียมตัวอย่าง	เทคนิคที่ตรวจวัด	ค่าต่ำสุดที่วัดได้	อ้างอิง
	อาหารทะเล (ปลา ปลาหมึกและผลิตภัณฑ์ กุ้ง) ผัก ผลไม้ นม เครื่องดื่ม			
free-FA	ใช้น้ำและเนื้อปลาในอัตราส่วนเท่ากัน ปั่นให้ละเอียดประมาณ 45 วินาที ที่ 30 นาที สกัดด้วยสารละลายไตรคลอโรอะซิติก แอซิด (TCA) 10% ในอัตราส่วนที่เท่ากัน เขย่า กรอง สารละลายที่ได้ เจือจางด้วยน้ำ นำมาทำปฏิกิริยากับ Nash reagent ที่สภาวะ pH 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที	Spectrophotometer (415 nm)	~ 3.9 ppm	Castell CH ⁽⁵⁴⁾ (1973)
1) free-FA	1) เนื้อปลาหั่น 20 กรัม ปั่นในสารละลาย HClO ₄ 6 % (w/v) 180 มิลลิลิตร กรอง	Spectrophotometer (412, 578 nm)	Nash :	Rehbein H ⁽⁵⁵⁾ (1987)
2) free-FA+ bound-FA	สารละลายตัวอย่างส่วนที่ 1 นำมาทำปฏิกิริยากับ Nash reagent ที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และส่วนที่ 2 ทำปฏิกิริยากับ chromotropic acid ที่อุณหภูมิ น้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที นำไปวิเคราะห์		0.105 µg/ml	
	2) เนื้อปลาหั่น 3 กรัม สกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ภายใต้สภาวะกรด H ₂ SO ₄ /H ₃ PO ₄ กลั่นให้ได้สารละลาย 250 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับ 1)		0.018 µg/ml	
free-FA	เนื้อปลา 60 กรัมใส่สารละลาย กรด HClO ₄ 6% 120 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็วสูง กรองผ่านกระดาษกรอง สารละลายที่กรองได้ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 นำไปแช่เย็น 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน KClO ₄ สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ 3 วิธี test strip, Nash method และ ใช้เอนไซม์ FA-dehydrogenase	Spectrophotometer (340 nm)	0.3 µmole%	Leblanc EL ⁽⁵⁶⁾ (1987)
free-FA+ bound-FA	เนื้อปลาสับ 5 กรัม ใส่ น้ำ 50 มิลลิลิตร สารละลายกรดฟอสฟอริก 85% 5 มิลลิลิตร กลั่นด้วยไอน้ำ ให้ได้สารละลาย 200 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ chromotropic acid ที่ อุณหภูมิ น้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที นำไปวิเคราะห์	Spectrophotometer (570 nm)	5 µg/g	Boeri RL ⁽⁴⁶⁾ (1993)

ตารางที่ 2.5 วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ใน อาหาร (ต่อ)

รูปแบบของสาร	ชนิดและวิธีเตรียมตัวอย่าง	เทคนิคที่ตรวจวัด	ค่าต่ำสุดที่วัดได้	อ้างอิง
free-FA	เนื้อปลาสด 5 กรัม ปั่นกับน้ำ 80 มิลลิลิตร เติม Carrez I ($K_4Fe(CN)_6$ 15%) และ Carrez II ($ZnSO_4$ 30%) อย่างละ 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าต่อเนื่อง กรองสารละลายที่ได้นำมาทำปฏิกิริยากับ Nash reagent เพื่อการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric และแยกสารละลายบางส่วนไปทำปฏิกิริยากับ AHMT นำไปวิเคราะห์ด้วย Reflectometer (RQflex)	1) Spectrophotometer 2) RQflex	2 mg/l	Rehbein H ⁽⁵⁷⁾ (1996)
free-FA	อาหารที่ละลายน้ำหรือตัวทำละลายอื่น 2 มิลลิลิตร สกัดฟอร์มาลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีโดย headspace sampler	GC-FID	1 mg/kg	Tashkov W ⁽⁵⁸⁾ (1996)
free-FA	เนื้อปลาล้าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะรองรับ สกัดสารที่อยู่ในสภาวะไอ (purge) ด้วยก๊าซไนโตรเจน 40 นาที ให้ไหลผ่าน SEP-PAK C18 ซึ่งเคลือบด้วย DNPH เชะอนุพันธ์ของฟอร์มาลดีไฮด์ออกด้วยอะซิโตนไตรท์ 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์	HPLC-UV	0.75 nmol/g	Cunha Veloso MC ⁽⁵⁹⁾ (2001)
free-FA	PFBHA ถูกดูดซับบน Fiber ภายใต้ SPME headspace sampler ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ระเหยจากสารละลายตัวอย่าง (ปลากุ้ง ปลาหมึก หันละเอียด) จะทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ PFBHA ภายใต้ headspace sampler ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวิเคราะห์สารอนุพันธ์	GC-MS	17 μ g/kg	Bianchi F ⁽³⁵⁾ (2007)
free-FA+ bound-FA	เนื้อปลาหมึกปั่น 10 กรัม ใส่ น้ำ 200 มิลลิลิตร และ สารละลายกรดฟอสฟอริก 10 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กลั่นด้วยไอน้ำ เก็บสารละลายที่กลั่นได้ 100 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สกัดด้วย ไดคลอโรมีเทน ระเหยแห้ง ละลายด้วย เมทานอล นำไปวัดปริมาณ	HPLC-UV (355 nm)	0.18 mg/kg	Li J (2007) ⁽⁴³⁾

ตารางที่ 2.5 วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ใน อาหาร (ต่อ)

รูปแบบของสาร	ชนิดและวิธีเตรียมตัวอย่าง	เทคนิคที่ตรวจวัด	ค่าต่ำสุดที่วัดได้	อ้างอิง
free-FA+ bound-FA	เครื่องต้มแอลกอฮอล์ นำมาสกัดฟอร์มาลดีไฮด์โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ สารละลายที่กลั่นได้ ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย chromotropic acid เป็นเวลา 10 นาที และวิเคราะห์ภายใต้ระบบที่ต่อเนื่อง	Spectrophotometer (564 nm)	0.09 mg/l	Jendral JA ⁽⁵⁰⁾ (2011)
1) free-FA 2) free-FA + bound-FA	1) ปลาหมึก/กุ้งที่หั่นละเอียด 2.5 กรัม ใส่ในน้ำ 25 มิลลิลิตร สกัดโดย คลื่นความถี่สูง 10 นาที ปั่นด้วย vortex และปั่นแยกตะกอน นำสารละลายส่วนใสมาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สกัดสารอนุพันธ์ด้วย ไดคลอโรมีเทน และระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย เมทานอล กรองนำไปวิเคราะห์ 2) สกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ และทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1)	MEKC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography)	0.57 mg/l	Xu LN ⁽⁶⁰⁾ (2012)
free-FA	อาหารหมักดองหั่น 1 กรัม ปั่นในน้ำเกลือเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ใส่ 2,2,2-trifluoro-ethyldiazine (TFEH) 400 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ และดูดซับสารเข้าสู่ระบบ HS-SPME โดยอัตโนมัติและต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที	GC-MS	0.1 µg/kg	Shin HS ⁽⁶¹⁾ (2012)
1) free-FA 2) free-FA + bound-FA	1) ปลาหมึกปั่น 5 กรัม ใส่ในน้ำ 50 มิลลิลิตร สกัดฟอร์มาลดีไฮด์โดยใช้คลื่นความถี่สูง 40 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ในที่มีดที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ใส่ไดคลอโรมีเทน 2 มิลลิลิตรเพื่อเขย่า และปั่นแยกสาร นำสารละลายไดคลอโรมีเทนไปวิเคราะห์ 2) ปลาหมึกปั่น 5 กรัม ใส่ในน้ำ 40 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก 20% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลั่นด้วยไอน้ำ เก็บสารละลายที่กลั่นได้ 100 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH เช่นเดียวกับข้อ 1)	-GC-MS -HPLC-UV (365 nm)	2.0 mg/kg	Yeh T-S ⁽⁷⁾ (2013)

ตารางที่ 2.5 วิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ใน อาหาร (ต่อ)

รูปแบบของสาร	ชนิดและวิธีเตรียมตัวอย่าง	เทคนิคที่ตรวจวัด	ค่าต่ำสุดที่วัดได้	อ้างอิง
free-FA	เนื้อปลาหมึก/เนื้อปลาที่ป่นแล้ว 2 กรัม ใส่สารละลาย DNPH 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยการเขย่าต่อเนื่อง ที่ความเร็ว 150 r/นาที่ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในระหว่างนี้ นำออกมาปั่นทุก 20 นาที ปั่นแยกตะกอน กรองสารละลายที่แยกได้ แล้วนำไปวิเคราะห์	HPLC-UV	5 mg/kg	Zhang X ⁽⁴²⁾ (2015)
free-FA	เนื้อปลาแล่บาง 10 กรัม เติมน้ำ 40 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที สกัดโดยคลื่นความถี่สูง 5 นาที ปั่นแยกสารละลาย 5 นาที กรองสารละลายตัวอย่าง เติมน้ำอะซิโตนไตรล์ 2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N แล้วนำไปวิเคราะห์	HPLC-UV	1 mg/kg	Storey JM ⁽⁶²⁾ (2015)
free-FA	ผัก/ผลไม้/เนื้อ ที่ป่นแล้ว 1 กรัม เติมน้ำเกลือเข้มข้น 30% 9.950 มิลลิลิตร สกัดภายใต้ คลื่นความถี่สูง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็วสูง สารละลายที่แยกได้เติมน้ำเกลือ ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย PFBHA ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 40 นาที แยกและเก็บสารเพื่อวิเคราะห์โดยใช้ SPME ใน headspace sampler ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที	GC-MS	5.74 - 175.03 ng/g	Jeong H-S ⁽⁶³⁾ (2015)
free-FA	มะม่วง/ปลา ที่บด และป่นแล้ว 5 กรัม เติมน้ำอะซิโตนไตรล์ 5 มิลลิลิตร เขย่า และสกัด โดย ด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกสารละลายด้วยความเร็วสูง กรอง สารละลายที่แยกได้ด้วยกระดาษกรอง ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์	HPLC-PDA	0.39 mg/l (matrix free)	Wahed P ⁽⁶⁴⁾ (2016)

ตารางที่ 2.5 วิธีวิเคราะห์ฟอร์มัลดีไฮด์ใน อาหาร (ต่อ)

รูปแบบของสาร	ชนิดและวิธีเตรียมตัวอย่าง	เทคนิคที่ตรวจวัด	ค่าต่ำสุดที่วัดได้	อ้างอิง
free-FA	Bovine milk 2.5 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.0 ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ในอะซิโตไนไตรล์ เขย่าและปั่นด้วยความเร็วสูงเพื่อแยกสารละลาย แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เก็บข้ามคืน แยกฟอร์มัลดีไฮด์ที่อยู่ในตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ ออกมาจากน้ำแข็ง กรองผ่านเมมเบรน แล้วนำไปวิเคราะห์	HPLC-UV	6.0 µg/l	Freitas Rezende FB ⁽⁶⁵⁾ (2017)
free-FA	ผัก/ผลไม้ ปั่นกับน้ำในอัตราส่วน 1:10 กรองตะกอนออกผ่านผ้ากรอง และกระดาศกรอง น้ำนมนำมาเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1:2 แล้วกรอง เจือจางสารละลายที่กรองได้เป็น 100 เท่า และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6-6.5 ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย Nash reagent ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-15 นาที นำไปวิเคราะห์	Spectrophotometer (415 nm)	-	Nowshad F ⁽⁶⁶⁾ (2018)
free-FA + bound-FA	เห็ดหั่น 20 กรัม เติมน้ำ 120 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟูริก 1.32 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดฟอร์มัลดีไฮด์โดยการกลั่น เก็บสารละลายที่กลั่นได้ 160 กรัม ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย (1) chromotropic acid ที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที (2) dimedone derivatization reagent ที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา แล้วแช่ในน้ำแข็ง นำไปวิเคราะห์	1. Spectrophotometer (570 nm) 2. LC-MS	-6 mg/kg - 50 mg/kg (LOQ)	Mason DJ ⁽⁶⁷⁾ (2004)
free-FA	เห็ดสด 100 กรัม เติมะอะซิโตไนไตรล์ 100 มิลลิลิตร สกัดฟอร์มัลดีไฮด์โดยใช้คลื่นความถี่สูง 30 นาทีพร้อมเขย่า กรอง ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านเมมเบรน	HPLC-UV	0.02 mg/kg (LOQ)	Claeys W ⁽⁹⁾ (2009)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

3.1 ลำดับขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1.1 คัดเลือกวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ อ้างอิงวิธี จากการทบทวนเอกสารวิชาการ

3.1.2 พัฒนาวิธีวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร จากวิธีอ้างอิงและปรับให้มีประสิทธิภาพและเหมาะสม กับทรัพยากรที่มีของหน่วยงาน ดังนี้

3.1.2.1 การสกัด free-FA จากตัวอย่างปลาหมึกสดซึ่งเป็นตัวแทนอาหารทะเล และสไลนังเป็นตัวแทนอาหารประเภทสัตว์บก โดยศึกษาชนิดของตัวทำละลาย เทคนิคที่ใช้ และระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

3.1.2.2 การตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ เปรียบเทียบระหว่างเทคนิค โครมาโตกราฟีแบบของเหลว (liquid chromatography) ด้วย เครื่อง HPLC-UV และ LC-MS/MS และเทคนิค สเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3.1.3 ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ free-FA (method validation) ในปลาหมึกและสไลนังจากวิธีที่พัฒนาจนเหมาะสมแล้ว ตามข้อ 3.1.2 ดำเนินการในหัวข้อความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความเที่ยง (precision) ความแม่นยำ (accuracy)

3.1.4 ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

3.1.5 ศึกษาปริมาณ free-FA ในปลาหมึกในสถานะต่างๆ ที่ใช้เก็บรักษา และการทำให้สุก

3.1.6 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในตัวอย่างอาหารที่เก็บจากตลาด ปลาหมึกเก็บจากตลาดในจังหวัดต่างๆ ห้องเย็นที่เก็บสินค้านำเข้า และแหล่งกระจายสินค้า สไลนังเก็บจากแหล่งผลิตและจำหน่าย และเห็ดจากแหล่งจำหน่าย เพื่อสำรวจปริมาณพื้นฐานของ free-FA ที่มีตามธรรมชาติในอาหาร

3.1.7 ฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 14 แห่ง ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการฝึกอบรมประกอบด้วยการบรรยาย และฝึกปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ ระยะเวลา 2 วัน

3.2 ตัวอย่าง

3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ free-FA เป็นปลาหมึกสดจากเรือประมงท้องถิ่น ตรวจไม่พบฟอร์มาลดีไฮด์โดยชุดทดสอบฟอร์มาลินในอาหาร และสไปนางสีขาวยี่ห้อจากตลาดสด เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 ตัวอย่างที่ใช้เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ free-FA เป็นปลาหมึกกล้วยนำเข้าจากต่างประเทศ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Illex argentinus* ชื่อสามัญ Argentine shortfin squid มี 2 ลักษณะ คือ ปลาหมึกสด (เนื้อแน่น) จากห้องเย็นของผู้ประกอบการนำเข้าปลาหมึก และปลาหมึกไม่สด ซึ่งมีเนื้ออ่อน นิ่ม กลิ่นเหม็นเล็กน้อย ซื้อจากตลาด และสไปนาง ซื้อจากตลาด เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อสำรวจปริมาณ free-FA ในอาหาร เป็นปลาหมึกจำนวน 63 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลาหมึกที่ได้จากการทำประมงภายในประเทศ เรียกว่า ปลาหมึกไทยจำนวน 40 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากตลาดสด ตลาดค้าส่ง สะพานปลา ในจังหวัดชุมพร ตรัง ภูเก็ต ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ชลบุรี ระยอง จันทบุรี สงขลา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และสมุทรสาคร และปลาหมึกนำเข้าจำนวน 23 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างปลาหมึกทั้งตัว และชิ้นส่วนปลาหมึกยักษ์ (ปีก เนื้อล้วน คาง และหนวด) เก็บจากตลาดค้าส่ง ห้องเย็น และบริษัทผู้นำเข้า สไปนาง (สีดำ) จำนวน 34 ตัวอย่าง เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ และตลาดขนาดใหญ่ ในจังหวัดสระบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง พระนครศรีอยุธยา นครนายก ปทุมธานี นนทบุรี และกรุงเทพมหานคร และเห็ด จำนวน 21 ตัวอย่าง เก็บจากฟาร์มเห็ด ตลาดสด และห้างสรรพสินค้า ทุกตัวอย่างทำการตรวจคัดกรองโดยชุดทดสอบฟอร์มาลินในอาหารควบคู่กัน ยกเว้นตัวอย่างเห็ด

3.3 สารมาตรฐาน สารเคมี และอุปกรณ์

3.3.1 สารมาตรฐาน

3.3.1.1 สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลิน (CH_2O) เข้มข้นร้อยละ 37- 40 โดยปริมาตร

3.3.1.2 สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 0.01 โมลต่อลิตร ที่สามารถสอบย้อนกลับได้ (traceable to NIST)

3.3.1.3 โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 97

3.3.1.4 อะซีทัลดีไฮด์ (CH_3CHO) ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99

3.3.1.5 โพรพิโอนัลดีไฮด์ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 97

3.3.2 สารเคมี

3.3.2.1 ชนิด HPLC grade : เมทานอล (CH_3OH) และ อะซิโตนไนไตรล์ (CH_3CN)

3.3.2.2 ชนิด AR grade : กรดอะซิติก (CH_3COOH) gracial, กรดเปอร์คลอริก (HClO_4) 2,4 ไดไนโตรฟีนอล ไฮดรอกซี ($\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$; DNPH), แอมโมเนียม อะซิเตต ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$), แอมโมเนียม ฟอ์เมต (CH_5NO_2), อะเซตติลอะซิโตน ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$), ไทมอลฟทาไลน์ ($\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_4$), เอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) absolute

3.3.2.3 น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ค่าความต้านทาน (resistivity) ≥ 18 เมกะโห์ม-เซนติเมตร

3.3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 2- 4 ตำแหน่ง

3.3.3.2 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (vortex)

3.3.3.3 อ่างน้ำคลื่นความถี่สูง (sonicator bath)

3.3.3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบความเร็วสูง (centrifuge)

3.3.3.5 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (bath with temperature control)

3.3.3.6 ไมโครปิเปต ขนาด 1-10, 10-100, 10-1,000 และ 500-5,000 ไมโครลิตร

3.3.3.7 หลอดทดลองสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge tubes) ทำจาก polypropylene พร้อมฝาเกลียวปิด ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

3.3.3.8 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.3.3.9 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (filter paper No.1)

3.3.3.10 ขวดสีขาบรรจุสารละลายตัวอย่างสำหรับ พร้อมฝา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.3.11 กระบอกฉีดยาพลาสติก (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร

3.3.3.12 เมมเบรนสำหรับกรอง (syringe filter) ชนิด PVDF หรือ nylon ขนาด 0.45 หรือ 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร

3.3.3.13 อุปกรณ์สำหรับ Standardization เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ฟอร์มาลดีไฮด์ ดังนี้

1) บิวเรตความละเอียด 0.01 มิลลิลิตร

2) ปิเปตแก้วปริมาตร 10 และ 50 มิลลิลิตร

- 3) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 4) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
- 5) เครื่องกวนสารละลายแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

3.3.3.14 เครื่อง HPLC – UV detector : KNAUER รุ่น AURA

สภาวะใช้งาน : คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ RESTEK หรือเทียบเท่า วิธีการชะแบบไอโซเครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตน ไตรล กับ น้ำ ในอัตราส่วน 60:40 ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร (สภาวะต่างๆ สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสม)

3.3.3.15 เครื่อง Liquid chromatograph/triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS): AB SCIEX & Agilent รุ่น API 4000 & 1100

สภาวะใช้งาน : คอลัมน์ชนิด Luna Su C18 ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Phenomenex หรือเทียบเท่าวิธีการชะแบบไอโซเครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลต่อลิตร ของแอมโมเนียม ฟอสเฟต กับ อะซิโตน ไตรล อัตราส่วน 35:65 ด้วยอัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร แหล่งผลิตไอออน คือ Turbo spray (ESI) วิเคราะห์มวลด้วย triple quadrupole โหมดประจุลบ (negative mode) การตรวจติดตามไอออนแบบหลายปฏิกิริยา (multiple reaction monitoring, MRM) การทราบชนิดมวลต่อประจุของสารฟอร์มาลดีไฮด์ 209/163 และ 209/133 ซึ่งได้จากไอออนแม่ (precursor ion) คือ m/z 209 แตกย่อยไอออนเป็นไอออนผลิตภัณฑ์ (production) คือ m/z 163 และ 133 การคำนวณหาปริมาณสารฟอร์มาลดีไฮด์ใช้พื้นที่ใต้พีค (peak area) การทราบลิชัน m/z 209/163 (ฟอร์มาลดีไฮด์) และยืนยันด้วยการทราบลิชัน m/z 209/133 (ฟอร์มาลดีไฮด์) สภาวะต่างๆสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสม

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งผลิตไอออนสำหรับวิเคราะห์สารฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ในโหมดประจุลบ (negative mode)

พารามิเตอร์	ค่ากำหนด
temperature	450 °C
Collision Gas (CAD)	6 psig
Curtain Gas (CUR)	20 psig
Ion Source Gas 1 (GS ₁)	55 psig
Ion Source Gas 2 (GS ₂)	55 psig
Ion Spray Voltage (IS)	-4500 volts

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (multiple reaction monitoring, MRM) ในการวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell Time (mSec)	DP* (Volts)	EP* (Volts)	CE* (Volts)	CXP* (Volts)
ฟอร์มาลดีไฮด์	209.1	162.9	250	-30	-10	-13	-12
	209.1	132.8	250	-30	-10	-15	-16

* DP : Declustering Potential , EP : Entrance Potential, CE : Collision Energy, CXP : Collision Cell Exit Potential

3.3.3.18 เครื่อง Spectrophotometer (UV/VIS) : Shimazu รุ่น UV1601

วัดที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร

3.3.3.19 ชุดทดสอบฟอร์มาลินในอาหาร องค์การเภสัชกรรม (GPO)

3.3.4 วิธีเตรียมสารละลายเคมีและสารละลายมาตรฐาน

3.3.4.1 สารละลายโซเดียมซัลไฟด์ 1 โมลต่อลิตร

ซิงค์โซเดียมซัลไฟด์ 12.6 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ
น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว

3.3.4.2 สารละลาย ไทมอลฟทาลีน (อินดิเคเตอร์) 1% (w/v)

ซิงค์ไทมอลฟทาลีน 0.05 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล

3.3.4.3 สารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v)

ปิเปตกรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเล็กน้อย และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

3.3.4.4 สารละลายอะซิโตนไตรล์ 30% (v/v) ในสารละลาย กรดอะซิติก 0.1 % (v/v)

ปิเปตอะซิโตนไตรล์ 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย กรดอะซิติก 0.1% (v/v)

3.3.4.5 สารละลายกรดเปอร์คลอริก กับน้ำ อัตราส่วน 1:19

ปิเปตกรดเปอร์คลอริก 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำ 19 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.3.4.6 สารละลาย 2,4 ไดไนโตรฟีนอลไฮดราซีน (DNPH –Reagent)

ชั่ง DNPH 0.125 กรัม ละลายในอะซิโตนไตรล์ 50 มิลลิลิตร แล้วถ่ายลงขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดเปอร์คลอริก (1:19) จำนวน 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ

3.3.4.7 สารละลาย Nash (Nash's Reagent)

ชั่ง แอมโมเนียมอะซิเตต 150 กรัม ละลายในน้ำ 200 - 300 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 3 มิลลิลิตร และอะเซตติลอะซิโตน 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

3.3.4.8 สารละลาย แอมโมเนียมฟอร์เมต 5 มิลลิโมลต่อลิตร

ชั่งแอมโมเนียมฟอร์เมต 0.158 กรัม ละลายน้ำ แล้วถ่ายลงขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ

3.3.4.9 สารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (stock standard solution)

ปิเปตสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ (ข้อ 3.3.1.1) 0.25 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ และ standardization โดย ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมซัลไฟต์ (ข้อ 3.3.4.1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ หยดสารละลายไทมอลฟทาไลน์ อินดิ เคเตอร์ จำนวน 1-2 หยด จะได้สารละลายสีฟ้าอ่อน แล้วหยดสารมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (ข้อ 3.3.1.2) จำนวน 2-3 หยด จนสีของสารละลายจางหายไป ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่จะได้สารละลายสีฟ้ากลับมา ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก (ในข้อ 3.3.1.2) จนสารละลายไม่มีสีบันทึกปริมาตรที่ใช้ไตเตรท และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์

ความเข้มข้นของสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) = $0.6 \times A \times 1000/B$ (3.1)

เมื่อ A คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

หมายเหตุ สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.01 โมลต่อลิตร 1 มิลลิลิตร เท่ากับ ฟอร์มาลดีไฮด์ 0.6 มิลลิกรัม stock standard solution มีอายุการใช้งาน 6 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส

3.3.4.10 สารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (intermediate standard solution)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.4.3) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร (ปรับเปลี่ยนปริมาตรที่ใช้ตามความเข้มข้นจริงของ stock standard solution ที่ได้จากการ standardization) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง ที่ทำการตรวจวิเคราะห์)

3.3.4.11 สารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.4.10) จำนวน 0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร แต่ละใบ แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายอะซิโตนไตรล์ 30 % (ในสารละลายกรดอะซิติก 0.1 % v/v)

3.3.4.12 สารละลายมาตรฐานโปรพิโอนาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งโปรพิโอนาลดีไฮด์ 0.25 กรัม ละลายด้วยน้ำ ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

3.3.4.13 สารละลายมาตรฐานอะซิโตนไตรล์ ความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งอะซิโตนไตรล์ 0.25 กรัม ละลายด้วยน้ำ ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

3.3.4.14 การทำปฏิกิริยานุพันธ์ (Derivatization) ด้วย DNPH-reagent

ปิเปต สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร เติม DNPH-reagent 1 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้จนเย็น กรณี สารละลายตัวอย่าง นำไปแยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรอง ด้วย syringe filter ชนิด PVDF หรือ Nylon ขนาด 0.45 หรือ 0.2 ไมโครเมตร สำหรับตรวจวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

3.3.4.15 การทำปฏิกิริยานุพันธ์ด้วย Nash' s reagent

ปิเปต สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Nash' s reagent 5 มิลลิลิตร แขนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้จนเย็น กรณี สารละลายตัวอย่าง นำไปแยกชั้น ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบความเร็วสูง ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วย กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 สำหรับตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริก

3.4 การดำเนินงาน

นำวิธีวิเคราะห์ โดย Yeh T-S และคณะ ตาม J Food Drug Anal 2013; 21: 190-7. ⁽⁷⁾ และ Xu LN และคณะ ตาม Acta Chromatogr 2012; 24:519-528. ⁽⁶⁰⁾ มาปรับปรุง พัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังและสำรวจฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร

3.4.1 พัฒนาริธีวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร

ตัวแทนกลุ่มอาหารเป็นปลาหมึกและสไปนาง

3.4.1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลาย และระยะเวลาในการสกัด free-FA ที่เหมาะสมใน ปลาหมึก และสไปนาง โดยศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ free-FA ที่ได้กลับคืน (%recovery) เมื่อสกัดด้วย น้ำ และสารละลายกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยคลื่นความถี่สูง (sonicate) ที่ระยะเวลาต่างกัน วิธีที่พัฒนาได้เหมาะสมแล้ว กำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์ ในข้อ 3.4.1.2 ที่ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และใช้วิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อการสำรวจปริมาณ free-FA

3.4.1.2 วิธีวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสไปนาง มีขั้นตอนดังนี้ นำสิ่งสกปรกออกจากตัวอย่าง แยกออกมาเฉพาะส่วนที่ใช้บริโภค หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ (ทำการวิเคราะห์ในเวลาไม่เกิน 10 วัน นับจากวันที่รับตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม ด้วยเครื่อง ชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย กรดอะซิติก 0.1 % (v/v) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้คลื่นความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที (อุณหภูมิ ไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส) เติมอะซิโตนไตรล ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ให้โปรตีนตกตะกอน เทส่วนของเหลว ประมาณ 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปแยกชั้นด้วยเครื่อง หมุนเหวี่ยงแบบความเร็วสูง ด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองสารละลาย ตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ลงในหลอดพลาสติก ได้สารละลายตัวอย่างส่วนใส (test solution) กรณีที่ตรวจวัดด้วย HPLC-UV และ LC-MS/MS นำไปทำปฏิกิริยานุพันธ์ ด้วย DNPH-reagent (ข้อ 3.3.4.14) และกรณีที่ตรวจวัดด้วย Spectrophotometer นำไปทำปฏิกิริยา

อนุพันธ์ ด้วย Nash's reagent (ข้อ 3.3.4.15) คำนวณปริมาณเทียบกับ calibration curve กรณีสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเกินช่วงของกราฟมาตรฐานให้เจือจางสารละลายตัวอย่าง ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แล้วตรวจวัดปริมาณ

สมการเส้นตรง (calibration curve) $Y = mX + b$ (3.2)

เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

Y คือ พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน

m คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

b คือ จุดตัดแกน Y

การคำนวณ

ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) = $C \times V / m$ (3.3)

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

V คือ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร) ; 1 ลิตร = 1000 มิลลิลิตร

m คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม) ; 1 กิโลกรัม = 1000 กรัม

3.4.1.3 ศึกษาความเที่ยงของการวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ระหว่างเทคนิคโครมาโตกราฟีด้วยเครื่อง HPLC-UV และ LC-MS/MS และ สเปกโตรโฟโตเมตรี ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้วัดปริมาณ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็น สไลด์ที่พบว่า มีฟอร์มาลดีไฮด์จากการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ วิธีวิเคราะห์ ตามข้อ 3.4.1.2 เมื่อได้ test solution แล้ว กรณีตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV และ LC-MS/MS ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH –reagent

3.4.1.4 ส่วนกรณีตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย Nash' s reagent

3.4.1.5 แต่ละเทคนิควิเคราะห์จำนวน 6 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

3.4.2 ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี (HPLC-UV, LC-MS/MS) และ สเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometer)

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ free-FA ด้วยวิธีที่พัฒนาจนเหมาะสมแล้วตามข้อ 3.4.1.2 ในปลาหมึก และสไลด์ โดยเลือกตัวอย่างอาหารที่ไม่พบ free-FA ใช้เป็น sample blank รายการที่ทดสอบมีดังนี้

3.4.2.1 ช่วงของการวัด (working rang) และความเป็นเส้นตรง (linearity)

ทำการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และช่วงของการวัด (working rang) โดย นำสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH-reagent และ Nash's reagent เพื่อตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer ตามลำดับ คำนวณหาสมการเส้นถดถอย (regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (method of least squares) หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995 ยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วย residual plots และทดสอบ linearity ของ working range โดยการเติมสารมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่างปลาหมึก (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง กับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาค่า R^2 เกณฑ์ยอมรับ ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995

3.4.2.2 ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐานอัลดีไฮด์ 3 ชนิด ได้แก่ ฟอร์มาลดีไฮด์ อะซีทัลดีไฮด์ และ โพรพิโอนัลดีไฮด์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดในสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการสกัดได้เป็น test solution แล้ว นำไปทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย DNPH-reagent และ Nash's reagent เพื่อตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer ตามลำดับ

3.4.2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

กำหนดค่า LOD เบื้องต้น พิจารณาจากระดับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ (2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และประเมินจากข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านมา รวมทั้งคำนึงถึงสภาพของตัวอย่างอาหารที่มีในท้องตลาด ซึ่งอาจมีฟอร์มาลดีไฮด์ตามธรรมชาติ ในการศึกษาจึงดำเนินการ 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ free-FA : เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ที่ระดับ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่าง เรียกว่า spiked sample blank คำนวณค่า $LOD = 3SD$

วิธีที่ 2 ตัวอย่างซึ่งตรวจพบ free-FA : ไม่เติมสารมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ลงในตัวอย่าง เรียกว่า sample blank คำนวณค่า $LOD = \text{ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นในตัวอย่าง (mean)} + 3SD$

ทำการวิเคราะห์ 7-10 ซ้ำ ตามข้อ 3.4.1.2 หาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ตรวจวัดได้

$$\text{การคำนวณ} \quad \text{ค่าเฉลี่ย } (\bar{x}) = \frac{\sum x_i}{n} \quad (3.4)$$

เมื่อ x_i คือ ค่าของข้อมูลแต่ละค่า
 n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน } (SD) = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.5)$$

เมื่อ x_i คือ ค่าของข้อมูลแต่ละค่า
 $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด
 n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

3.4.2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

กำหนดที่ระดับความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เป็นค่าต่ำสุดเดิมที่ห้องปฏิบัติการกำหนดไว้เพื่อการรายงานผลในการตรวจเฝ้าระวัง) ตรวจสอบยืนยันความแม่นยำและความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาหมึก และสไปนง ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มัลดีไฮด์ ให้มีความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (spiked sample blank) วิเคราะห์ 7 - 10 ซ้ำ คำนวณค่า % recovery ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่า HORRAT (Horwitz ratio) ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 3.3)

การคำนวณ

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3} \quad (3.6)$$

เมื่อ

C_1 คือ ความเข้มข้นฟอร์มัลดีไฮด์ในของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 คือ ความเข้มข้นของฟอร์มัลดีไฮด์ในตัวอย่าง

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

$$\text{RSD}(\%) = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \quad (3.7)$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ย

$$HORRAT = \frac{RSD_{obs}}{RSD_{expected}} \quad (3.8)$$

เมื่อ RSD_{obs} คือ RSD ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง

$RSD_{expected}$ คือ RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation

Horwitz's equation

$$\text{สำหรับ Repeatability, } \%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (3.9)$$

เมื่อ C เป็น อัตราส่วนความเข้มข้น (concentration ratio)

ตารางที่ 3.3 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จาก Horwitz's equation ($\text{expected } \%RSD_r$) และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ⁽⁶⁸⁾

ระดับความเข้มข้น (มก./กก.)	% recovery	Expected % RSD_r	HORRAT
100	90-107	5.2	น้อยกว่า 2
10	80-110	7.4	
1	80-110	10.5	

3.4.2.5 ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

วิเคราะห์ spiked samples ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 15.0, 30.0 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.4.1.2 จำนวน 7-10 ซ้ำ ความแม่นยำพิจารณาจากค่า % recovery และความเที่ยงพิจารณาจากค่า HORRAT ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 3.3)

ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 2 แบบ คือ การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) และ การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (intermediate precision) พิจารณาความเที่ยงของการวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบจาก HORRAT ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 3.3)

3.4.3 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty)

นำค่าความไม่แน่นอนทุกแหล่ง มาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k=2$) ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามวิธี แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งกำหนดเกณฑ์การพิจารณาความเหมาะสมของค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็น คือ predicted Horwitz's $RSD_r \times 2$ ⁽⁶⁹⁾

3.4.4 การศึกษาปริมาณ free-FA ในปลาหมึกจากการทดลองที่สภาวะต่างๆ

แบบที่ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างปลาหมึกทั้งตัว แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 1 และ 2 วัน เพื่อเลียนแบบวิธีการเก็บรักษาที่ไม่แช่เย็น

แบบที่ 2 เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง ตัวอย่างปลาหมึกเอาไส้ออก ล้างน้ำผสมเกลือและน้ำแข็ง แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 8 และ 17 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบวิธีการเก็บรักษาที่แผงขายปลาหมึกในตลาด

แบบที่ 3 เก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (freeze) ตัวอย่างปลาหมึกตามแบบที่ 2 นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ เพื่อเลียนแบบวิธีการเก็บรักษาที่ห้องเย็นก่อนกระจายสินค้าไปสู่ตลาด

แบบที่ 4 ทำให้สุกด้วยความร้อน ตัวอย่างปลาหมึกตามแบบที่ 2 จุ่มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1.5 นาที และอบด้วยเตาอบที่ 1,500 วัตต์ เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารที่อาจเปลี่ยนแปลงไปเมื่อผ่านความร้อน

แบบที่ 5 ลำไส้ปลาหมึก ที่แยกออกมาจากส่วนเนื้อ

รายละเอียด ตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 สภาวะทดลองของปลาหมึก ก่อนการตรวจวิเคราะห์ free-FA

ตัวอย่างปลาหมึกกล้วย	สภาวะที่ศึกษา
ปลาหมึกทั้งตัว 	1. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง - เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน - เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
ปลาหมึกตัดแต่ง (เอาไส้ออก ล้างด้วยน้ำผสมเกลือและน้ำแข็ง) 	2. เก็บรักษาโดยแช่น้ำแข็ง - แช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง - แช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 17 ชั่วโมง
	3. เก็บรักษาโดยแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส - เป็นเวลา 2 สัปดาห์ - เป็นเวลา 4 สัปดาห์
	4. ปิ้งให้สุกด้วยความร้อน - จุ่มในน้ำต้มเดือด เป็นเวลา 1.5 นาที  - อบด้วยเตาอบ 1,500 วัตต์ เป็นเวลา 20 นาที 
5. ลำไส้ปลาหมึก (จากปลาหมึกกล้วย)	

3.4.5 ตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก สไลนัง และเห็ด เพื่อการสำรวจเบื้องต้นของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหาร

ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้วตามข้อ 3.4.1.2 การควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์ ประกอบด้วย การวิเคราะห์แบลงค์ (blank) ใช้ สารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v) แทนตัวอย่าง และวิเคราะห์แบลงค์ ที่เติมสารมาตรฐาน (spiked blank) ทุกตัวอย่างวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate) และวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) เพื่อหา % recovery หาก % recovery น้อยกว่า 80 % ให้แก้ไขค่าปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย recovery factor และ %RPD (relative percentage difference) ต้องไม่เกิน 15 %

การคำนวณผลโดยใช้ค่าแก้ไข recovery factor (corrected recovery)

$$\text{RecoveryFactor} = \frac{100}{\% \text{recovery}} \quad (3.10)$$

$$\text{ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่แก้ค่า (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} = \text{ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์} \times \text{Recovery factor} \quad (3.11)$$

การคำนวณ % RPD ของการทำ duplicate

$$\% \text{RPD} = \frac{(\text{max} - \text{min}) \times 100}{\text{mean}} \quad (3.12)$$

เมื่อ max	คือ	ค่าสูง
min	คือ	ค่าต่ำ
mean	คือ	ค่าเฉลี่ย

3.5 การฝึกอบรม

ฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ให้แก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระยะเวลา 2 วัน เนื้อหาประกอบด้วยการบรรยายและการฝึกปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ การเตรียมตัวอย่าง การสกัด และตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสไลนัง โดยเทคนิค HPLC-UV และ Spectrophotometer

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร

4.1.1 ผลการศึกษาการสกัดฟอร์มาลดีไฮด์

จากการทดลองเมื่อใช้น้ำสกัดตัวอย่างปลาหมึกที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample) ด้วยคลีนความถี่สูง (ตามวิธีวิเคราะห์ที่อ้างอิง) พบว่าสารละลายตัวอย่างที่ได้ขึ้น ไม่เหมาะสำหรับการตรวจวัดปริมาณ เนื่องด้วยตัวอย่างปลาหมึกมีโปรตีนสูง จึงใช้อะซิโตนไตรล์ช่วยตกตะกอนโปรตีน ทำให้สารละลายใสเพียงพอต่อการวิเคราะห์ปริมาณได้ เมื่อตรวจวัดปริมาณ free-FA ด้วย HPLC-UV ผลพบว่า % recovery ที่ได้ต่ำ จึงปรับสารที่ใช้สกัด โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกรดที่ไม่รุนแรงและเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการใช้มาก่อนในการสกัด free-FA จากวัสดุหลายประเภท ได้ผลดี ไม่มีการรบกวนจากสารอื่น นำมาใช้สกัดตัวอย่าง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับการใช้น้ำสกัด ด้วยวิธีเดียวกัน ผลการวิเคราะห์พบว่า สารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) เหมาะสมที่จะใช้สกัดตัวอย่างปลาหมึก ซึ่งหากใช้กรดที่เข้มข้นสูงทำให้การตกตะกอนโปรตีนด้วย อะซิโตนไตรล์ ไม่เป็นผลดี ทำให้สารละลายตัวอย่างข้นกว่าเดิม จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดปลาหมึก ที่เติมสารละลายมาตรฐาน และสไลนงที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ปนเปื้อน ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และ สารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) ผลพบว่า % recovery (จากการวิเคราะห์ปลาหมึก) และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ (จากการวิเคราะห์สไลนง) ที่สกัดได้ด้วย สารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) มีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 4.1-4.2) สุดท้ายได้ศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด กำหนดเป็น 10, 20 และ 40 นาที ด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) ในตัวอย่างปลาหมึกที่เติมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งผลการศึกษาพบว่า % recovery ไม่แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 4.3) หากเวลาที่ใช้สกัดมากกว่า 10 นาทีทำให้อุณหภูมิขณะที่สกัดเพิ่มขึ้น ต้องคอยควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส สรุปจากผลการศึกษา วิธีที่สกัด free-FA จากปลาหมึกและสไลนงที่เหมาะสม คือสกัดโดย กรดอะซิติก 0.1% (v/v) ด้วยคลีนความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที จึงกำหนดเป็นวิธีที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก จากการสกัดด้วยน้ำ และ สารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v)

ตัวอย่าง วิเคราะห์ซ้ำที่	สกัดด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร ใช้คลื่นความถี่สูง 10 นาที			สกัดด้วย สารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v) 30 มิลลิลิตร ใช้คลื่นความถี่สูง 10 นาที		
	FA* ที่เดิม (มก./กก.)	FA* ที่ตรวจพบ (มก./กก.)	%recovery	FA* ที่เดิม (มก./กก.)	FA* ที่ตรวจพบ (มก./กก.)	%recovery
sample blank	-	0	-	-	0.20	-
spiked sample						
1	15.64	9.83	62.9	15.60	13.22	83.5
2	15.65	10.54	67.3	15.61	13.01	82.1
3	15.57	10.83	69.6	15.57	13.31	84.2
4	15.59	10.53	67.5	15.61	13.04	82.3
5	15.64	10.56	67.5	15.64	12.77	80.4
6	15.60	10.52	67.4	15.64	12.86	80.9
ค่าเฉลี่ย			67.0			82.2
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)			2.22			1.45
%RSD			3.31			1.76

หมายเหตุ * FA หมายถึง free-FA , มก./กก. คือ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในสไปนาง จากการสกัดด้วยน้ำ และ สารละลายกรดอะซิติก 0.1 % (v/v)

วิเคราะห์ซ้ำที่	ปริมาณ free - FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	สกัดด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร ใช้คลื่นความถี่สูง 10 นาที	สกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) 30 มิลลิลิตรใช้คลื่นความถี่สูง 10 นาที
1	238	483
2	242	397
3	225	415
4	223	433
5	229	464
6	269	466
ค่าเฉลี่ย	238	443
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	17	33
%RSD	7.2	7.5

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก จากการสกัดด้วยสารละลาย กรดอะซิติก 0.1 % (v/v) ใช้คลื่นความถี่สูง เป็นเวลา 10 20 และ 40 นาที

วิเคราะห์ซ้ำที่	ใช้คลื่นความถี่สูง 10 นาที			ใช้คลื่นความถี่สูง 20 นาที			ใช้คลื่นความถี่สูง 40 นาที		
	FA เดิม (มก./กก.)	FA พบ (มก./กก.)	recovery (%)	FA เดิม (มก./กก.)	FA พบ (มก./กก.)	recovery (%)	FA เดิม (มก./กก.)	FA พบ (มก./กก.)	recovery (%)
1	15.58	12.94	83.0	15.58	13.74	88.2	15.54	12.61	81.2
2	15.64	12.72	81.3	15.56	13.53	87.0	15.54	13.03	83.8
3	15.57	12.40	79.6	15.59	13.63	87.4	15.58	12.96	83.2
4	15.56	13.53	87.0	15.62	13.29	85.1	15.64	12.85	82.2
5	15.60	13.32	85.4	15.58	13.05	83.8	15.63	13.05	83.5
6	15.61	12.93	82.8	15.58	13.57	87.1	15.62	12.43	79.6
ค่าเฉลี่ย			83.2			86.4			82.2
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)			2.67			1.66			1.64
%RSD			3.21			1.92			2.00

หมายเหตุ * FA หมายถึง free-FA , มก./กก. คือ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4.1.2 ผลการศึกษาความเที่ยงของการวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer

การตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ในตัวอย่างสไบนางที่พบฟอร์มาลดีไฮด์ ด้วย เครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer ผลตามตารางที่ 4.4 ตรวจพบปริมาณ free-FA มีค่าเฉลี่ยสูงสุด โดย Spectrophotometer (456 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งใกล้เคียงกับการวัดโดย LC-MS/MS และมีความเที่ยงแสดงเป็น %RSD เท่ากับ 8.0 และ 12.5 ตามลำดับ ขณะที่การวัดด้วย HPLC-UV ได้ปริมาณ free-FA เฉลี่ย และ %RSD ต่ำสุด เมื่อทดสอบโดยใช้ One-way ANOVA พบว่าปริมาณ free-FA ที่วัดได้จากทั้ง 3 เทคนิคนี้ไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า $F_{cal} (0.166) < F_{crit} (3.682)$ และ $P\text{-value} = 0.848$

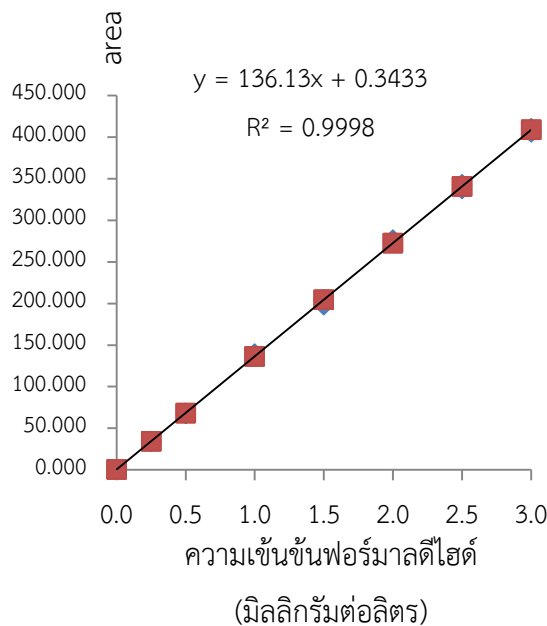
ตารางที่ 4.4 ปริมาณ free-FA ในสไลด์ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer

วิเคราะห์ซ้ำที่	ปริมาณ free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	โครมาโตกราฟี		สเปกโตรโฟโตเมทรี
	HPLC-UV	LC-MS/MS	Spectrophotometer
1	483	472	503
2	397	396	424
3	415	405	444
4	433	456	468
5	464	448	487
6	466	555	409
ค่าเฉลี่ย	443	455	456
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	33	57	37
%RSD	7.5	12.5	8.0

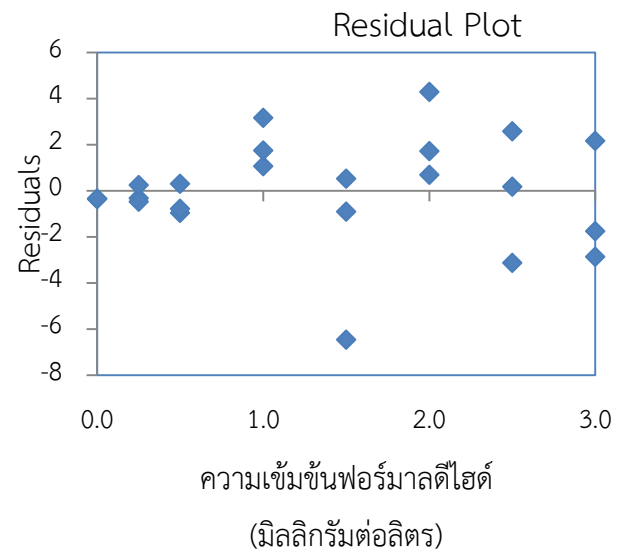
4.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

4.2.1 ช่วงของการวัด (working rang) และความเป็นเส้นตรง (linearity)

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือค่า absorbance ในแกน y กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ในแกน x จากการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV (รูป 4.1) LC-MS/MS (รูปที่ 4.2) และ Spectrophotometer (รูปที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงและกราฟ residual plot พบการกระจายตัวของ y-residual อยู่รอบค่า 0 เป็นการยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้น จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมใหม่ทุกครั้งพบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.995 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 0.9986 และ 0.9999 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าการวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเครื่อง HPLC-UV , LC-MS/MS และ Spectrophotometer มีความเป็นเส้นตรง ที่สามารถพิสูจน์ได้

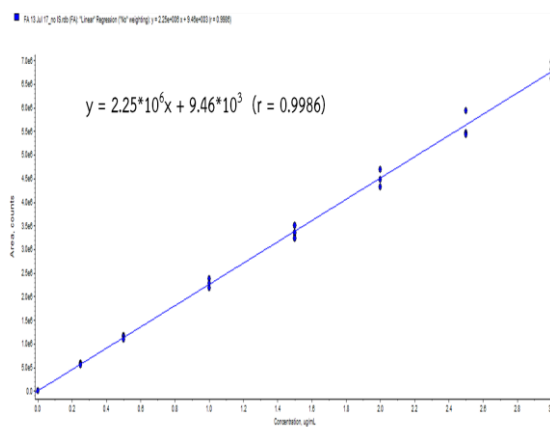


(ก)

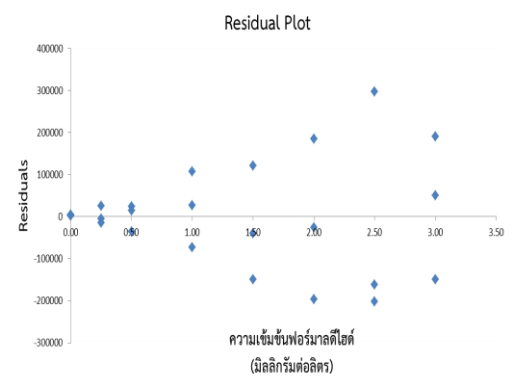


(ข)

ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ กับพื้นที่ใต้พีค ตรวจวัดด้วย HPLC-UV ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร (ก) Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residual รอบค่า 0 (ข)

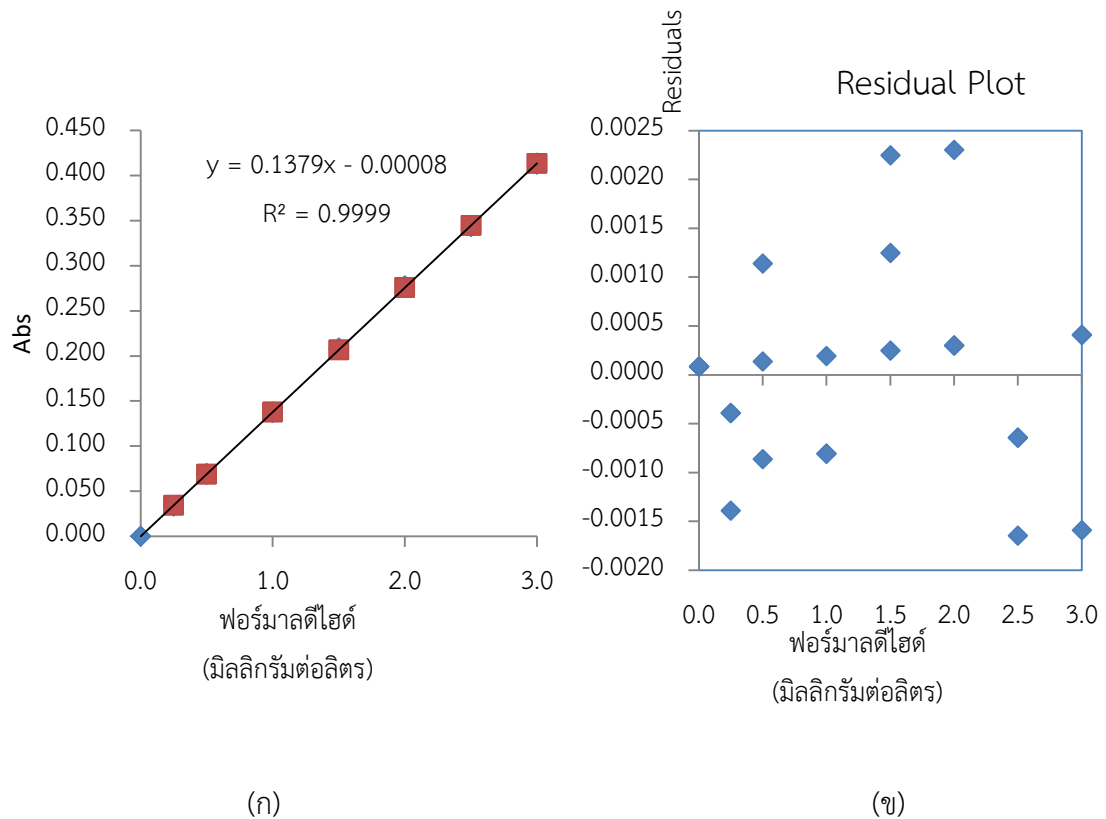


(ก)



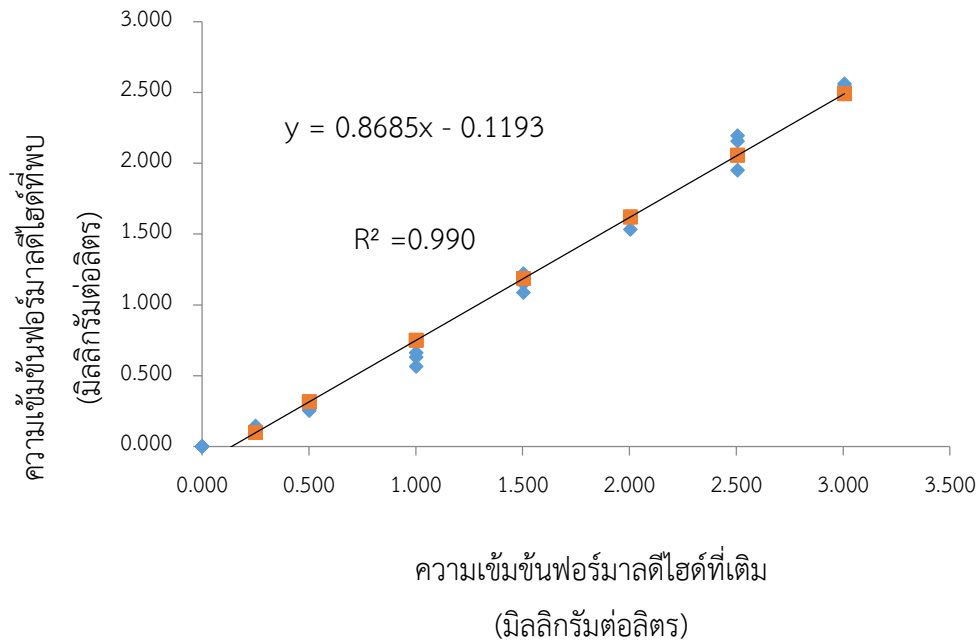
(ข)

ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ กับพื้นที่ใต้พีค ตรวจวัดด้วย LC-MS/MS ที่การทรานสลิชัน m/z 209/163 (ก) และ Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residual รอบค่า 0 (ข)

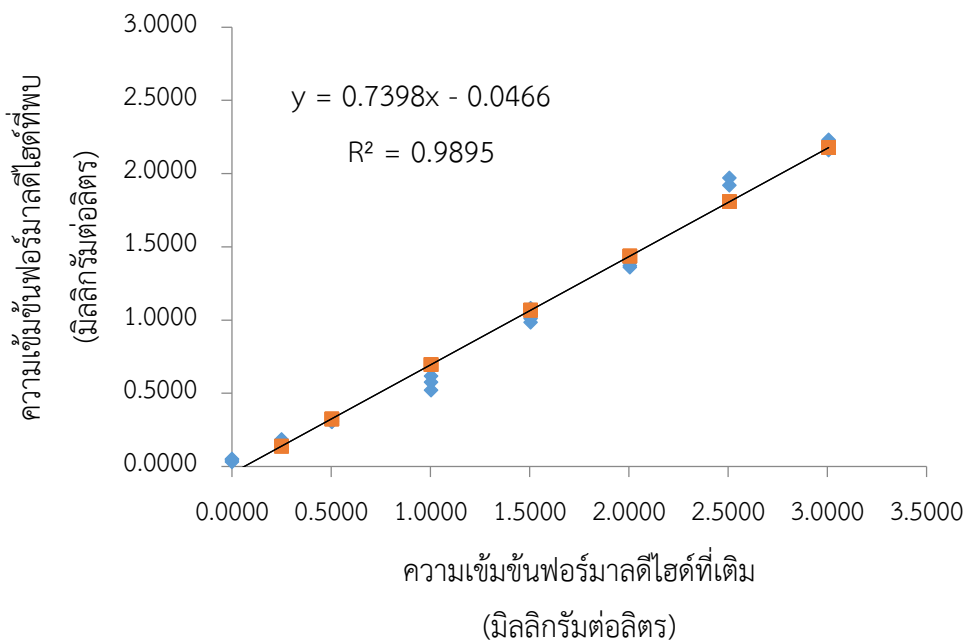


ภาพที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ กับ absorbance (Abs) ตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตร (ก) และ Residual plot แสดงการกระจายตัวของ y-residual รอบค่า 0 (ข)

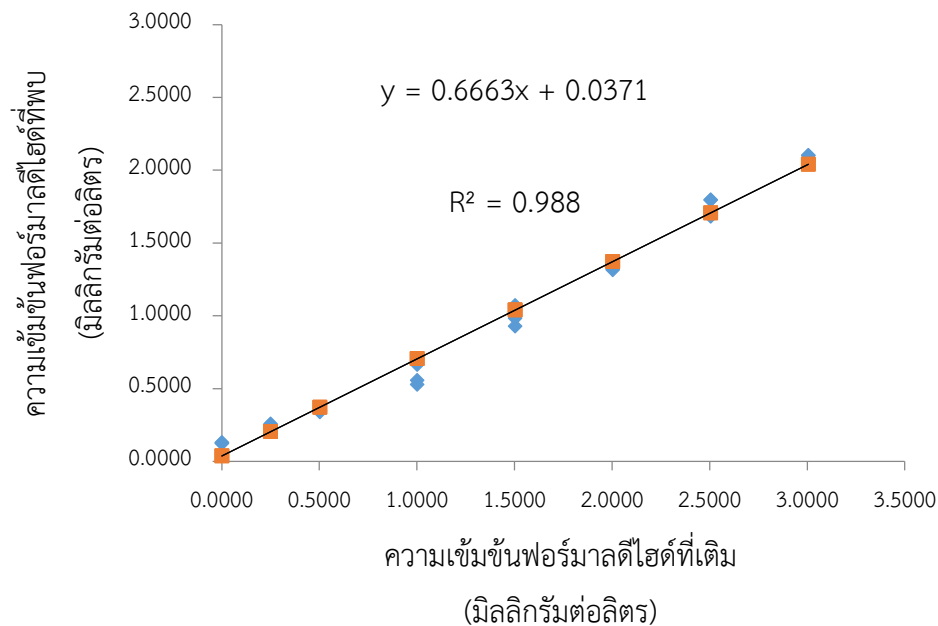
ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของ working range จากการเติมสารมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ในตัวอย่างปลาหมึก (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับกราฟมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ระดับ ละ 3 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV LC-MS/MS และ Spectrophotometer เมื่อสร้างกราฟ ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ ได้กราฟความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.4 – 4.6 คำนวณหาค่า R^2 ได้เท่ากับ 0.990, 0.9895 และ 0.988 ซึ่งไม่เป็นไปตาม เกณฑ์ยอมรับ (ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ลักษณะของสารฟอร์มาลดีไฮด์เอง ที่มีความไวในการจับกับสารอื่นๆ ทำให้ค่าที่ได้กลับคืน (recovery) ไม่เป็นไปตามเกณฑ์



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติม และปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่างเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติม และปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่างเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

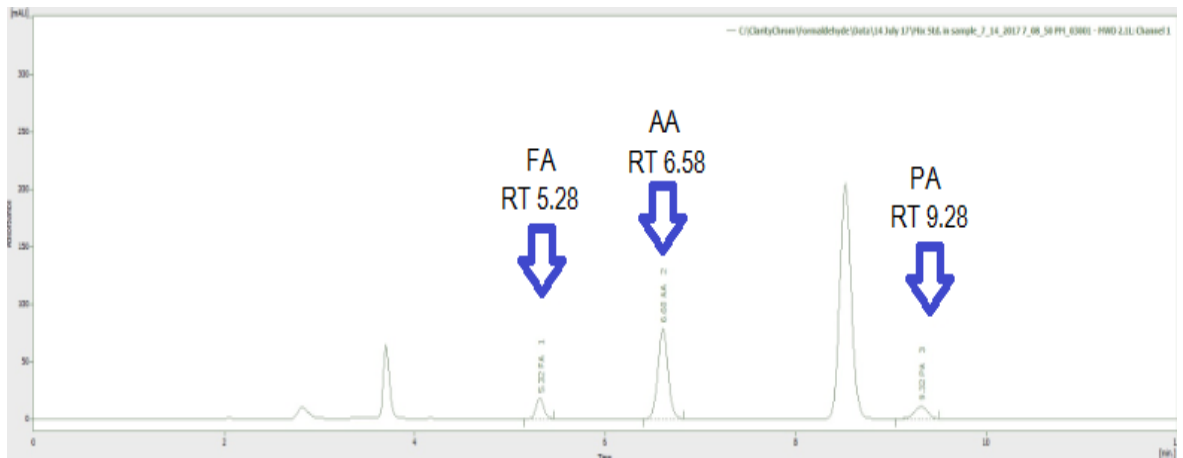


ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติม และปริมาณที่ตรวจพบ ในตัวอย่างเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer

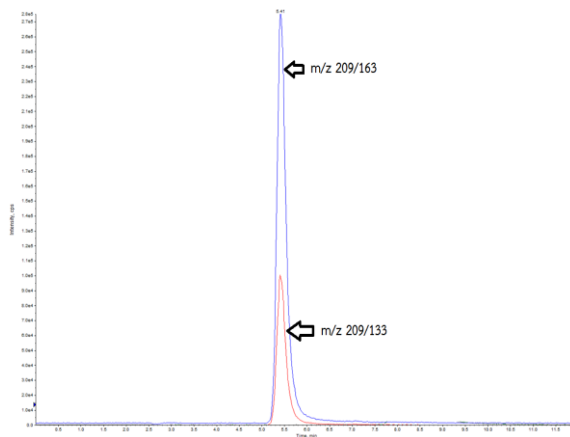
4.2.2 ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอัลดีไฮด์ 3 ชนิด ได้แก่ ฟอร์มาลดีไฮด์ อะซีทาลดีไฮด์ และ โพรพิโอนาลดีไฮด์ เติมในสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทั้ง 3 เครื่อง ผลโครมาโทแกรม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV พบว่าพีคของอัลดีไฮด์ทั้ง 3 ชนิดแยกกันดีตาม RT (retention time) ที่ปรากฏ ของฟอร์มาลดีไฮด์ (FA) อะซีทาลดีไฮด์ (AA) และ โพรพิโอนาลดีไฮด์ (PA) ที่ 5.28 , 6.58 และ 9.28 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7)

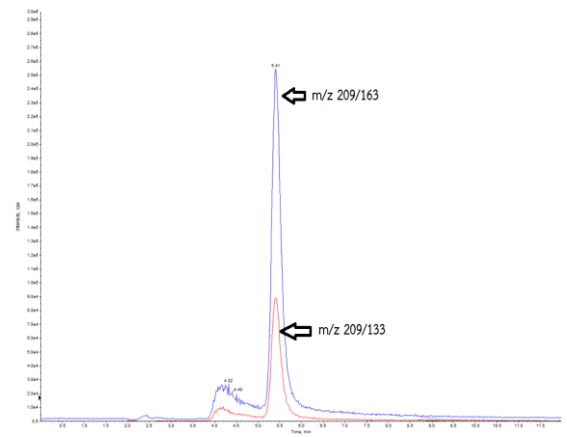
การตรวจวัดด้วย LC-MS/MS เมื่อตรวจติดตามการทรานสิชันของไอออน จากไอออนแม่ (precursor ion) เป็นไอออนผลิตภัณฑ์ (product ion) คือ m/z 209/163 และ m/z 209/133 (ภาพที่ 4.8) พบว่าแม้จะมีอะซีทาลดีไฮด์ (AA) และ โพรพิโอนาลดีไฮด์ (PA) ผลของการทรานสิชันของฟอร์มาลดีไฮด์ มี ion ratio และ retention time ไม่แตกต่างจากเดิม คือ ไม่เกินเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดที่เติมไม่มีผลต่อการวัดฟอร์มาลดีไฮด์



ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างที่เติมอัลดีไฮด์ 3 ชนิด ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-UV : ฟอร์มาลดีไฮด์ (FA) อะซีทาลดีไฮด์ (AA) โพรพิโอนาลดีไฮด์ (PA)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.8 โครมาโทแกรมของฟอร์มาลดีไฮด์ ตรวจสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่ m/z 209/163 และ 209/133 (ก) สารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) สารละลายตัวอย่างที่เติมฟอร์มาลดีไฮด์ อะซีทาลดีไฮด์ และโพรพิโอนาลดีไฮด์

ผลการตรวจวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 413 นาโนเมตรเมื่อทำปฏิกิริยานุพันธ์ด้วย Nash's reagent ถ้าสารละลายตัวอย่างมีฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยาได้สารละลายสีเหลือง และระดับความเข้มของสีจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในสารละลายตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น แต่อะซีทาลดีไฮด์ และ โพรพิโอนาลดีไฮด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับ Nash's reagent จะไม่เกิดสี ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัลดีไฮด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่รบกวนการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์

4.2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

4.2.3.1 ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV

การตรวจวิเคราะห์ ปลาหมึกสด และปลาหมึกไม่สด ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 7 ซ้ำ ด้วยเครื่อง HPLC-UV ผลที่ได้นำมาคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) และผลการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในสไบนาง จำนวน 7 ซ้ำ ค่าคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.5 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก และสไบนาง ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

ตัวอย่าง	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)					
	ค่าเฉลี่ย ที่เติม	ค่าเฉลี่ย ที่พบ	SD	3SD	ค่าเฉลี่ย+3SD	LOD
ปลาหมึกสด						
- Spiked sample blank (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	2.43	1.43	0.21	0.63	-	0.63
ปลาหมึกไม่สด						
- Spiked sample blank (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	2.42	0.96	0.14	0.42	-	0.42
สไบนาง						
- Sample blank	-	0.08	0.13	0.39	0.47	0.47

4.2.3.2 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การตรวจวิเคราะห์ ปลาหมึกสด และปลาหมึกไม่สด ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 7 ซ้ำด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลที่ได้นำมาคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

ตัวอย่าง	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)					
	ค่าเฉลี่ย ที่เติม	ค่าเฉลี่ย ที่พบ	SD	3SD	ค่าเฉลี่ย+3SD	LOD
ปลาหมึกสด						
- Spiked sample blank (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	2.43	1.02	0.19	0.57	-	0.57
ปลาหมึกไม่สด						
- Spiked sample blank (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	2.42	0.36	0.06	0.18	-	0.18

4.2.3.3 ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer

การตรวจวิเคราะห์ ปลาหมึกสด และปลาหมึกไม่สด ที่พบฟอร์มาลดีไฮด์ (sample blank) จำนวน 7 ซ้ำด้วยเครื่อง Spectrophotometer ผลที่ได้นำมาคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) และผลการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในสไลบนางที่พบฟอร์มาลดีไฮด์ (sample blank) จำนวน 7 ซ้ำ ค่าคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 1.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก และสับปะรด ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

ตัวอย่าง	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)					
	จำนวนซ้ำ (n)	ค่าเฉลี่ย ที่พบ	SD	3SD	ค่าเฉลี่ย+3SD	LOD
ปลาหมึกสด						
-Sample blank	7	0.36	0.08	0.24	0.60	0.60
ปลาหมึกไม่สด						
-Sample blank	7	1.69	0.21	0.63	2.32	2.32
สับปะรด						
-Sample blank	7	0.85	0.11	0.33	1.18	1.18

สรุปขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของวิธีวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก และสับปะรด ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC- MS/MS และ Spectrophotometer มีค่าที่แตกต่างกัน เนื่องจากความสดใหม่ของตัวอย่างที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ หากคำนึงถึงสภาพของตัวอย่างในท้องตลาดมีทั้งสดและไม่สดเป็นเรื่องที่ควบคุมได้ยาก จึงกำหนดขีดจำกัดการตรวจพบแบบชั่วคราว (temporary LOD) สำหรับอาหาร เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ต่ำสุดที่เติมในตัวอย่าง แล้วสามารถตรวจวัดได้ และเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการคำนวณ เมื่อใช้ตัวอย่างที่พบฟอร์มาลดีไฮด์มาทำการศึกษาโดยวิธี สเปกโตรโฟโตเมทรี

4.2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการตรวจวิเคราะห์ ปลาหมึกสด และปลาหมึกไม่สด ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ระดับ LOQ) จำนวน 7-10 ซ้ำ ด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer ผลที่ได้ตามตารางที่ 4.8 พบว่าตัวอย่างปลาหมึกสด มีค่าเฉลี่ยของ % recovery ตั้งแต่ 48.8 - 60.1 % ส่วนปลาหมึกไม่สด มีค่าเฉลี่ยของ % recovery ตั้งแต่ 26.4 - 37.7 และสับปะรด มีค่าเฉลี่ยของ % recovery ตั้งแต่ 70.0 - 76.2 ซึ่งค่าเฉลี่ยของ % recovery ต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ แต่พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่เติม เมื่อคำนวณ HORRAT มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ดังนั้นจึงกำหนดขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณแบบชั่วคราว (temporary LOQ) เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสไปนาง

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ยของ	วิเคราะห์	
	FA ที่เติม	(n)	Free-FA ที่พบ	% recovery	ภายในวันเดียวกัน	
	(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		% RSD	HORRAT
HPLC-UV						
ปลาหมึกสด	5.04	7	3.03	60.1	8.56	1.1
ปลาหมึกไม่สด	5.04	8	1.90	37.7	12.3	1.5
สไปนาง*	4.84	10	3.77	76.2	2.63	0.3
LC-MS/MS						
ปลาหมึกสด	5.04	10	2.46	48.8	8.58	1.0
ปลาหมึกไม่สด**	5.04	8	1.69	26.4	13.8	1.7
Spectrophotometer						
ปลาหมึก สด	5.04	10	3.19	56.2	6.71	0.8
ปลาหมึกไม่สด	5.04	8	3.27	31.4	6.52	0.8
สไปนาง***	4.84	10	4.24	70.0	4.33	0.5

หมายเหตุ * สไปนาง พบ free-FA เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

** ปลาหมึกไม่สด พบ free-FA เท่ากับ 0.36 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

*** สไปนาง พบ free-FA เท่ากับ 0.85 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4.2.5 ความเที่ยง (precision) และ ความแม่นยำ (accuracy)

4.2.5.1 ตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปลาหมึกสด ปลาหมึกไม่สด และสไปนาง ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้น 15, 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วย HPLC-UV ผลที่ได้ตามตารางที่ 4.9 พบว่าความแม่นยำ จากค่าเฉลี่ย % recovery ของปลาหมึกไม่สดต่ำกว่า ปลาหมึกสด และปลาหมึกทั้ง 2 ลักษณะ ส่วนมาก % recovery ต่ำกว่า 80 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ขณะที่ค่าเฉลี่ย % recovery ของสไปนางสูงกว่าของปลาหมึก และสูงกว่า 80 ที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.88 – 11.0 และการวิเคราะห์ต่างวัน (intermediate precision) มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 5.41–9.10 เมื่อดำเนินการ HORRAT พบว่าทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบความเที่ยง (%RSD) และความแม่นยำ (% recovery) ของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสไลนางด้วยเครื่อง HPLC-UV

ชนิดตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ (n)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ยของ % recovery	วิเคราะห์ซ้ำ		วิเคราะห์ซ้ำต่างวัน	
	FA ที่เติม		Free-FA ที่พบ		ภายในวันเดียวกัน			
	(มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม)		(มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม)		%RSD,	HORRAT	%RSD,	HORRAT
ปลาหมึกสด								
Sample blank		7	ไม่พบ					
Spiked sample	14.9	10	10.3	69.1	6.92	1.0		
blank	29.9	10	20.3	67.9	5.06	0.8		
	59.8	10	46.1	77.1	5.60	1.0		
	59.1	9	48.1	81.4	4.54	0.8	5.41	0.6
ปลาหมึกไม่สด								
Sample blank		7	ไม่พบ					
Spiked sample	14.8	8	6.22	42.0	11.0	1.6		
blank	28.7	8	14.7	51.2	2.94	0.5		
	57.5	8	35.4	61.6	2.88	0.5		
สไลนาง								
Sample blank		7	0.08					
Spiked sample	14.5	10	12.5	85.7	4.65	0.7		
blank	28.9	9	25.8	89.0	6.86	1.1		
	57.9	10	45.0	77.6	6.86	1.2		
	58.0*	10	40.0	68.1	7.04	1.2	9.10	1.6

หมายเหตุ * พบ free-FA ในสไลนาง (sample blank) เฉลี่ยเท่ากับ 2.93 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4.2.5.2 ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปลาหมึกและสไลนาง ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ระดับความเข้มข้น 15, 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลตามตารางที่ 4.10 พบว่าความแม่นยำ จากค่าเฉลี่ย % recovery ของปลาหมึกไม่สด ต่ำกว่าของปลาหมึกสด และปลาหมึกทั้ง 2 ลักษณะ ส่วนมาก % recovery ต่ำกว่า 80 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 3.65-9.71 คำนวณค่า

HORRAT อยู่ในช่วง 0.6 - 1.6 และการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (intermediate precision) มีค่า %RSD เท่ากับ 5.2 เมื่อคำนวณค่า HORRAT พบว่าทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ชนิดตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ยของ	วิเคราะห์		วิเคราะห์ต่างวัน	
	FA ที่เติม	(n)	Free-FA ที่พบ	%recovery	ภายในวันเดียวกัน		%RSD	HORRAT
	(มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม)		(มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม)		%RSD	HORRAT		
ปลาหมึกสด								
Sample blank		7	0.36					
Spiked sample	14.9	10	9.52	63.9	6.91	1.0		
blank	29.9	10	19.4	64.9	5.73	0.9		
	59.8	10	47.4	79.3	5.81	1.0	5.20	0.9
	59.1	9	45.6	77.2	9.38	1.6		
ปลาหมึกไม่สด								
Sample blank		7	1.69					
Spiked sample	14.8	8	5.34	33.6	9.71	1.4		
blank	28.7	8	12.4	42.0	3.65	0.6		
	57.5	8	32.7	56.2	3.72	0.6		

4.2.5.3 ตรวจวัดปริมาณ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปลาหมึกสด ปลาหมึกไม่สด และสไปนาง ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์ ที่ระดับความเข้มข้น 15, 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ผลที่ได้ตามตารางที่ 4.11 พบว่าความแม่นยำ จากค่าเฉลี่ย %recovery ของปลาหมึกไม่สด ต่ำกว่า ปลาหมึกสด และปลาหมึกทั้ง 2 ลักษณะ % recovery ต่ำกว่า 80 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ขณะที่ค่าเฉลี่ย % recovery ของสไปนางสูงกว่าของปลาหมึก และสูงกว่า 80% ที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) และการวิเคราะห์ต่างวัน (intermediate precision) เมื่อคำนวณค่า HORRAT พบว่าทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสับปะรด ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ชนิดตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	จำนวนซ้ำ (n)	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ยของ %recovery	วิเคราะห์ภายในวัน เดียวกัน (intra-day)		วิเคราะห์ต่างวัน (inter-day)	
	FA ที่เติม		Free-FA ที่พบ		%RSD _r	HORRAT	%RSD _r	HORRAT
	(มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม)		(มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม)					
ปลาหมึกสด								
Sample blank:	0	7	0.36					
Spiked sample	14.9	10	10.5	68.1	5.60	0.8		
blank	29.9	10	20.3	66.7	4.29	0.7		
	59.8	10	45.4	75.3	7.17	1.3	7.69	0.9
	59.1	9	46.6	78.2	8.31	1.5		
ปลาหมึกไม่สด								
Sample blank	0	7	1.69					
Spiked sample	14.8	8	7.14	36.8	8.89	1.3		
blank	28.7	8	14.9	46.0	4.79	0.8		
	57.5	8	34.2	56.5	3.98	0.7		
สับปะรด								
Sample blank:	0	7	0.85					
Spiked sample	14.5	10	12.6	81.0	3.54	0.5		
blank	28.9	9	24.5	81.8	6.28	1.0		
	57.9	10	49.5	84.0	4.92	0.9	5.06	0.6
	58.0*	10	48.9	79.3	5.45	0.9		

หมายเหตุ * พบ free-FA ใน สับปะรด (sample blank) เฉลี่ยเท่ากับ 2.93 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

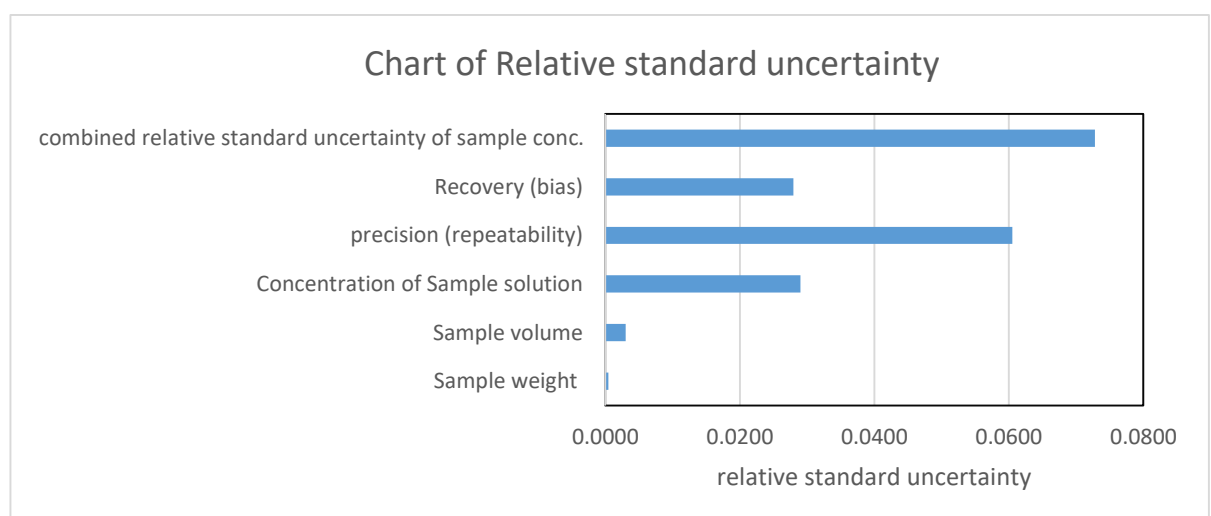
4.2.6 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนมาจาก การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง เครื่องแก้วที่ใช้วัดปริมาตร ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน recovery (bias) และ precision ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย ของการตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer มีค่าเท่ากับ 1.32, 1.91, และ 1.18 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และรายงานผลจากการคำนวณที่ระดับความเข้มข้นของ free-FA ประมาณ 9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เมื่อวิเคราะห์ซ้ำ 2 ครั้ง ได้ดังนี้ 9.05 ± 1.32 , 9.04 ± 1.91 , และ 9.16 ± 1.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 15, 21 และ 13 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12, 4.13, 4.14) แหล่งของความไม่แน่นอนเรียงจากมากไปหาน้อย ดังนี้ precision, ความเข้มข้นของ free-FA ในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน, recovery, เครื่องแก้วที่ใช้วัดปริมาตร, และการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (ภาพที่ 4.9, 4.10 และ 4.11)

ตารางที่ 4.12 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง HPLC-UV

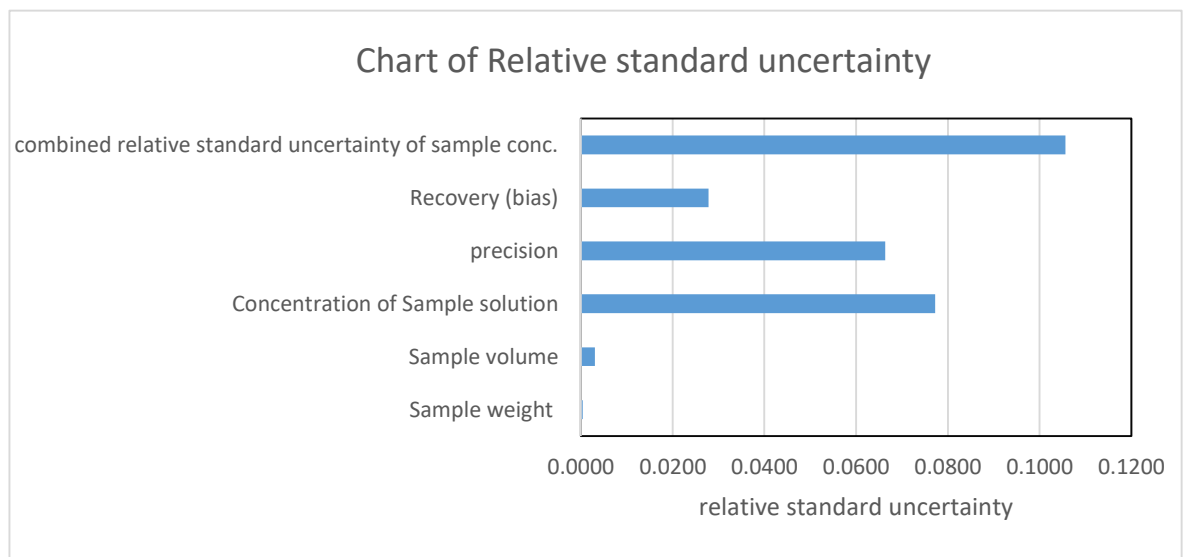
Components	Value, x	Unit	Standard uncertainty, u(x)	Relative standard uncertainty, u (x)/x
Sample weight (Ms)	5.005	g	0.00219	0.000438
Sample volume (Vs)	50.0	mL	0.1517	0.00303
Concentration of Sample solution (Cs)	0.905	$\mu\text{g/mL}$	0.0263	0.0290
precision (repeatability)	100	%	6.05	0.0605
Recovery (bias)	0.60	ratio (Rm)	0.0168	0.0280
combined relative standard uncertainty of sample conc.				0.073
Standard uncertainty (u_c)				0.66
Expanded Uncertainty at C.I. 95 % (k=2)				1.32
Report value : $9.05 \pm 1.32 \mu\text{g/g}$ หรือ mg/kg ; (15 %)				



ภาพที่ 4.9 ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหารด้วยเครื่อง HPLC-UV

ตารางที่ 4.13 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

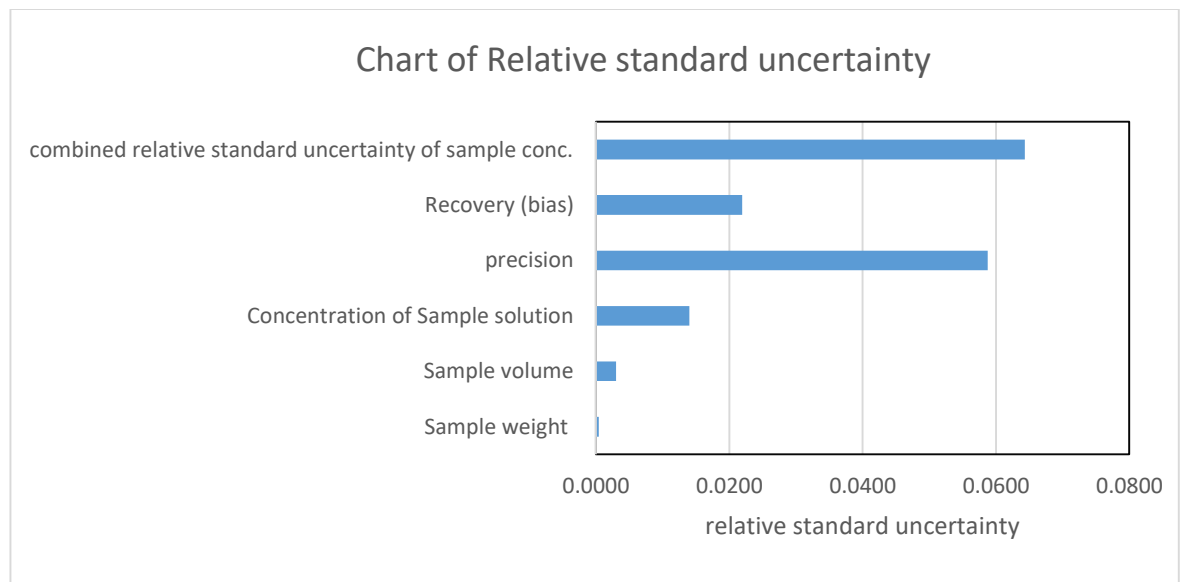
Components	Value, x	Unit	Standard uncertainty, u(x)	Relative standard uncertainty, u (x)/x
Sample weight M_s	5.005	g	0.00219	0.000438
Sample volume V_s	50.0	mL	0.1517	0.00303
Concentration of Sample solution C_s	0.904	$\mu\text{g/mL}$	0.0699	0.0773
precision	100	%	6.63	0.0663
Recovery (bias)	0.49	ratio (Rm)	0.0136	0.0279
combined relative standard uncertainty of sample conc.				0.106
Standard uncertainty (u_c)				0.96
Expanded Uncertainty at C.I. 95 % (k=2)				1.91
Report value : $9.04 \pm 1.91 \mu\text{g/g}$; (21%)				



ภาพที่ 4.10 ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหารด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ตารางที่ 4.14 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

Components	Value, x	Unit	Standard uncertainty, u (x)	Relative standard uncertainty, u (x)/x
Sample weight M_s	5.005	g	0.00219	0.000438
Sample volume V_s	50.0	mL	0.1517	0.00303
Concentration of Sample solution C_s	0.917	$\mu\text{g/mL}$	0.0128	0.0140
precision	100	%	5.88	0.0588
Recovery (bias)	0.56	ratio (Rm)	0.0123	0.0219
combined relative standard uncertainty of sample conc.				0.064
Standard uncertainty (u_c)				0.59
Expanded Uncertainty at C.I. 95 % (k=2)				1.18
Report value : $9.16 \pm 1.18 \mu\text{g/g}$; (13 %)				



ภาพที่ 4.11 ความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของการวิเคราะห์ free-FA ในอาหารด้วยเครื่อง Spectrophotometer

4.3 ผลการศึกษาปริมาณ free-FA ในปลาหมึกจากการทดลองที่สภาวะต่างๆ

แบบที่ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างปลาหมึกทั้งตัว เริ่มต้นปลาหมึกมีปริมาณ free-FA เฉลี่ยเท่ากับ 3.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อวางทิ้งไว้เป็นเวลา 1 และ 2 วัน ตรวจวิเคราะห์พบปริมาณ free-FA เฉลี่ยเท่ากับ 4.74 และ 7.67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.15) เมื่อปลาหมึกเริ่มเน่าปริมาณ free-FA เพิ่มขึ้น

แบบที่ 2 เก็บรักษาโดยการแช่น้ำแข็ง ตัวอย่างปลาหมึกเอาไส้ออก ล้างน้ำผสมเกลือและน้ำแข็ง เริ่มต้นปลาหมึกมีปริมาณ free-FA เฉลี่ยเท่ากับ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำไปแช่น้ำแข็ง 8 และ 17 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณ free-FA เฉลี่ยเท่ากับ 1.45 และ 1.46 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า ระดับ LOD (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

แบบที่ 3 เก็บรักษาโดยการแช่แข็ง ปลาหมึกที่ใช้เช่นเดียวกับแบบที่ 2 เมื่อนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ตรวจพบปริมาณ free-FA เฉลี่ยเท่ากับ 2.40 และ 0.97 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงและต่ำกว่า ระดับ LOD (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

แบบที่ 4 การทำให้สุกด้วยความร้อน ปลาหมึกที่ใช้เช่นเดียวกับแบบที่ 2 จากการลวกในน้ำเดือดเป็นเวลา 1.5 นาที และอบด้วยเตาอบที่ 1,500 วัตต์ เป็นเวลา 20 นาที พบว่ามีปริมาณ free-FA เฉลี่ยเท่ากับ 4.02 และ 14.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่ในการปรุงอาหารจะทำให้น้ำหนักของตัวอย่างหายไประหว่างการปรุงเรียกว่า “cooking loss” ในการทดลองจะบันทึกน้ำหนักก่อนและหลังเพื่อคำนวณหา % cooking loss เพื่อคำนวณปริมาณ free-FA กลับไปที่น้ำหนักสดก่อนปรุงอาหาร ซึ่งพบว่าการลวกในน้ำต้มเดือด และการอบปลาหมึกดังที่กล่าวมาข้างต้น มี % cooking loss เท่ากับ 16.1 และ 58.8 ตามลำดับ และเมื่อนำ % cooking loss มาปรับค่า free-FA เป็นน้ำหนักก่อนปรุง จะได้ free-FA เฉลี่ย เท่ากับ 3.37 และ 6.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

แบบที่ 5 นำปลาหมึก ตรวจพบ free-FA เท่ากับ 324 ± 47.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ free-FA ในปลาหมึกจากการทดลองในสภาวะต่างๆ

ลำดับที่	ปริมาณ free-FA * (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV												
	สภาวะการเก็บรักษา								ปรุงอาหาร (ปลาหมึก (A))				ลำไส้ ปลาหมึก (intestine)
	ปลาหมึกทั้งตัว			ปลาหมึกเอาไส้ออก ล้างน้ำผสมเกลือและน้ำแข็ง (A)					ต้มในน้ำเดือด 1.5 นาที		อบ 1,500 วัตต์ 20 นาที		
	เริ่มต้น	เก็บไว้ 1 วัน	เก็บไว้ 2 วัน	เริ่มต้น	แช่	แช่	แช่เย็น	แช่เย็น	ค่าที่วัดได้	ค่าที่ คำนวณ กลับ	ค่าที่วัดได้	ค่าที่ คำนวณ กลับ	
					น้ำแข็ง 8 ชั่วโมง	น้ำแข็ง 17 ชั่วโมง	-20 °C 2 สัปดาห์	-20 °C 4 สัปดาห์					
1	3.90	4.44	5.82	1.94	1.45	1.94	2.86	0.89	5.89	4.94	16.8	6.92	282
2	4.20	7.23	6.89	2.09	1.28	3.35	1.88	0.81	3.94	3.31	17.3	7.12	313
3	4.48	2.36	8.04	2.12	1.31	0.64	1.55	1.02	3.52	2.96	16.0	6.57	366
4	3.02	4.65	7.14	1.99	1.43	1.14	1.78	0.80	5.77	4.84	16.2	6.66	289
5	3.34	3.32	11.7	2.38	1.72	1.18	2.72	1.14	3.91	3.28	13.8	5.67	327
6	2.38	5.78	6.76	2.78	1.57	0.83	3.23	0.78	3.28	2.75	13.2	5.45	417
7	3.14	5.38	6.96	1.44	1.44	0.78	2.59	1.25	2.99	2.50	10.9	4.50	279
8	2.76	4.77	8.07	1.30	1.40	1.84	2.58	1.10	2.86	2.40	13.2	5.42	322
ค่าเฉลี่ย	3.40	4.74	7.67	2.00	1.45	1.46	2.40	0.97	4.02	3.37	14.68	6.04	324
SD	0.73	1.49	1.78	0.47	0.14	0.90	0.59	0.18	1.18	0.99	2.23	0.91	47.1

หมายเหตุ * แสดงปริมาณ free-FA โดยไม่ใช้ค่า LOD และ LOQ มากำหนด

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึก สไลนัง และเห็ด เพื่อการสำรวจเบื้องต้นของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหาร

วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาให้เหมาะสมตามข้อ 3.4.2.2 และตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV ซึ่งได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แล้ว นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในตัวอย่างทั้งหมด 118 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์ ปลาหมึกนำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 23 ตัวอย่าง ตรวจพบ free-FA เพียง 1 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบ 6.43 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปลาหมึกในประเทศ จำนวน 40 ตัวอย่าง ตรวจพบ free-FA จำนวน 7 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบ อยู่ในช่วง <5 - 7.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 4.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนที่พบทั้งหมด 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.7) สไลนัง (สีดำ) จำนวน 34 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ free-FA และเห็ด จำนวน 21 ตัวอย่าง ตรวจพบ free-FA จำนวน 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85.7) ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง <5 - 22.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.16) การวิเคราะห์เห็ดด้วยวิธีนี้ บางตัวอย่าง มีสารรบกวนที่ทำให้ตรวจวิเคราะห์ไม่ได้

ตารางที่ 4.16 ผลการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก สไลนัง และเห็ด

ชนิด	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่างที่พบ	ปริมาณ free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย*
ปลาหมึก	63	8	<5.0 - 7.14	4.36
- จากต่างประเทศ	23	1	- 6.43 -	-
- ในประเทศ	40	7	<5.0 - 7.14	4.06
สไลนัง (สีดำ)	34	0	-	-
เห็ด	21	18	<5.0 - 22.89	10.81

หมายเหตุ ผลวิเคราะห์ <LOD (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) รายงานเป็นไม่พบ และ

LOD > ผลวิเคราะห์ ≤ LOQ (5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) รายงานเป็น

< 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

* คำนวณเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบ กรณีที่พบ <5.0 คิดเป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4.5 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร : ปลาหมึกและสับปะรด

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร ให้แก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง และจากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในวันที่ 18-19 ธันวาคม 2560 ณ ห้องประชุม 806 อาคาร 8 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ. นนทบุรี โดยการฝึกอบรมประกอบด้วย การบรรยาย และฝึกปฏิบัติในการเตรียมตัวอย่าง การสกัด ตรวจวิเคราะห์และหาปริมาณ free-FA ในปลาหมึก และสับปะรด โดยเทคนิค Spectrophotometer และ HPLC-UV ณ ห้องปฏิบัติการฝ่ายสารพิษสารปนเปื้อนและไดออกซิน สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



ภาพที่ 4.12 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร : ปลาหมึกและสับปะรด วันที่ 18-19 ธันวาคม 2560 ณ ห้องประชุม 806 อาคาร 8 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ. นนทบุรี

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุป

5.1 วิจารณ์

ฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหารอาจมาจากหลายปัจจัย คือ เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ มาจากการรมเพื่อฆ่าแมลง จากการปรุงอาหาร หรือเคลื่อนย้าย (migration) มาจากภาชนะบรรจุซึ่งทำจากเรซินที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ ในเนยบางชนิดมีการใช้เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยคุณลักษณะของสารที่มีขนาดเล็ก และมีความไวต่อการทำปฏิกิริยา จึงอาจพบได้ทั้งในรูปสารอิสระ (free-FA) และในรูปที่รวมอยู่กับสารอื่น (bound-FA) เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) กรดอะมิโน (amino acid) เอมีน (amine) ครีเอติน (creatine) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นต้น bound-FA เป็นสารกลุ่มใหญ่ ร้อยละ 50 - 80 ไม่สามารถแยกออกมาเป็นสารอิสระได้⁽¹⁰⁾ การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเป็นเรื่องที่ท้าทาย โดยเฉพาะการตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังการเติมสารลงในอาหาร ซึ่งผิดกฎหมาย ผลจากการเฝ้าระวังสถานการณ์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารของไทย ยังมีการตรวจพบในอาหารต่างๆ เช่น สับปะรด หน่อไม้ฝรั่ง เห็ดฟาง ชิงชอย ปลาหมึกกรอบ และปลาหมึกสด เป็นต้น โดยเฉพาะปลาหมึกเป็นอาหารที่อาจตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์ในปริมาณสูงได้ โดยที่ปลาหมึกเป็นสัตว์ทะเลซึ่งมี TMAO ในร่างกายตามธรรมชาติ และหลังจากปลาหมึกตายแล้ว TMAO สามารถเปลี่ยนไปเป็น DMA และ ฟอร์มาลดีไฮด์ได้โดยเอนไซม์ แบคทีเรีย และความร้อน ในการตรวจวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์หากใช้กรดเข้มข้นและใช้ความร้อนสูงจะทำให้ TMAO แตกออกเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ได้เช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบอาจมาจากการสลายของ TMAO ไม่ใช่มาจากการเติมที่ผิดกฎหมาย อย่างไรก็ตาม ด้วยปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวมา สรุปได้ว่าฟอร์มาลดีไฮด์ที่ตรวจพบ ไม่สามารถแยกได้ว่ามาจากธรรมชาติในตัวปลาหมึกเอง หรือจากการเติมลงในอาหาร เป็นที่ทราบกันดีว่าฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารมี 2 รูป การตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจได้ทั้ง free-FA หรือ รวมทั้ง 2 รูป คือ free-FA กับ bound-FA นักวิจัยบางคนจึงมีคำแนะนำ ให้แจ้งในผลการวิเคราะห์ว่าปริมาณที่วัดได้เป็นสารรูปใด⁽¹²⁾ ดังนั้นการคัดเลือกวิธีวิเคราะห์ต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ว่าจะตรวจวัดสารรูปใดดังที่กล่าวมาข้างต้น

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เฉพาะ free-FA ด้วยเหตุผลที่ free-FA ทำให้เกิดผลต่อเซลล์ของร่างกายได้ทันที ควรให้ความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ตามที่มีการแนะนำมาจากการศึกษาโดย Bechmann IE⁽¹²⁾ ซึ่งในการกำหนดค่า TDI หรือ RfD ค่าที่กำหนดไว้นำมาจากการศึกษาการได้รับสารในลักษณะของ free-FA ที่มีในน้ำดื่ม อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาที่แสดงถึงพิษของ bound-FA ที่ชัดเจน และตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 391 (พ.ศ. 2561) เรื่องกำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย กำหนดให้ฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลีน เป็นสารห้ามใช้กับอาหาร⁽⁴⁾ (เดิม ฉบับที่ 151 (พ.ศ. 2536)) หากจะให้สอดคล้องกัน ควรตรวจวัดเฉพาะฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติมลงสู่อาหาร ซึ่งเป็น free-FA อนึ่งการตรวจเฝ้าระวังตามแผนปฏิบัติการของกระทรวงสาธารณสุขใช้ชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหาร ตรวจเบื้องต้นซึ่งเป็นการตรวจ free-FA จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า การ

ตรวจวิเคราะห์ free-FA มักใช้วิธีการสกัดที่ไม่รุนแรง เช่น การปั่น^(54,55,56,57,61,66) การเขย่า^(42,65) ใช้คลื่นความถี่สูง^(7,9,,60,62,63,64) หรือใช้ทั้ง 3 แบบด้วยกัน และ นำสารละลายที่ได้มาแยกสิ่งรบกวนเช่นโปรตีนออกไปด้วยการตกตะกอน โดยใช้สารต่างชนิดและการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูง หากแยกฟอร์มาลดีไฮด์โดยการกลั่นด้วยไอน้ำเพื่อแยก bound-FA (reversible bond) หรือการใช้กรดที่เข้มข้นในการสกัดจะทำให้ TMAO แดกออกเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ได้⁽⁵⁴⁾ ปริมาณที่ตรวจพบจึงอาจสูงกว่าค่าที่แท้จริง ในขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณสาร มีหลายเทคนิคที่นำมาใช้ให้เหมาะสมกับสถานการณ์และทรัพยากรที่มี แต่เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณเพื่อรองรับข้อกำหนดตามกฎหมายและศึกษาความเป็นพิษ คือ เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี และ โครมาโตกราฟี ซึ่งในแต่ละเทคนิคต้องทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์กับสารเคมีให้เกิดสารอนุพันธ์ที่มีความไว และคงตัวเพื่อใช้ในการวัดปริมาณ

การตรวจวิเคราะห์ free-FA ที่พัฒนาขึ้นครั้งนี้ อ้างอิงวิธีวิเคราะห์ที่เผยแพร่ โดย Yeh T-S และคณะ⁽⁷⁾ ตามวิธีที่อ้างอิงมีขั้นตอนการสกัดดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ใน 50 มิลลิลิตรและสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที แล้วนำสารละลายส่วนใส ไปทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ DNPH-reagent ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วเติม ไดคลอโรมีเทนนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนไดคลอโรมีเทนไประเหยแห้ง แล้วละลายกลับด้วย อะซิโตนไตรท์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ได้ปรับมาใช้สารละลายกรดอะซิติกแทนน้ำ และเติมอะซิโตนไตรท์เพื่อตกตะกอนโปรตีนให้ได้สารละลายที่ใสก่อนนำไป หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นโดยเครื่องหมุนเหวี่ยง ศึกษาเปรียบเทียบสารละลายที่ใช้สกัด 2 ชนิดคือน้ำ และ สารละลายกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้นต่างๆ และตรวจวัดปริมาณ ด้วย HPLC-UV ทั้งนี้การเลือกใช้กรดอะซิติก เนื่องจากเป็นกรดที่ห้องปฏิบัติการใช้สกัดวัสดุสัมผัสอาหารในการตรวจวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์มาก่อน ซึ่งไม่มีปัญหาของสารรบกวน เมื่อนำมาสกัดตัวอย่างปลาหมึก ผลวิเคราะห์พบว่า % recovery ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นทำให้สารละลายเข้มข้นมากขึ้นกว่าเดิม ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่าการสกัด free-FA ในอาหารทะเลที่มีโปรตีนสูงเช่นปลาและปลาหมึก อาจใช้น้ำหรือสารละลายกรดเช่น trichloroacetic acid, perchloric acid ในการสกัดได้ โดย % recovery ที่ได้มักไม่ต่างกัน แต่ข้อเสียของการสกัดด้วยน้ำคือ ต้องเพิ่มขั้นตอนการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่สูง ในระยะเวลาค่อนข้างนาน เพื่อให้สารละลายใส นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นทำให้สารละลายเข้มข้นมากขึ้นกว่าเดิม และไม่ได้ทำให้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่สกัดได้เพิ่มขึ้น จึงมักเลือกใช้ความเข้มข้นของกรดไม่เกิน 10%⁽⁵⁴⁾ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าหากระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดมากขึ้นเกินกว่า 10 นาทีไม่ได้มีผลมากนักต่อปริมาณ free-FA ที่สกัดได้ หากใช้เวลานานจะทำให้อุณหภูมิของสารละลายสูงขึ้น ต้องคอยปรับอุณหภูมิให้ต่ำลงทำให้การปฏิบัติงานยุ่งยากขึ้น ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมใช้เพื่อสกัด free-FA จากปลาหมึกและสไปนาง คือใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.1% (v/v) สกัดด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที เติมอะซิโตนไตรท์ ให้โปรตีนตกตะกอน นำไปแยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบ

ความเร็วสูง ด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่จะนำไปตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ต่อไป

ในขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ ฟอร์มาลดีไฮด์ต้องผ่านการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสารที่เหมาะสม เพื่อให้ได้อนุพันธ์ (derivertized) ที่ตอบสนองต่อการวัด สารเคมีที่ใช้เพื่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ มีหลายชนิดที่สามารถเลือกมาใช้ให้เหมาะสมกับเทคนิคที่ใช้ตรวจวัด วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวัดได้ทั้งเทคนิคโครมาโตกราฟี และสเปกโตรโฟโตเมทรี การตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี นิยมใช้ DNPH มาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับฟอร์มาลดีไฮด์ Indang N และคณะ⁽⁴⁷⁾ รายงานไว้ว่าการใช้ DNPH มีความจำเพาะเจาะจงสูง ความแม่นยำ ความเที่ยงดี ข้อเสียคือสารนี้อาจเกิดปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์อื่นๆ และคีโตน ได้เช่นกัน และเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างนาน ตามวิธีที่อ้างอิงใช้เวลาถึง 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง⁽⁷⁾ แต่ตามวิธีของ Xu LN และคณะ⁽⁶⁰⁾ DNPH ทำปฏิกิริยาภายในเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จึงนำมาใช้ในการศึกษานี้ โดยได้ปรับเวลาเป็น 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจนสมบูรณ์เกินพอ และพบว่าสารอนุพันธ์ยังคงตัวแม้ผ่านไป 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง อีกทั้งไม่มีปัญหาจากการรบกวนของสารอื่น ในส่วนการตรวจวัดโดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เลือก Nash's reagent มาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับฟอร์มาลดีไฮด์ เพื่อตรวจวัดสารอนุพันธ์ด้วย Spectrophotometer ตามวิธีมาตรฐาน Nash method⁽⁴⁸⁾

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer พบว่าทั้ง 3 เครื่องมือ สามารถวัดปริมาณได้ใกล้เคียงกัน มีความเที่ยง แสดงค่า %RSD ตามเกณฑ์กำหนด⁽⁶⁸⁾ เครื่องมือเหล่านี้มีการนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์และวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์มาแล้วจากหลายการศึกษา โดยวิธีเก่าแก่ในการวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในปลา คือวิธี Nash method⁽⁴⁸⁾ ในวิธีนี้ free-FA ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ Nash's reagent และวัดปริมาณด้วย Spectrophotometer มีรายงานว่าวิธี Nash จะให้ผลวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพราะจะไม่มีการรบกวนของสีและความขุ่นของสารละลายตัวอย่าง Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง แม่นยำ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือสารละลายตัวอย่างต้องใส ไม่มีสี หากสารละลายตัวอย่างมีสีหรือขุ่นจะมีปัญหาในเรื่องความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ได้ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ โดย HPLC-UV มีใช้ในการวิเคราะห์อาหารหลายชนิดทั้ง ปลา ปลาหมึก เห็ด และอื่นๆ^(9,29,41,59,62,64,65) พบว่าโดยเทคนิคนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง มีความแม่นยำและความเที่ยงในเกณฑ์ดี สามารถวัดฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปริมาณต่ำถึงระดับ ppb ได้⁽⁶⁶⁾ และเป็นเครื่องมือในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มีไว้ใช้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS/MS สามารถตรวจฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยลักษณะเฉพาะของมวลสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass to charge ratio, m/z) จึงมีความจำเพาะเจาะจงสูง แยกความแตกต่างจากสารอัลดีไฮด์อื่นๆ ได้ชัดเจน ใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันความถูกต้องของฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่างได้ทั้งในอาหาร อากาศ^(67,70) และเป็นวิธีวิเคราะห์ขั้นสูงสามารถตรวจวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ที่รวมอยู่กับสารชีวภาพเพื่อศึกษาการเป็นพิษและนำไปสู่การก่อโรคได้⁽⁷¹⁾ แต่เครื่องมือมีราคาแพงห้องปฏิบัติการทั่วไปมีไม่มากนัก เมื่อทดสอบโดยใช้ One-way ANOVA พบว่าปริมาณ free-FA ที่วัดได้จากทั้ง 3 เทคนิคนี้ไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น

95% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถเลือกใช้เครื่องมือทั้ง 3 ชนิดได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ต้องการวัด

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ดำเนินการตามแนวปฏิบัติการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว และกำหนดเกณฑ์ตาม AOAC^(68,69) วิธีวิเคราะห์ที่ใช้เครื่องมือตรวจวัดปริมาณทั้ง 3 ชนิด แสดงประสิทธิภาพที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ปลาหมึก และสับปะรด มีความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 2.5-30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง จากการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ 3 ชนิดให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งระดับความเข้มข้นที่จะกำหนดเป็นขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) นั้นต้องเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ความแม่นยำและเที่ยงของการตรวจวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ซึ่งเป็นสารโมเลกุลเล็กและรวมตัวกับโปรตีนได้ดี ทำให้ไม่สามารถสกัดฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติมลงไปได้อย่าง ได้ทั้งหมด จึงทำให้ % recovery ที่ได้ค่อนข้างต่ำ ไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แต่มี %RSD อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นจึงกำหนดขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณแบบชั่วคราว (temporary LOQ) เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนขีดจำกัดการตรวจพบกำหนดไว้แบบชั่วคราว (temporary LOD) สำหรับอาหาร เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ต่ำสุดที่เติมในตัวอย่าง แล้วสามารถตรวจวัดได้ ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) จากการวิเคราะห์ spiked sample blank ที่ระดับความเข้มข้น 15, 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer -VIS พบว่าผลวิเคราะห์มีค่าเฉลี่ยของ % recovery ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 80 ทั้งนี้อาจมาจากการที่ free-FA บางส่วนจะไปรวมกับสารอื่นเป็น bound FA และพบว่าความสดของตัวอย่างปลาหมึก มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งถ้าตัวอย่างไม่สด เมื่อเติมฟอร์มาลดีไฮด์อาจจะไปจับตัวกับโปรตีนที่สลายตัวออกมาจากเนื้อปลาหมึก ทำให้ปริมาณ free-FA ที่ตรวจพบต่ำกว่าตัวอย่างปลาหมึกสด เรื่องนี้มีกล่าวถึงในการศึกษาโดย Castell CH และ Smith B⁽⁵⁴⁾ ซึ่งพบค่าเฉลี่ยของ % recovery ประมาณ 50 % จากการวิเคราะห์ free-FA ในเนื้อปลา และพบว่าความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ ของปลามีผลในการทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ที่แตกต่างกัน ขณะที่ Storey JM และคณะ⁽⁶²⁾ ศึกษาการวิเคราะห์ free-FA ในปลาสด ผลการศึกษาพบว่า % recovery ที่ได้ต่ำกว่า 80% จึงไม่ใช้เกณฑ์ % recovery ที่ 70-110 % (US FDA) มาใช้ตัดสิน โดยให้เหตุผลว่า ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา จึงอาจไม่เหมาะที่จะนำเกณฑ์ดังกล่าวมาใช้ อย่างไรก็ตาม ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (repeatability) และการวิเคราะห์ต่างวัน (intermediate precision) เมื่อคำนวณค่า HORRAT พบว่าทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ในการรายงานผลวิเคราะห์จึงต้องแก้ปัญหาโดยแก้ค่า ปริมาณ free-FA ด้วย recovery factor (corrected recovery) ซึ่งมีการใช้วิธีการเดียวกันนี้ในการศึกษาโดย Castell CH และ Smith B⁽⁵⁴⁾

จากการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดด้วยเครื่องมือวัดทั้ง 3 เครื่อง พบว่าความไม่แน่นอนขยายของ HPLC-UV, LC-MS/MS และ Spectrophotometer เมื่อเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ได้คิดเป็นร้อยละ 15, 21 และ 13 ตามลำดับ เฉพาะ LC-MS/MS จะมีค่าสูงกว่าค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็น⁽⁶⁹⁾ ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดมวล (mass) อาจเกิดการรบกวนจากโปรตีนที่

หลงเหลืออยู่ในสารละลายซึ่งทำให้ค่า จาก precision ไม่ดีเท่าวิธีอื่น และด้วยฟอร์มาลดีไฮด์เองเป็นสารที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา จึงอาจไปรวมตัวกับสารอื่นๆ ได้เกือบตลอดเวลาทำให้ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในขั้นสุดท้ายมีความแปรปรวนได้มาก แม้ในตัวอย่างชุดเดียวกัน เมื่อพิจารณาแหล่งของความไม่แน่นอนที่มากที่สุดคือ precision ซึ่งอาจจะลดลงได้เมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง อย่างไรก็ตามความไม่แน่นอนของการวัดที่เหมาะสมกับการใช้งานไม่จำเป็นต้องมีค่าน้อยที่สุด โดยเฉพาะเมื่อการทำให้ความไม่แน่นอนน้อยลงมากๆ ต้องเกี่ยวข้องกับค่าใช้จ่ายที่สูงเกินความจำเป็น

ปริมาณ free-FA ในปลาหมึกที่ทดลองในสถานะต่างๆ

การศึกษาดูอนุมูลในการเก็บรักษาปลาหมึก ที่อาจมีผลต่อปริมาณ free-FA ผลการศึกษาพบว่า ปลาหมึกที่ใกล้เน่าจะมีปริมาณ free-FA เพิ่มขึ้น ขณะที่ในสถานะอุณหภูมิต่ำเช่น การแช่น้ำแข็ง ปริมาณ free-FA ไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดขึ้นของฟอร์มาลดีไฮด์ในสัตว์ทะเล เมื่อสัตว์ทะเลตายแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน TMAO ไปเป็น TMA และฟอร์มาลดีไฮด์ได้ ทำให้มีกลิ่นเหม็นเน่า แต่การเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกยับยั้งในสภาพอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นในกระบวนการนี้ฟอร์มาลดีไฮด์จึงเกิดขึ้นได้ไม่มากนัก⁽⁸⁾ ส่วนผลการศึกษาในสถานะการแช่แข็งปริมาณ free-FA ที่พบอยู่ที่ระดับต่ำกว่า temporary LOD และค่าที่พบก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นจากเดิม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้โดย Zang X และคณะ⁽⁴²⁾ พบว่าเมื่อเก็บปลาหมึกในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 3 เดือน ค่าเฉลี่ยของฟอร์มาลดีไฮด์รวม เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 649 ซึ่งผู้วิจัยให้เหตุผลว่ามาจากการทำงานของเอนไซม์ TMAOase ที่ย่อยสลาย TMAO ไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ แต่มีบางตัวอย่างตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์น้อยมากแม้ว่าจะเก็บในสถานะเดียวกัน ซึ่งผู้วิจัยคิดว่าอาจเป็นเพราะปฏิกิริยาของเอนไซม์ในปลาหมึกแต่ละชนิดก็ไม่เหมือนกัน จึงไม่ได้ทำให้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ของปลาหมึกทุกชนิดเพิ่มมากขึ้น ภายใต้สภาวะแช่แข็งเช่นเดียวกัน และหากเปรียบเทียบช่วงเวลาการศึกษา การศึกษาครั้งนี้มีระยะเวลาที่แช่แข็งเพียง 1 เดือน เป็นระยะเวลาดังกล่าวมาก ในส่วนการศึกษาเกี่ยวกับผลของความร้อน พบว่าความร้อนจากการปรุงอาหาร ทำให้ปริมาณ free-FA เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ เช่น มีรายงานการศึกษาโดย Zhu J และคณะ⁽⁷²⁾ พบว่าการเปลี่ยนจาก TMAO ไปเป็น ฟอร์มาลดีไฮด์และ DMA ในปลาหมึกจะเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ใช้ความร้อนตั้งแต่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ขึ้นไป และมีอัตราการเกิดสูงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่น ซึ่งพบว่าปัจจัยการเปลี่ยนแปลงของ TMAO ไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์และ DMA นอกจากเอนไซม์ TMAOase แล้วยังมีปัจจัยที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic breakdown) คือความร้อนสูง⁽⁷²⁾ ธาตุและสารเคมี เช่น เหล็ก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ฟอร์มาลดีไฮด์และ DMA เพิ่มขึ้นได้⁽⁷³⁾ และจากการตรวจวิเคราะห์ลำไส้ของปลาหมึก พบ free-FA ปริมาณสูงกว่าในเนื้อมาก สอดคล้องกับการศึกษาโดย Li J และคณะ⁽⁴³⁾ ที่พบว่าระดับฟอร์มาลดีไฮด์ในปลาหมึกแต่ละสายพันธุ์ มีความแตกต่างกัน และพบปริมาณสูงในอวัยวะภายในมากกว่าบริเวณกล้ามเนื้อ

การสำรวจเบื้องต้น ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหาร

นำวิธีที่ได้พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจวัดปริมาณด้วย HPLC-UV มาตรวจวิเคราะห์ free-FA ในตัวอย่าง เพื่อสำรวจปริมาณ free-FA ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติของอาหารแต่ละประเภท เบื้องต้นจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 118 ตัวอย่าง เป็นปลาหมึก จำนวน 63 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลาหมึกในประเทศ จำนวน 40 ตัวอย่าง และปลาหมึกนำเข้า จำนวน 23 ตัวอย่าง ทุก

ตัวอย่างทำการตรวจคัดกรองโดยชุดทดสอบฟอร์มาลีนในอาหารควบคู่กันและพบว่าตรวจไม่พบ free-FA ในน้ำแข็งที่ใช้แช่หรือน้ำล้างปลาหมึก ปลาหมึกในประเทศ ตรวจพบ free-FA จำนวน 7 ตัวอย่าง ร้อยละ 17.5 ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง น้อยกว่า 5 ถึง 7.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตัวอย่างปลาหมึกในประเทศนั้นส่วนใหญ่เป็นปลาหมึกที่จับได้จากผู้ประกอบการเรือประมงในท้องถิ่นในจังหวัดริมชายฝั่งทะเลทั้งอ่าวไทยและอันดามัน จากการสัมภาษณ์แหล่งจำหน่ายไม่พบข้อมูลการเติมฟอร์มาลดีไฮด์และตรวจไม่พบฟอร์มาลดีไฮด์ในน้ำแช่โดยใช้ชุดทดสอบ ตัวอย่างที่พบฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณสูงกว่า LOQ เป็นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดชุมพร และประจวบคีรีขันธ์เมื่อสังเกตจากลักษณะของปลาหมึก เนื้อไม่สด กลิ่นเน่า ซึ่ง free-FA ที่พบอาจมาจากการเกิดขึ้นตามธรรมชาติของปลาหมึกเอง ส่วนปลาหมึกที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ตรวจพบ free-FA จำนวน 1 ตัวอย่าง ร้อยละ 12.5 ปริมาณที่พบ 6.43 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปลาหมึกนำเข้าจากต่างประเทศเก็บตัวอย่างที่ห้องเย็นในสภาพแช่แข็งก่อนที่จะมีการกระจายสินค้า ข้อมูลจากการสัมภาษณ์ผู้ประกอบการแจ้งว่าการจับปลาหมึกในอุตสาหกรรมประมงขนาดใหญ่เมื่อจับปลาหมึกได้แล้วจะนำแช่เย็นทันทีก่อนนำส่งเพื่อจำหน่าย ดังนั้นปริมาณ free-FA ที่พบอาจเป็นสารที่มีตามธรรมชาติซึ่งเกิดขึ้นในตัวปลาหมึก เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาจากประเทศอื่นเช่น Bianchi F และคณะ⁽³⁵⁾ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ในปลาหมึกกระดอง ปริมาณที่พบ อยู่ในช่วง 2.91 - 3.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม Yeh T-S และคณะ⁽⁷⁾ ตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกสด 1 ตัวอย่าง พบปริมาณ 10.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่การศึกษาในประเทศมาเลเซียตรวจพบ free-FA ในปลาหมึกน้อยมากมีค่าเฉลี่ย 0.49 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁷⁴⁾ ส่วนสไบนาง (สีดำ) จำนวน 24 ตัวอย่างนำมาจากสถานที่ผลิต ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือฟอกสีให้เป็นสีขาว ตรวจเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบไม่พบฟอร์มาลดีไฮด์ ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณที่พบต่ำกว่า LOD สไบนางดำจึงมี free-FA ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติเล็กน้อยหรือตรวจไม่พบ ดังนั้นจากรายงานผลการเฝ้าระวังตามแผนปฏิบัติการประจำปีของหน่วยงานต่างๆ มีการตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณสูงในสไบนางที่ผ่านกระบวนการฟอกขาว อาจมาจากการเติมสารโดยวัตถุประสงค์บางอย่างจึงควรมีการเฝ้าระวัง เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสไบนาง ขยายไปใช้ตรวจวิเคราะห์ free-FA ในตัวอย่างเห็ดซึ่งเป็นตัวอย่างที่มี ส่วนประกอบต่างออกไป พบว่าบางตัวอย่างมีปัญหาสารรบกวนจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ สำหรับตัวอย่างเห็ดที่สามารถตรวจวัดปริมาณได้ จำนวน 21 ตัวอย่าง ตรวจพบปริมาณ free-FA น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2 ตัวอย่าง และอีก 16 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 5.60 - 22.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ย 10.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีรายงานการศึกษาที่พบปริมาณ free-FA ในเห็ดจากฟาร์มของประเทศเบลเยียม ต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁹⁾ แต่รายงานการศึกษาจากประเทศอังกฤษ ตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์รวม (total-FA) ในเห็ดหอมเมื่อใช้วิธีการกลั่นในสภาวะที่มีกรด ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 100-320 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁶⁷⁾ และพบว่าการทอดเห็ดเป็นเวลา 6 นาที สามารถลดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ลงได้ ขณะที่เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 10 วันไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีตามธรรมชาติในเห็ดสามารถตรวจพบได้ที่ปริมาณค่อนข้างสูงหากใช้วิธีการกลั่นสารออกมาจากตัวอย่าง ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ทั้ง free-FA และ bound-FA รวมกัน

5.2 สรุป

วิธีวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารมีหลายเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ มีข้อดีและข้อจำกัด แตกต่างกัน โดยเฉพาะในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจวัดปริมาณ เนื่องจากฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหารอาจเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติหรือมีการเติมลงไปด้วยวัตถุประสงค์บางอย่าง มีทั้งในรูป free-FA และ bound-FA ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการวัดสารในรูปใด การศึกษาครั้งนี้ต้องการตรวจวัดปริมาณ free-FA ในอาหาร โดยตัวแทนที่นำมาศึกษาคือปลาหมึกและสับปะรด ซึ่งเป็นอาหารที่มีความถี่ในการตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์สูงกว่าอาหารประเภทอื่น วิธีวิเคราะห์ปริมาณ free-FA ที่พัฒนาครั้งนี้ ใช้วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายกรดอ่อนภายใต้คลื่นความถี่สูง สามารถตรวจวัดปริมาณได้ถูกต้องและใกล้เคียงกันโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ด้วย HPLC-UV หรือ LC-MS/MS และเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี ด้วย Spectrophotometer วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีซึ่งดำเนินการเพื่อยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่จำเป็นครบถ้วน โดยผลการศึกษาพบว่ามีความเป็นเส้นตรง ความจำเพาะเจาะจง และความเที่ยง ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานสากล ขีดจำกัดการตรวจพบแบบชั่วคราว (temporary LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณแบบชั่วคราว (temporary LOQ) เหมาะสมกับปริมาณที่พบตามธรรมชาติของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร แต่ด้วยเหตุที่ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาจึงเข้าไปจับกับสารอื่นได้อย่างรวดเร็ว ความแม่นยำวัดด้วย % recovery จึงไม่เป็นไปตามเกณฑ์โดยสมบูรณ์ ดังนั้นการรายงานผล จึงแนะนำให้ใช้วิธีการแก้ค่าด้วย recovery factor วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความถูกต้อง สามารถวิเคราะห์ได้เร็ว จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ free-FA เพื่อการเฝ้าระวังการใช้กับอาหารที่ผิดกฎหมายได้ ทั้งนี้จากการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างที่เก็บจากท้องตลาด จำนวน 118 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลาหมึก สับปะรด และขยายขอบข่ายไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเห็ด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบ free-FA ในสับปะรด (สีดำ) ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำให้ขาว พบ free-FA ในปลาหมึกและเห็ด ร้อยละ 12.7 และ 85.7 ตามลำดับ โดยปริมาณ free-FA ที่พบในเห็ดมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าตัวอย่างอื่น

เพื่อจะนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มาจัดทำเป็นวิธีมาตรฐานต่อไป จึงจัดให้มีการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร แก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ การฝึกอบรมประกอบด้วย การเตรียมตัวอย่าง การสกัด และตรวจวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกและสับปะรด โดยเทคนิค Spectrophotometer และ HPLC-UV ผลการประเมิน พบว่าผู้เข้าร่วมฝึกอบรมมีความเข้าใจกระบวนการ สามารถปฏิบัติตามขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง และต้องการนำไปศึกษา ทวนสอบวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับศักยภาพของห้องปฏิบัติการ เพื่อปรับใช้ในการตรวจเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารฟอร์มาลดีไฮด์ต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

เพื่อขับเคลื่อนโครงการพัฒนากลไกการบริหารจัดการความเสี่ยงปัญหาสารฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ตามนโยบายกระทรวงสาธารณสุข ในการเฝ้าระวังการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ไม่ถูกต้อง ควรมีการศึกษาต่อเนื่องดังนี้

5.3.1 ศึกษาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในกลุ่มอาหารให้ครอบคลุมชนิดอาหารต่างๆ เช่นอาหารทะเลชนิดอื่น ผัก ผลไม้ ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์ และอาหารแปรรูปอื่นๆ เพื่อให้สามารถนำวิธีวิเคราะห์ไปใช้ ในการสำรวจปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ได้ครอบคลุมทุกกลุ่มอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดเกณฑ์การปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารได้ต่อไป

5.3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลง และปริมาณการตกค้างของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติมในอาหาร เปรียบเทียบกับปริมาณสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์จากการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ผิดกฎหมาย

5.3.3 ผลจากการสำรวจครั้งนี้พบว่าสไบนาง (สีดำ) ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการฟอกให้ขาว พบฟอร์มาลดีไฮด์ต่ำมาก ขณะที่ข้อมูลจากการเฝ้าระวังอาหารตามแผนปฏิบัติการประจำปีของหน่วยงานต่างๆ พบว่าสไบนางสีขาวตรวจพบการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์มีความถี่สูง น่าจะมาจากการใช้สารนี้ด้วยวัตถุประสงค์อื่น จึงควรมีมาตรการ ควบคุมและกำกับดูแล เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในสไบนางจากการเติมที่ผิดกฎหมาย

เอกสารอ้างอิง

1. International Agency for Research on Cancer. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2006; 88: 39-325.
2. United States Environmental Protection Agency. Formaldehyde. Technology transfer network – Air toxic web site [online]. 2000; [cited 2016 May 13]; [3 screens]. Available from URL: <http://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/foemalde.html>
3. World Health Organization. Formaldehyde in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. WHO/SDE/WSH/03.04/48, 2nd ed.Vol.2. Health criteria and other supporting information. WHO: Geneva, 1996.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ฉบับที่ 391 (พ.ศ. 2561). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 237 ง. 25 กันยายน 2561.
5. สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย. รายงานสถานการณ์สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร ปี 2550-2554. [สืบค้น 26 พ.ค. 2559] [47หน้า] เข้าถึงได้ที่ : URL: http://foodsafety.anamai.moph.go.th/download/D_Surveillance/สถานการณ์สารปนเปื้อนในอาหาร%2550-54%20 ขอแรกซ์.pdf.
6. กนกพร วัฒนนิสิน. ระบาดวิทยาของการปนเปื้อนฟอร์มาลีนในอาหารสดในบางจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปีงบประมาณ 2557. ว เกษตรกรรมไทย 2558;7(1): 31-7.
7. Yeh T-S, Lin T-C, Chen C-C, Wen H-M. Analysis of free and bound formaldehyde in squid and squid products by gas chromatography-mass spectrometry. J Food Drug Anal 2013; 21: 190-7.
8. Zhang X, Shen X, Wang Y, Cai Y, Huang D. The research progress of detection method of formaldehyde in food. Proceeding of the 2017 2nd International conference on civil transportation and environmental engineering (ICCTE 2017) [cited 2018 April 20]; 135: [5 screens]. Available from URL: <http://www.atlantispress.com/proceedings/iccte-17/25878899>.
9. Claeys W, Vleminckx C, Dubois A, Huyghebaert A, Hofte M, Daenens P. Formaldehyde in cultivated mushroom: a negligible risk for the consumer. Food Addit Contam 2009; 9: 1265-72.
10. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety and efficacy of formaldehyde for all animal species based on a dossier submitted by Adiveter S.L. EFSA Journal 2014; 12(2): 3562.

11. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2559; [ออนไลน์] [สืบค้น 20 เม.ย. 2560] ; [118 หน้า] เข้าถึงได้ที่ :
[URL:http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/wp-content/uploads/2017/Publish/annual_report/BQSF_2559.pdf](http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/wp-content/uploads/2017/Publish/annual_report/BQSF_2559.pdf).
12. Bechmann IE. Comparison of the formaldehyde content found in boiled and raw mince of frozen Saithe using different analytical methods. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 1998;31: 449-53.
13. Burggraff J. Food additives: Direct AOAC official method 931.08 Formaldehyde in food. In: Horwitz W, editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg; 2000. Vol. II, Chapter 47. P 16.
14. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. คู่มือการจัดการสารเคมีอันตรายสูง ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde). 2553; [สืบค้น 14 ก.พ. 2559]; [132 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL:
<http://php:diw.go.th/safety/wpcontent/uploads/2015/01/formaldehyde.pdf>.
15. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 109/ตอนที่ 39 หน้า 21 6 เมษายน 2535.
16. World Health Organization. Formaldehyde. Environmental Health Criteria 89, 1989. [cited 2016 March 12]; [170 screens]. Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm>,
17. บังอร ฉางทรัพย์. ฟอร์มาลดีไฮด์ / ฟอร์มาลีน ภัยร้ายใกล้ตัว ว. วิทย. เทคโนโลยี. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 2558; 1(1): 97-109.
18. Restani P and Gallic L. Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. Toxicol. 1991; 21(5): 315-28.
19. World Health Organization. Formaldehyde. Concise International Chemical Assessment Document 40. Geneva: WHO, 2002.
20. World Health Organization. Chapter 5.8 Formaldehyde. In: Frank Theakston, eds. Air quality guidelines-second edition. Copenhagen Denmark: WHO, 2001: 87-91.
21. OECD SIDS. Formaldehyde. UNEP Publications, 2002. [cited 2016 Mar 25]; [395 screens]. Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/FORMALDEHYDE.pdf>,

22. Yu G-Y, Song X-F, Liu Y, Sun Z-W. Inhaled formaldehyde induces bone marrow toxicity via oxidative stress in exposed mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(13): 5253-7.
23. Mario J, He R. Chronic formaldehyde-mediated impairments and age-related dementia. *Neurodegeneration*, [online] 2012. [cited 2016 Jun 5]; [18 screens]. Available from: URL: <https://www.intechopen.com/books/neurodegeneration>
24. European Food Safety Authority. Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. *EFSA Journal* 2014; 12(2): 3550.
25. Zhu J, Jai J, Li X, Dong L, Li J. ESR studies on the thermal decomposition of trimethylamine oxide to formaldehyde and dimethylamine in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) extract. *Food Chem* 2013; 141: 3881-8.
26. Zhang X, Hui Y, Gai Y, Huang D. The research progress of endogenous formaldehyde in aquatic products. *WJERT* 2015; 3: 272-6.
27. MRC Laboratory of Molecular Biology. A fundamental protection mechanism against formalin in mammals is revealed. 2015. [cited 2016 Mar 25]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/a-fundamental-protection-mechanism-against-formalin-in-mammals-is-revealed/>
28. Tome D, Kozłowski A, and Mabon F. Carbon-13 NMR study on the combination of formaldehyde with bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* 1985;33: 449-55.
29. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to Use of formaldehyde as a preservative during the manufacture and preparation of food additives. *EFSA Journal* 2006; 415, 1-10.
30. Food Safety Commission of Japan (FSCJ), Risk Assessment report Formaldehyde (Beverages). FS/424/2008 [cite 2016 Mar 1]; [1 screens]. Available from: URL: http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/chemicals/formaldehyde_acid_fs_424_2008.pdf.
31. European Parliament and Council, Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on Food additives other than colours and sweeteners. *Off. J. Eur. Communities* 1995; 61: 1-40.
32. National Standard of the People's Republic of China. Standard for Drinking Water Quality. GB 5749-2006, issued on: December 29,2006.

33. USDA Foreign Agricultural Service. China-Peoples Republic of National Food Safety Standard-Fermented Alcoholic Beverage Gain report number 12058,10/17/2012, issued on 2012-08-066.
34. Siti Aminal A, Zailina H, Fatimah AB. Health risk assessment of adults consuming commercial fish contaminated with formaldehyde. Food and Public Health 2013, 3(1): 52-8.
35. Bianchi F, Careri M, Musci M, et al. Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis. Food Chem 2007; 100: 1049-53.
36. Buckley K.E., Fisher L.J., and MacKay V.G. Level of formaldehyde in milk, blood, and tissues of dairy cows and calves consuming formalin-treated whey, J.Agric.Food Chem. 1988; 36: 1146-50.
37. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2555-2557; [ออนไลน์] [สืบค้น 20 เม.ย. 2560] ; [149 หน้า] เข้าถึงได้ที่ :
[URL:http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsf_Web/wp-content/uploads/2017/Publish/annual-report/report 55-57.pdf](http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsf_Web/wp-content/uploads/2017/Publish/annual-report/report%2055-57.pdf)
38. ปศุสัตว์.คอม. ปลาหมึก (Cuttlefish,Octopus).[สืบค้น 2 ธ.ค. 2561]; [6 หน้า] เข้าถึงได้ที่: URL: <https://pasusat.com/>
39. สมนึก พรหมศรี. การศึกษาชนิด ปริมาณ และคุณภาพหมึกที่มีการนำเข้าส่งออกทางด่านตรวจสัตว์น้ำของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2558; เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2560 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: 2560.
40. Seibel BA, and Walsh PJ. Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. J Exp Biol 2002; 205: 297-306.
41. Kotodziejska I., Niecikowska C., Sikorski ZE. Dimethylamine and formaldehyde in cooked squid (*Illex argentines*) muscle extract and mantle. Food Chem 1994; 50: 281-3.
42. Zhang X, Shen S, Hui Y, Kong C, Wang Y, Feng B, et.al. Studies on the determination of formaldehyde in squid and bammalo. International Symposium on Material, Energy and Environment Engineering 2015; 20-22.
43. Li J, Zhu J and Ye L. Determination of formaldehyde in squid by High performance liquid chromatography. Asia Pac J Clin Nutr 2007; 16 (Suppl 1): 127-30.
44. จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. ความปลอดภัยทางอาหาร: การแก้ปัญหาจากฟอร์มาลิน. สัมภาษณ์ทางโทรศัพท์ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ครั้งที่ 1 ระเบียนวาระที่ 2.4 9 กันยายน 2558; [สืบค้น 2 ธ.ค. 2561]; [10 หน้า] เข้าถึงได้ที่: URL: https://kbphpp.nationalhealth.or.th/bitstream/handle/123456789/3172/20151116_Prachaubkirikhan_Food_Safety_Formalin.pdf

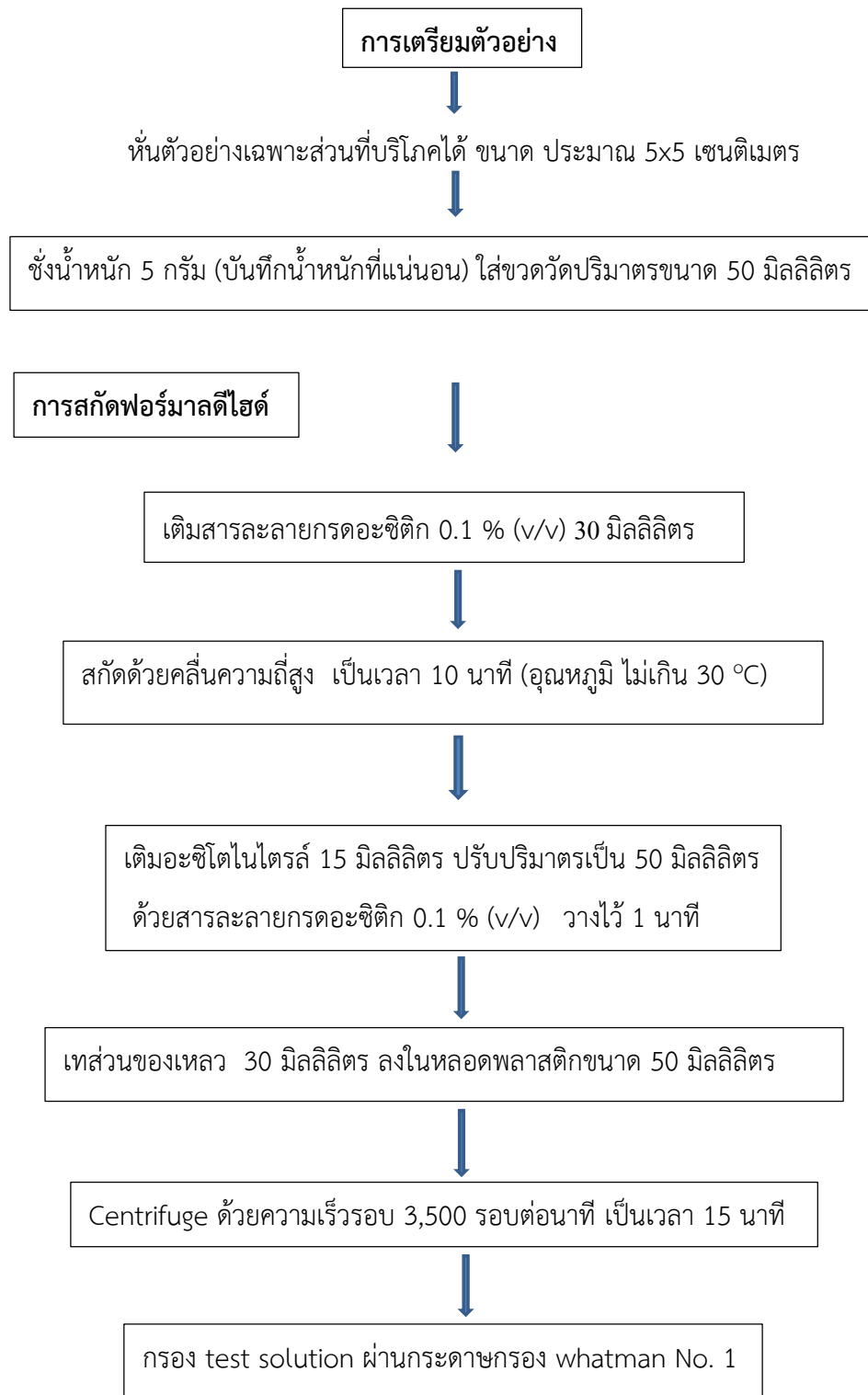
45. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการส่งเสริมสุขภาพ (สสส.). ภัยอาหารปนเปื้อนฟอร์มาลีน.[ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 16 ธ.ค. 2561]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL:<http://www.thaihealth.or.th/Content>
46. Boeri RL, Almandos ME, Ciarlo AS, Giannini DH. Formaldehyde instead of dimethylamine determination as a measure of total formaldehyde formed in frozen Argentine hake (*Merluccius hubbsi*). Int J Food Sci Technol 1993; 28: 289-92.
47. Nur Indang M, Abdulamir AS, Abu Bakar A, Salleh AB, Lee YH, and Nor Azah Y. A review: method of determination of health-endangering formaldehyde in diet. Research Journal of Pharmacology 2009; 3(2): 31-47.
48. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. G.H. Wiltshire 1953; 55: 416-21.
49. Compton BJ, and Purdy WC. The mechanism of the reaction of the Nash and the Sawicki aldehyde reagent. CAN.J.CHEM. 1980; 58: 2207-11.
50. Jendral JA, Monakhova YB, and Lachenmeier DW. Formaldehyde in alcoholic beverages: large chemical survey using purpald screening followed by chromotropic acid spectrophotometry with multivariate curve resolution. Int. J. Anal. Chem. 2011; 2011: Article ID 797604: 1-11.
51. Shrestha B. Chemical properties of aliphatic aldehydes and ketones. CHEM-GUIDE [Online]. 2010 [cited 2018 Dec 27]; [7 screens]. Available from: URL: <https://chem-guide.blogspot.com/2010/04/chemical-properties-of-aliphatic.html>
52. Gu DC, Zou MJ, Guo XX, and Yu P. A rapid analytical and quantitative evaluation of formaldehyde in squid based on Tri-step IR and Partial least squares (PLS). Food Chem 2017; 229: 485-63.
53. Hayun H, Harmita K, and Pramudita TB. Determination of formaldehyde content in wet noodles by thin layer chromatography-densitometry after derivatization with Nash reagent. Orient. J. Chem. 2017; 33 (3): 1400-5.
54. Castell CH and Smith B. Measurement of formaldehyde in fish muscle using TCA extraction and the Nash reagent. J.Fish.res.Bd.Can.1973; 30(1): 91-8.
55. Rehbein H. Determination of formaldehyde content in fishery products. Z lebensm Unters Forsch. 1987;185: 292-8.

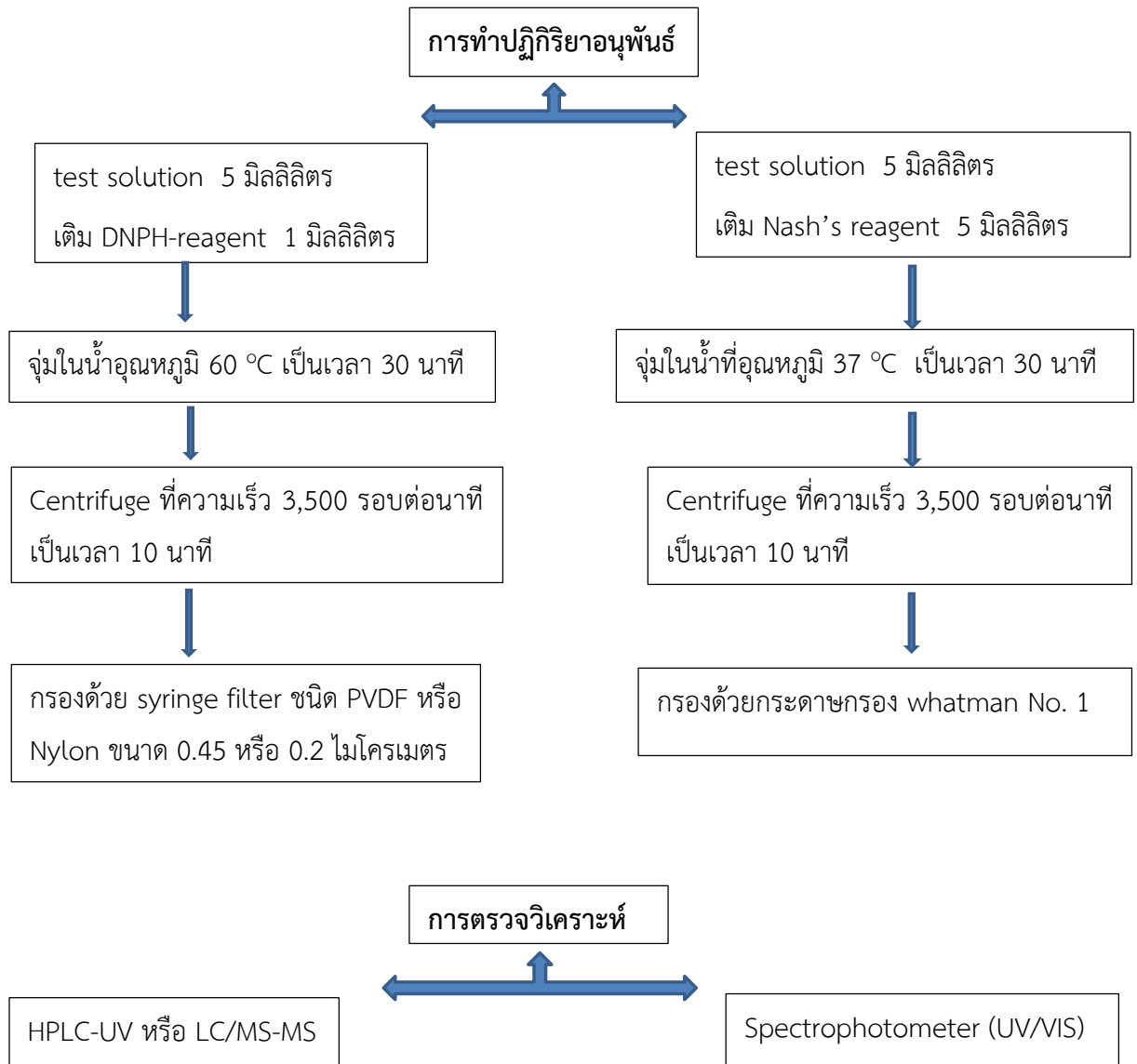
56. Leblanc EL, Leblanc RJ, and Ervin DM. Comparison of three methods of formaldehyde determination on frozen Sole, Pollock, Haddock and Cod fillets. *J. Food Biochem.* 1988; 12: 79-95.
57. Rehbein H, Schmidt T. A rapid and simple method for the determination of formaldehyde in fishery products. *Inf.Fischwirtschaft.* 1996; 43(1): 37-9.
58. Tashkov W. Determination of formaldehyde in foods, biological media and technological materials by headspace gas chromatography. *Chromatographia.* 1996; 43 (11/12): 625-7.
59. Cunha Veloso MC, Silva VM, Santos GV, and Andrade JB. Determination of aldehydes in fish by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatographic Science* 2001; 39: 173-6.
60. Xu LN, Gai FY, Mu GF, Gao Y, Liu HT, and Luan F. Determination of formaldehyde in aquatic products by micellar electrokinetic capillary chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *Acta Chromatogr.* 2012; 24(4): 519-28.
61. Shin H-S, and Lim H-H. Simple determination of formaldehyde in fermented foods by HS-SPME-GC/MS. *Int. J .Food. Sci. Technol.* 2012; 47: 350-6.
62. Storey JM, Andersen WC, Heise A, Turnipseed SB, Lohne J, Thomas T, et al. A rapid liquid chromatography determination of free formaldehyde in cod. *Food Addit Contam: Part A* 2015; 32(5): 657- 64.
63. Jeong H-S, Chung H, Song S-H, Kim C-l, Lee J-G, and Kim Y-S. Validation and determination of the contents of acetaldehyde and formaldehyde in foods. *Toxicol. Res.* 2015; 31(3): 273-8.
64. Wahed P, Razzaq Md A, Dharmapuri S, Corrales M. Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method. *Food Chem.* 2016; (202): 476-83.
65. Freitas Rezende FB de, Souza Santos Cheibub AM de, Netto ADP, Calvalho Marques FF de. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. *Microchem J* 2017;134: 383-9.
66. Nowshad F, Islam Md N, and Khan MS. Analysis of the concentration and formation behavior of naturally occurring formaldehyde content in food. *INT J FOOD ENG* 2018; 4(1): 71-5.

67. Mason DJ, Sykes MD, Panton SW, Rippon EH. Determination of naturally-occurring formaldehyde in raw and cooked Shiitake mushrooms by spectrophotometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Addit Contam* 2004; 21(11): 1071-82.
68. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. [Online]. 2002 [cited 2016 Nov 12]; [38 screens]. Available from: URL: http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf.
69. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการปฏิบัติทดสอบความถูกต้องทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2549.
70. Zhao Y-G, Zhang Y, Wang F-L, Chen N, Lou C-Y, Zhang K, et.al. A new LC-MS/MS for fast determination of formaldehyde in air of public place. *Anal Methods* 2017; 9 (29): 4234 -9.
71. Lai Y, Yu R, Hartwell HJ, Moeller BC, Bodnar WM, and Swenberg JA. Measurement of endogenous versus exogenous formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in animal tissues by stable isotope labeling and ultrasensitive mass spectrometry. *Cancer Research* [Online] 2016 March [cited 2018 May 8]; [10 screens]. Available from: URL: www.aacrjournals.org
72. Zhu J, Li J, and J J. Effects of thermal processing and various chemical substances on formaldehyde and dimethylamine formation in squid *Dosidicus gigas*. *J Sci Food Agric* [Wiley online library] 2012 [cited 2018 July]; [7 screens]. Available from: URL: www.soci.org
73. Lin J-k, and Hurng D-C. Thermal conversion of trimethylamine-N-oxide to trimethylamine and dimethylamine in squids. *Fd.Chem.Toxic.* 1985; 23(6): 579-83.
74. Noordiana N, Fatimah AB, and Farhana YCB. Formaldehyde content and quality characteristics of selected fish and seafood from wet markets. *INT FOOD RES J* 2011; 18: 125-36.

ภาคผนวก ก

แผนภาพขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ free-FA ในอาหาร





ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข 1 ผลวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกนำเข้าจากต่างประเทศ

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ชุดทดสอบ	HPLC-UV
1	บ.ORO ซีฟู้ด จำกัด	ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) ทั้งตัว ปริมาณ 10 ก.ก./กล่อง	ND	ND (1.99)
2		ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) จาก จีน ทั้งตัว ขนาด 6-7 นิ้ว ปริมาณ 100 กรัม	ND	ND (2.01)
3		ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) จาก ไต้หวันทั้งตัว ขนาด 8-9 นิ้ว ปริมาณ 150-200 กรัม	ND	ND
4		ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) จาก ไต้หวันทั้งตัว ขนาด 8-9 นิ้ว ปริมาณ 200-300 กรัม	ND	ND
5	บจก. เจริญโภคภัณฑ์ อาหาร	คอ (Giant Squid Neck) ปริมาณ 150-200 กรัม	ND	ND (0.45)
6		ปีก (Giant Squid Wick) ปริมาณ 150-200 กรัม	ND	ND
7	ห้างบิ๊กซี เอ็กซ์ บางใหญ่	ปีกปลาหมึกยักษ์	ND	ND
8		หนวดปลาหมึกยักษ์	ND	ND
9		คางปลาหมึกยักษ์	ND	ND
10		เนื้อปลาหมึกยักษ์	ND	ND
11	ตลาดมหาชัย จ.สมุทรสงคราม	ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) ทั้งตัว ขนาด 7-8 นิ้ว ปริมาณ 100 กรัม	ND	ND
12	ตลาดสดทะเลไท (ห้องเย็นรัตนกร) จ.สมุทรสาคร	ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) ทั้งตัว ขนาด 7-8 นิ้ว ปริมาณ 100 กรัม	ND	ND
13	Makro รามอินทรา	ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) ทั้งตัว ขนาด 7-8 นิ้ว ปริมาณ 150-200 กรัม	ND	6.43
14		ปลาหมึกกล้วย (Argentine shortfin squid) ทั้งตัว กรอบเล็กขนาด 8-9 นิ้ว ปริมาณ 150-200 กรัม	ND	ND
15	Makro ศรีนครินทร์	เนื้อปลาหมึกยักษ์ลอกหนัง	ND	ND
16		ปีกปลาหมึกยักษ์	ND	ND
17		หนวดปลาหมึกยักษ์	ND	ND
18		คางปลาหมึกยักษ์	ND	ND
19		เนื้อปลาหมึกยักษ์ (จีน)	ND	ND (2.29)
20		ปีกปลาหมึกยักษ์ (จีน)	ND	ND

ตารางที่ ข 1 ผลวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึกนำเข้าจากต่างประเทศ (ต่อ)

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ชุดทดสอบ	HPLC-UV
21	Lotus สุขุมวิท 1	ปีกปลาหมึกยักษ์	ND	ND
22		หนวดปลาหมึกยักษ์	ND	ND
23		คางปลาหมึกยักษ์	ND	ND

ตารางที่ ข 2 ผลวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก แหล่งจับในประเทศ

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ชุดทดสอบ	HPLC-UV
1	จ.ระนอง	ปลาหมึกกล้วยไม่ลอกหนัง 01 ขนาด 4-5 นิ้ว	ND	< 5 (3.29)
2		ปลาหมึกกล้วยไม่ลอกหนัง 02 ขนาด 4-5 นิ้ว	ND	ND
3	ตลาดเจ้าหลาว จ.จันทบุรี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5-4.5 นิ้ว	ND	ND
4		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5-4.5 นิ้ว	ND	ND
5	ตลาดวัดสวนมะม่วง จ.จันทบุรี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 - 4 นิ้ว	ND	ND (0.56)
6	ตลาดประมงสวนสน จ.ระยอง	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5-4.5 นิ้ว	ND	< 5 (3.68)
7		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5-4.5 นิ้ว	ND	ND
8	ตลาดบ้านเพ จ. ระยอง	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 5 - 7 นิ้ว	ND	ND
9	ตลาดประมงอ่างศิลา จ. ชลบุรี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 - 5 นิ้ว	ND	ND
10		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 2 - 3 นิ้ว	ND	ND (1.93)
11		ปลาหมึกกระดอง ขนาด 1.5 - 2 นิ้ว	ND	ND
12	เรืออวนลาก อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 - 4 นิ้ว	ND	ND
13	เรืออวนลาก อ.ขนอม จ.นครศรีธรรมราช	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 5 - 7 นิ้ว	ND	ND
14	ตลาดเทศบาลคูขวาง จ. นครศรีธรรมราช	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5 - 5.5 นิ้ว	ND	ND (0.26)
15	ตลาดปากพั้ง จ. นครศรีธรรมราช	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 - 4.5 นิ้ว	ND	ND
16	ตลาดนัดสวนตุล จ. สงขลา	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 - 5 นิ้ว	ND	<5 (3.79)
17	ตลาดนัดทุ่งหวัง จ. สงขลา	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 2.5 - 4.5 นิ้ว	ND	ND
18	แหลมตะนอย อ.กันตัง จ.ตรัง	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 5 - 7 นิ้ว	ND	ND
19	อ.กันตัง จ.ตรัง	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 - 7 นิ้ว	ND	ND
20	แพสารสิน จ. ภูเก็ต	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 2.5 - 4 นิ้ว	ND	ND (1.97)
21		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 - 6 นิ้ว	ND	ND
22	จ. ชุมพร	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 5 - 7 นิ้ว	ND	ND (1.06)
23		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 - 5 นิ้ว	ND	6.21
24	ตลาดวังก้ง จ. ประจวบคีรีขันธ์	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 - 6 นิ้ว	ND	7.14

หมายเหตุ ND คือ ตรวจไม่พบ

ตารางที่ ข.2 ผลวิเคราะห์ free-FA ในปลาหมึก แหล่งจับในประเทศ (ต่อ)

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ชุดทดสอบ	HPLC-UV
25	ตลาดหัวนา จ. ประจวบคีรีขันธ์	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 – 5 นิ้ว	ND	<5 (4.73)
26		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 2.5 – 3.5 นิ้ว	ND	5.1
27		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 2.5 – 3.5 นิ้ว	ND	ND
28	ตลาดเทศบาลชะอำ จ.เพชรบุรี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5 – 5 นิ้ว	ND	ND
29		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 1.5 – 3.5 นิ้ว	ND	ND
30		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 – 6 นิ้ว	ND	ND
31	ตลาดทะเลไทย จ.สมุทรสาคร	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 – 6 นิ้ว	ND	ND
32		ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 – 4 นิ้ว	ND	ND
33		ปลาหมึกกระดอง ขนาด 2 – 4 นิ้ว	ND	ND
34	ตลาดไทรยรา จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4.5 – 6 นิ้ว	ND	ND
35	ตลาดไท จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 4 – 5 นิ้ว	ND	ND (0.83)
36	ตลาดไท จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3 – 4.5 นิ้ว	ND	ND
37	ตลาดไท จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกระดอง ขนาด 1.5 – 2.5 นิ้ว	ND	ND
38	ตลาดไท จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 3.5 – 5.5 นิ้ว	ND	ND
39	ตลาดไท จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกล้วย ขนาด 8 – 8.5 นิ้ว	ND	ND
40	ตลาดไท จ. ปทุมธานี	ปลาหมึกกระดอง ขนาด 3 – 3.5 นิ้ว	ND	ND
ค่าเฉลี่ย*				4.06

หมายเหตุ ND คือ ตรวจไม่พบ * คิดเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบ กรณีที่พบ <5.0 คิดเป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ ข 3 ผลวิเคราะห์ free-FA ในสโบนาง (สดำ)

ลำดับที่	แหล่งที่มา	สถานที่เก็บตัวอย่าง	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ชุดทดสอบ	HPLC-UV
1	จ้างเชือด	ตลาดวังน้อย อ.วังน้อย จ.อยุธยา	ND	ND
2		ตลาดพงษ์สว่าง อ. มวกเหล็ก จ. สระบุรี	ND	ND
3		ตลาดสดเทศบาลแก่งคอย อ.แก่งคอย จ. สระบุรี	ND	ND (1.34)
4		ตลาดศาลเจ้า ร้านมาลี ไกลทัด อ.เมือง จ. สระบุรี	ND	ND
5	รับจากโรงฆ่าสัตว์ปีกชุม	ตลาดศาลเจ้า ร้านสุภาพหรือแป๊ะประภา อ.เมือง จ. สระบุรี	ND	ND
6	จ้างเชือด (โรงฆ่าสัตว์เดชา)	ตลาดจอมพลปอ (ร้านวรวิชัย) อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี	ND	ND (1.68)
7	จ้างเชือด	ตลาดยิ่งเจริญ ร้านเนื้ออาซัน (บัง) บางเขน กรุงเทพฯ	ND	ND (0.31)
8	รับจากตลาดไท	ตลาดยิ่งเจริญ ร้านเนื้อบุศรา บางเขน กรุงเทพฯ	ND	ND (1.43)
9	จ้างเชือด	ตลาดยิ่งเจริญ ร้านเนื้อนาซิม บางเขน กรุงเทพฯ	ND	ND
10	จ้างเชือด	ตลาดยิ่งเจริญ ร้านเนื้ออิสลามเลห์ บางเขน กรุงเทพฯ	ND	ND (2.24)
11	รับจากโรงเชือดสี่แยกไป บางปะหัน	ตลาดเทศบาลสิงคโปร์ อ.เมือง จ. สิงบุรี	ND	ND (2.04)
12	รับจากโรงเชือด ข้างวัดต้นสน	ตลาดเทศบาลอ่างทอง อ.เมือง จ. อ่างทอง	ND	ND
13	จ้างเชือด	ตลาดบางใหญ่ อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี	ND	ND (0.10)
14	จ้างเชือด	ตลาดปากเร็ด อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี	ND	ND (0.16)
15	จ้างเชือด	ตลาดฐานเพชร อ.เมือง จ. ปทุมธานี	ND	ND (1.86)
16	จ้างเชือด	ตลาดฐานเพชร อ.เมือง จ. ปทุมธานี	ND	ND (0.11)
17	รับมาจากตลาดรังสิต	ตลาดเทศบาลปทุม อ.เมือง จ. ปทุมธานี	ND	ND (1.88)
18	จ้างเชือด	ตลาดนัดวันจันทร์ วัดไทรใหญ่ อ. ไทรน้อย จ.นนทบุรี	ND	ND (1.53)
19	รับจากโรงเชือด	ตลาดบ้านนา อ.บ้านนา จ. นครนายก	ND	ND (0.91)
20	รับจากโรงเชือด	ตลาดเทศบาลนครนายก อ.เมือง จ.นครนายก	ND	ND (1.26)
21	เชือดเอง	ตลาดเทศบาลนครนายก อ.เมือง จ.นครนายก	ND	ND (0.25)
22	รับจากโรงเชือด	ตลาดเทศบาลนครนายก อ.เมือง จ.นครนายก	ND	ND

หมายเหตุ ND คือ ตรวจไม่พบ

ตารางที่ ข.3 ผลวิเคราะห์ free-FA ในสไลนาง (สีดำ) (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งที่มา	สถานที่เก็บตัวอย่าง	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
			ชุดทดสอบ	HPLC-UV
23	เชือดเอง	ตลาดบางกะปิ ร้านบาทาน บางกะปิ กรุงเทพฯ	ND	ND (0.28)
24	เชือดเอง	ตลาดบางกะปิ ร้านเนื้อเบ๊น้อย บางกะปิ กรุงเทพฯ	ND	ND (2.23)
25	ร้านเชือดเอง	ตลาดคลองเตย คลองเตย กรุงเทพฯ	ND	ND
26	ร้านเชือดเอง	ตลาดบางแค (ร้านเจ้าหม่อม) บางแค กรุงเทพฯ	ND	ND (0.21)
27	ร้านเชือดเอง	ตลาดบางแค บางแค กรุงเทพฯ	ND	ND
28	โรงเชือด	โรงเชือดบังฟืนอาดำ อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี	ND	ND (0.22)
29	รับมาจากคลองหนึ่งแก้ว นิมิตร	ตลาดพรพัฒน์ อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี	ND	ND (0.50)
30	รับมาจากคลองหนึ่งแก้ว นิมิตร	ตลาดรังสิต อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี	ND	ND
31	รับมาจากคลองหนึ่งแก้ว นิมิตร	ตลาดสะพานแดง อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี	ND	ND (2.47)
32	รับมาจากคลองหนึ่งแก้ว นิมิตร	ตลาดสุชาติ อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี	ND	ND (1.04)
33	รับมาจากคลองหนึ่งแก้ว นิมิตร	ตลาดนัด 100 ปี อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี	ND	ND (0.24)
34	รับมาจากคลองหนึ่งแก้ว นิมิตร	ตลาดพระรูปคลองสอง อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี	ND	ND (1.93)

หมายเหตุ ND คือ ตรวจไม่พบ

ตารางที่ ข.4 ผลวิเคราะห์ free-FA ในเห็ด

ลำดับที่	แหล่งที่มา	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	free-FA (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	ไม่มีข้อมูล	-	เห็ดหอม	6.88
2	ในประเทศ	ฟาร์มเห็ดโพธิ์ทอง	เห็ดนางฟ้า	ND
3		ฟาร์มเห็ดโพธิ์ทอง	เห็ดนางฟ้า	ND
4		ฟาร์มเห็ดโพธิ์ทอง	เห็ดภูฐาน	ND
5		ฟาร์มเห็ดโพธิ์ทอง	เห็ดนางนวล	< 5 (3.03)
6	ต่างประเทศ	ร้านโกลเด้นเพลซ สาขา ม. เกษตร (T&J)	เห็ดหอม	5.75
7	ต่างประเทศ	ตลาดยิ่งเจริญ โซน B	เห็ดหอม	11.07
8	ในประเทศ	ตลาดยิ่งเจริญ โซน B	เห็ดหอม	11.05
9	ต่างประเทศ	แมคโคร คลองหลวง	เห็ดหอม	11.78
10		ตลาดไท คลองหลวงร้านที่ 3	เห็ดหอม	10.31
11	ในประเทศ	นันทิตา โกษารัก จ. เลย	เห็ดหอม	19.72
12		นงคันทู ศรีชมพร จ.เลย	เห็ดหอม	13.14
13		วิชัย ชาวนา จ. เลย	เห็ดหอม	11.88
14		จ. น่าน	เห็ดหอม	16.21
15	ในประเทศ	ท็อปซูเปอร์มาร์เก็ต สาขาเซนทรัล แจ้งวัฒนะ (ไร่จตุรมสุข)	เห็ดหอม	10.51
16	ต่างประเทศ	เดอะมอลล์ งามวงศ์วาน	เห็ดหอม	8.01
17	ในประเทศ	ฟาร์ม 1 อ.ปางมะผ้า จ.ลำปาง	เห็ดหอม	22.89
18		ฟาร์ม 2 อ.ปางมะผ้า จ.ลำปาง	เห็ดหอม	7.59
19	ต่างประเทศ	บิ๊กซี สาขาวงศ์สว่าง	เห็ดหอม	5.60
20		เดอะมอลล์ งามวงศ์วาน (Natural & Premium Food)	เห็ดหอม	<5 (4.18)
21		เดอะมอลล์ งามวงศ์วาน (บ. เอกไทย ฟาร์มมิ่ง จำกัด)	เห็ดหอม	17.25
ค่าเฉลี่ย*				10.81

หมายเหตุ ND คือ ตรวจไม่พบ * คิดเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบ กรณีที่พบ <5.0 คิดเป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม