

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอะครีลาไมด์
ในอาหาร โดยใช้วิธีเจือจางไอโซโทปและ
ตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS

DEVELOPMENT AND VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF
ACRYLAMIDE IN FOODS BY ISOTOPE DILUTION
LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH
ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY

พานาวลัย กลิ่งกลางดอน
PANAWAN KIJENGLANGDON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์
ในอาหาร โดยใช้วิธีเจือจางไอโซโทปและ
ตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS

DEVELOPMENT AND VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF
ACRYLAMIDE IN FOODS BY ISOTOPE DILUTION
LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH
ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY



พานาวลัย กิ่งกลางดอน

PANAWAN KLUENGLANGDON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 74514
วัน,เดือน,ปี..... - 2 ต.ค. 2550

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

**DEVELOPMENT AND VALIDATION METHOD FOR
DETERMINATION OF ACRYLAMIDE IN FOODS BY ISOTOPE
DILUTION LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH
ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY**

PANAWAN KLUENGLANGDON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารโดยใช้วิธีเจือจางไอโซโทปและตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS
นักศึกษา	นางสาวพนาวัลย์ กลิ่งกลางคอน
รหัสประจำตัว	46063804
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี (เคมีวิเคราะห์)
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล

บทคัดย่อ

สารอะคริลาไมด์จัดเป็นสารกลุ่ม 2A ที่อาจทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ ตรวจพบในอาหารที่มีการปรุงด้วยความร้อนสูง โดยเฉพาะอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS มีสารเจือไอโซโทป ($^{13}C_3$ -อะคริลาไมด์) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดให้สามารถปฏิบัติงานได้ง่าย รวดเร็ว มีความเที่ยงและความแม่นยำสูง โดยใช้สารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดอะคริลาไมด์จากอาหาร (โดยเฉพาะอาหารที่มีปริมาณแป้งมาก) สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II เขย่าเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกำจัดชั้นเมทานอลโดยระเหยแห้ง เก็บสารอะคริลาไมด์ในชั้นน้ำและวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS ขั้นตอนการแยกโครมาโทกราฟใช้คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในอาหาร เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 20- 800 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในเมทริกซ์ต่างๆ 7 ชนิด คือ ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ถั่ว ขนมันฝรั่ง และกาแฟ พบว่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 85.0-106.1 และต่ำกว่าร้อยละ 11 ตามลำดับ ความเที่ยงในการทวนซ้ำได้ (repeatability) และทำซ้ำได้ (reproducibility) มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต่ำกว่าร้อยละ 10 ซึ่ดจำกัดการตรวจพบของทุกเมทริกซ์มีค่าน้อยกว่า 14 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณของทุกเมทริกซ์ มีค่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้นถั่วได้ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.999 ที่ระดับความเข้มข้น 2-80 ไมโครกรัมต่อลิตร ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารต่างๆทั้งหมด 161 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง ไม่พบ (น้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจพบ) ถึง 3,466 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Thesis	Development and Validation Method for Determination of Acrylamide in Foods by Isotope Dilution Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry
Student	Miss. Panawan Kluengklangdon
Student ID	46063804
Degree	Master of Science
Programme	Chemistry (Analytical Chemistry)
Year	2007
Thesis Advisor	Assoc. Prof Arunee Kongsakphaisal

ABSTRACT

Acrylamide have been found in foods cooked at high temperature, especially in carbohydrate-rich foods. It is classified as “probable human carcinogen” (group 2A). A simple and rapid method was developed for the quantitation of acrylamide in various food products. The method involved spiking the labeled internal standard (2d_3 -acrylamide) onto food products, extracting with 70 % (v/v) methanol in water (especially for starchy food), purifying the sample solution with carrez I and II solution, shaking of sample for 30 min, evaporated to dryness and dissolved in water. The final extract was analyzed by LC-ESI-MS/MS. The chromatographic separation was performed on Luna Su C18 column (2.00 mm. x 250 mm., 100 °A). In-house validation data in 7 different food matrixes (rice, corn, potato, peanut, bread, fruit and coffee) showed good results with high precision and accuracy. Recoveries of acrylamide from sample spiked at level 20- 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ranged between 85.0 and 106.1 % with relative standard deviation (RSD) of less than 11 %. Excellent results were obtained for intra-day repeatability and inter-day reproducibility (%RSD < 10). The limit of detection (LOD) was less than 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the limit of quantitation (LOQ) was 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for all matrixes except the peanut was 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and correlation coefficients (r) for calibration curve were typically better than 0.999 at level 2-80 $\mu\text{g}/\text{l}$. The analysis of 161 processed food samples that acrylamide levels ranged between ND (< LOD) to 3,466 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์ ผศ. ดร. วินัย นุตมากุล และ ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสี่ท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณผู้บริหารและเจ้าหน้าที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางสาวจันทร์ฉาย แจ็งสว่าง (ผู้อำนวยการสำนักฯ) นายประกาย บริบูรณ์ (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 9ชช.) นางลัดดาวัลย์ โรจนพรหมทิพย์ (หัวหน้างานสารปนเปื้อนและสารพิษ) นางสาวมยุรี อูรารุ่งโรจน์ และนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ ที่ให้การสนับสนุนและคำปรึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัยคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวิจักขณ์ กลิ่งกลางดอน คุณแม่เทวี กลิ่งกลางดอน คุณป้าสมใจ โคกสันเทียะและนายธนิต กลิ่งกลางดอน ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พนาวัลย์ กลิ่งกลางดอน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	X
รายการคำย่อและสัญลักษณ์.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 อะคริลาไมด์.....	5
2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารอะคริลาไมด์.....	5
2.1.2 ความเป็นพิษของสารอะคริลาไมด์ (Toxicology of acrylamide).....	6
2.1.3 การเกิดสารอะคริลาไมด์ในอาหาร (Formation of acrylamide).....	7
2.1.4 ปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่มีในอาหารและปริมาณที่คนได้รับจากอาหาร.....	12
2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวแมสสเปกโตรเมตรี (Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-MS).....	14
2.2.1 หลักการพื้นฐาน.....	14
2.2.2 แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS).....	15
2.2.3 เทคโนโลยีของอินเตอร์เฟซ (Interface Technology).....	16
2.2.4 แมสสเปกโตรมิเตอร์แบบสามควอดรูโพล (Triple Quadrupole Mass Spectrometer).....	29
2.3 เทคนิคการเจือจางไอโซโทป (Isotope dilution techniques).....	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	35
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	45
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย.....	45
3.1.1 สารมาตรฐานและวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน.....	45
3.1.2 สารเคมี.....	45
3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	45
3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	46
3.2.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหารโดยใช้เครื่อง LC-ESI-MS/MS.....	46
3.2.2 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ใน อาหารแมทริกต่างๆด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	46
3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร.....	46
3.2.4 สรุปรวบรวมและประเมินผลการศึกษา.....	46
3.3 วิธีดำเนินการ.....	47
3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน.....	47
3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration standard solution).....	48
3.3.3 การเตรียมสารละลายเคมี.....	48
3.3.4 ศึกษาการแยกล้างรบกวน (interference) ในสารละลายตัวอย่างออก จากสารที่สนใจเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS.....	49
3.3.5 ศึกษาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดสาร อะคริลาไมด์ในอาหาร (โดยเฉพาะอาหารที่มีปริมาณแป้งมาก).....	50
3.3.6 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	51
3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร.....	54
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร.....	54
3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง.....	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2 สภาวะที่เหมาะสมของโครมาโทกราฟของเหลวแทนเดิมเมสสเปก- โทรมิเตอร์ (LC-MS/MS) สำหรับวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์.....	55
3.4.3 การควบคุมคุณภาพและรายงานผล.....	56
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	57
4.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS โดยใช้เทคนิคการเจือจางไอโซโทป.....	57
4.1.1 ผลการศึกษาการแยกสิ่งรบกวน (interference) ในสารละลายตัวอย่าง ออกจากสารที่สนใจเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS.....	59
4.1.2 ผลการศึกษาตัวทำลายและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสาร อะคริลาไมด์ในอาหารเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-ESI- MS/MS.....	62
4.2 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation Method).....	67
4.2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity).....	67
4.2.2 ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดการ วิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ).....	68
4.2.3 ความเที่ยง (Precision) และ ความแม่นยำ (Accuracy).....	70
4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร.....	72
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	75
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	75
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	77
เอกสารอ้างอิง.....	78
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก. การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วย residual plots	85
ภาคผนวก ข. การคำนวณปริมาณอะคริลาไมด์.....	88
ภาคผนวก ค. คำนวณขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ...	90

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ง. จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ของแต่ละเมทริกซ์ที่ระดับความ เข้มข้นต่างๆ.....	104
ภาคผนวก จ. จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ใน SRM2387 peanut butter.....	118
ภาคผนวก ฉ. เกณฑ์การยอมรับความเที่ยงและความแม่นยำ.....	122
ภาคผนวก ช. การประเมินความถูกต้องและช่วงของความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ย...	126
ภาคผนวก ซ. การศึกษาการสูญเสียอะคริลาไมด์เมื่อเป่าแห้ง.....	129
ภาคผนวก ฌ. ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร.....	132
ประวัติผู้เขียน.....	137

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารจากผลการศึกษาของนอร์เวย์ สวีเดน สวิตเซอร์แลนด์ อังกฤษและสหรัฐอเมริกา.....	12
2.2	สรุปปริมาณการได้รับสัมผัสสารอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารประจำวัน.....	13
3.1	สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งผลิตไอออนสำหรับวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในโหมดประจุบวก (positive mode).....	55
3.2	แสดงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (multiple reaction monitoring, MRM).....	56
4.1	แสดงผลสกัดของตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของเมทานอลในน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ ในตัวอย่าง SRM2387 peanut butter และมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1...	63
4.2	แสดงผลของน้ำหนักตัวอย่างที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การสกัดในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1.....	65
4.3	แสดงเปอร์เซ็นต์การสกัดสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 2 ในสภาวะต่างๆ.....	66
4.4	แสดงขีดจำกัดการตรวจพบ(LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของการวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในอาหาร (แมทริกซ์ต่างๆ).....	68
4.5	แสดงเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆของแต่ละแมทริกซ์.....	71
4.6	แสดงความทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยวิเคราะห์ภายในวันเดียว (intra-day) และ การทำซ้ำได้ (reproducibility) โดยวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day) ในตัวอย่างSRM 2387 peanut butter.....	72
4.7	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร.....	74
ก.1	แสดงพื้นที่ใต้พีคและ residuals ของอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มี $^{2}d_3$ - อะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (ระดับความเข้มข้นละ 5 μ g).....	86
ฉ.1	แสดงค่า expected %RSD _r (การทวนซ้ำได้) และ RSD _R (การทำซ้ำได้) ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	123

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ฉ.2	แสดงผลการคำนวณ HORRAT ของแต่ละระดับความเข้มข้นในชนิดตัวอย่างต่างๆ	124
ฉ.3	แสดงผลการคำนวณ HORRAT ของการวิเคราะห์ตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter ภายในวันเดียว (intra-day) และ ระหว่างวัน (inter-day).....	125
ฉ.4	เกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	125
ช.1	แสดงปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง SRM2387 peanut butter	127
ช.2	The t-distribution (two-tailed)	128
ฉ.1	ปริมาณอะคริลาไมด์ ในขนมขบเคี้ยวหรือขนมอบกรอบบรรจุซอง โดยแบ่งเป็นประเภทต่างๆตามวัตถุดิบ.....	132
ฉ.2	ปริมาณอะคริลาไมด์ในขนมหรือของว่างไทย โดยแบ่งเป็นประเภทต่างๆตามวัตถุดิบ.....	133
ฉ.3	ปริมาณอะคริลาไมด์ในขนมปัง บิสกิต แครกเกอร์ คุกกี้และเวเฟอร์.....	134
ฉ.4	ปริมาณอะคริลาไมด์ในเฟรนฟรายด์.....	135
ฉ.5	ปริมาณอะคริลาไมด์ในธัญพืชอาหารเช้า.....	135
ฉ.6	ปริมาณอะคริลาไมด์ในบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป.....	135
ฉ.7	ปริมาณอะคริลาไมด์ในผักและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน.....	136
ฉ.8	ปริมาณอะคริลาไมด์ในกาแฟสำเร็จรูป.....	136

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของอะคริลาไมด์ (chemical structure of acrylamide).....	5
2.2	โครงสร้างของสารอะคริลาไมด์ สารไกลซิดาไมด์ หรือ 2,3 -epoxypropanamide และ glycidamide-DNA adduct.....	6
2.3	แสดงการเกิดอะคริลาไมด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับกลูโคส....	7
2.4	แสดงโครงสร้างของแอสพาราจีนและอะคริลาไมด์	8
2.5	แสดงการเกิดอะคริลาไมด์จากการสลายตัวของไขมัน.....	9
2.6	แสดงกลไกการเกิดอะคริลาไมด์จากสมมติฐานของ Zyzak และคณะ	10
2.7	แสดงกลไกการเกิดอะคริลาไมด์จากสมมติฐานของ Yaylayan และคณะ.....	11
2.8	ไดอะแกรมของระบบ HPLC.....	15
2.9	อินเตอร์เฟซแบบสายพานเคลื่อนที่ (Moving - Belt Interface).....	16
2.10	อินเตอร์เฟซแบบการนำของเหลวเข้าเครื่องโดยตรง (Direct -Liquid- Introduction Interface, DLI).....	19
2.11	อินเตอร์เฟซแบบการชนกับอะตอมความเร็วสูงขณะที่ไหลต่อเนื่อง (Continuous -Flow -Fast - Atom -Bombardment Interface).....	20
2.12	อินเตอร์เฟซแบบ dynamic FAB แบบต่างๆ.....	21
2.13	อินเตอร์เฟซแบบลำอนุภาค (Particle-Beam Interface).....	22
2.14	อินเตอร์เฟซแบบพ่นไอร้อน (Thermospray Interface).....	24
2.15	อินเตอร์เฟซแบบสเปรย์ไฟฟ้า (Electrospray Interface).....	25
2.16	แผนภาพแสดงการระเหยไอออน.....	26
2.17	แผนภาพแสดงปฏิกิริยา APCI.....	27
2.18	แผนภาพแสดงการผลิตไอออนทางเคมีที่ความดันบรรยากาศ (APCI).....	28
2.19	แผนภาพแสดง triple quadrupole mass spectrometer.....	30
2.20	การแยกสารตัวอย่างผสม R, M และ N.....	30
2.21	การแยกของ ไอออนผลิตภัณฑ์ (product ion) จากของผสม R, M และ N.....	31
2.22	แสดงการสแกน ไอออนผลิตภัณฑ์ (Product ion scan).....	32
2.23	แสดงการสแกน ไอออนตั้งต้นหรือไอออนแม่ (Precursor ion scan).....	32
2.24	แสดงการสแกนชนิดการสูญเสีย โมเลกุลที่เป็นกลางคงที่ (Constant neutral loss).....	33

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
2.25	แสดงการติดตามปฏิกิริยาเดี่ยวและหลายปฏิกิริยา (Single/multiple reaction monitoring).....	33
4.1	MRM โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 10 µg/l (m/z 72/44 , 72/55 และ 72/72) ที่มี ² d ₃ -อะคริลาไมด์เข้มข้น 40 µg/l (m/z 75/58) (ก) คอลัมน์ Atlantis dC18 5 µm 2.1 x 150 mm. (ข) คอลัมน์ Luna Su C18 100 °A 2.00 x 250 mm.	58
4.2	MRM โครมาโทแกรม ของสารละลายตัวอย่าง SRM2387 peanut butter สกัดด้วยน้ำ (ก) คอลัมน์ Atlantis dC18 5 µm 2.1 x 150 mm. (ไม่ใช่ SPE) (ข) คอลัมน์ Atlantis dC18 5 µm 2.1 x 150 mm. (ใช้ SPE) (ค) คอลัมน์ Luna Su C18 100 °A 2.00 x 250 mm (ไม่ใช่ SPE).....	61
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำที่อัตราส่วนต่างๆในตัวอย่าง SRM2387 peanut butter และมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1.....	63
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอะคริลาไมด์ของการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1 ที่น้ำหนักต่างๆ.....	65
4.5	กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ (m/z 72/55) ความเข้มข้น 0-80 µg/l ที่มี ² d ₃ -อะคริลาไมด์ (m/z 75/58) เข้มข้น 40 µg/l เป็นอินเทอร์-นอลสแตนดาร์ด.....	67
4.6	MRM โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างเมล็ดกาแฟ ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ 400 µg/kg (ก) ไม่ใช่ SPE ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (ข) ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วย SPE Oasis MCX.....	69
ก.1	แสดง Residual plots รูปแบบต่างๆ.....	85
ก.2	แสดงการพลอตระหว่าง y-residual กับอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (² d ₃ -อะคริลาไมด์).....	87

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

AA	หมายถึง	อะคริลาไมด์ (acrylamide)
AFSSA	หมายถึง	French Food Safety Agency
API	หมายถึง	ผลิตไอออนที่ความดันบรรยากาศ (atmospheric pressure ionization)
APCI	หมายถึง	อินเตอร์เฟซแบบผลิตไอออนทางเคมีที่ความดันบรรยากาศ (Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface)
BAG	หมายถึง	Swiss Federal Office of Public Health
BfR	หมายถึง	Bundesinstitut für Risikobewertung
C	หมายถึง	concentration ratio
CAD	หมายถึง	Collision Gas
CE	หมายถึง	Collision Energy
CI	หมายถึง	เกิดไอออนแบบวิธีทางเคมี (chemical ionization)
CI	หมายถึง	ช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval)
CID	หมายถึง	การชนกันกับแก๊สอาร์กอน (collision-induced dissociation)
conc.	หมายถึง	ความเข้มข้น
CUR	หมายถึง	Curtain Gas
CXP	หมายถึง	Collision Cell Exit Potential
DC	หมายถึง	ศักย์ไฟฟ้ากระแสตรง
df	หมายถึง	degree of freedom
DLI	หมายถึง	อินเตอร์เฟซแบบการนำของเหลวเข้าเครื่องโดยตรง (Direct-Liquid-Introduction Interface)
DP	หมายถึง	Declustering Potential
DPP	หมายถึง	differential pulse polarography
EI	หมายถึง	เกิดไอออนแบบอิเล็กตรอนอิมแพคต์ (electron impact)
EP	หมายถึง	Entrance Potential
ESI	หมายถึง	อินเตอร์เฟซแบบสเปรย์ไฟฟ้า (Electrospray Interface)
EU SCF	หมายถึง	European Union Scientific Committee on Food

รายการคำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

FAO	หมายถึง	องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ
FAB	หมายถึง	เกิดไอออนแบบการชนกับอะตอมความเร็วสูง (fast atom bombardment ionization)
g	หมายถึง	หน่วยน้ำหนักของเครื่องหมุนเหวี่ยง
g	หมายถึง	น้ำหนัก หน่วย “กรัม”
GC-ECD	หมายถึง	แก๊สโครมาโทกราฟี มีอิเล็กตรอนแคปเจอร์เป็นดีเทคเตอร์
GC-MS	หมายถึง	แมสสเปกโตรเมทรีต่อควบคู่กับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
GS ₁	หมายถึง	Ion Source Gas 1
GS ₂	หมายถึง	Ion Source Gas 2
HPLC	หมายถึง	โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง
IARC	หมายถึง	International Agency for Research on Cancer
IS	หมายถึง	Ion Spray Voltage
IS	หมายถึง	อินเทอร์เนอลสแตนดาร์ด (internal standard)
JECFA	หมายถึง	Joint Expert Committee on Food Additives
k	หมายถึง	ค่าแฟกเตอร์ความจุ
kPa	หมายถึง	ความดันในหน่วย “Kilopascal”
kV	หมายถึง	ความต่างศักย์ในหน่วย “กิโลโวลต์”
LC	หมายถึง	โครมาโทกราฟีของเหลว
LC-DAD	หมายถึง	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะภาพสูง มีไดโอดอาร์เรย์ เป็นดีเทคเตอร์
LC-MS	หมายถึง	แมสสเปกโตรเมทรีต่อควบคู่กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว
LC-ESI -MS/MS	หมายถึง	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแทนเต็มแมสสเปกโตรมิเตอร์อินเตอร์เฟสแบบสเปรย์ไฟฟ้า
LOAEL	หมายถึง	ค่าปริมาณต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (lowest observe adverse effect level)
LOD	หมายถึง	ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection)
LOQ	หมายถึง	ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation)
m/z	หมายถึง	มวลต่อประจุ

รายการคำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

mg	หมายถึง	มิลลิกรัม
ml	หมายถึง	มิลลิลิตร
MRM	หมายถึง	การตรวจติดตามการทรานซ์ซันแบบหลายปฏิกิริยา
MS	หมายถึง	แมสสเปกโตรมิเตอร์
MS/MS	หมายถึง	เทคนิคแทนเต็มแมสสเปกโตรเมทรี
μ	หมายถึง	ค่าจริงหรือค่าอ้างอิง
$\mu\text{g/kg}$	หมายถึง	ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
$\mu\text{g/l}$	หมายถึง	ไมโครกรัมต่อลิตร
ND	หมายถึง	ตรวจไม่พบ (มีค่าน้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจพบ)
NFA	หมายถึง	Swedish National Food Administration
NFCS	หมายถึง	National focal centres
NOAEL	หมายถึง	ค่าปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ (no observe adverse effect level)
ng	หมายถึง	นาโนกรัม
ng/g	หมายถึง	นาโนกรัมต่อกรัม
ppb	หมายถึง	ส่วนในพันล้านส่วน
ppm	หมายถึง	ส่วนในล้านส่วน
Q1	หมายถึง	ควอตุไรล์ส่วนที่ 1 ทำหน้าที่คัดแยกมวล
Q2	หมายถึง	ควอตุไรล์ส่วนที่ 2 ทำให้เกิดการแตกย่อยของไอออน (fragmentation)
Q3	หมายถึง	ควอตุไรล์ส่วนที่ 3 ทำหน้าที่คัดแยกมวล
r	หมายถึง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
R ²	หมายถึง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ
R _r	หมายถึง	อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ² d ₃ - อะคริลาไมด์ (แกน y)
R _c	หมายถึง	อัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ² d ₃ - อะคริลาไมด์ (แกน x)
%Rec	หมายถึง	เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery)
RF	หมายถึง	ความถี่คลื่นวิทยุ

รายการคำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

RSD	หมายถึง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
RSD _r	หมายถึง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทวนซ้ำได้ (repeatability)
RSD _R	หมายถึง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทำซ้ำได้ (reproducibility)
RT	หมายถึง	เวลาที่ถูกหน่วงไว้
SCE	หมายถึง	ขั้วคาโลเมลชนิดอิ่มตัว (saturated calomel electrode)
SD	หมายถึง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
SNT	หมายถึง	Norwegian Food Control Authority
SNFA	หมายถึง	The Swedish National Food Administration
SPE	หมายถึง	การสกัดแบบเฟสของแข็ง (solid phase extraction)
SRM	หมายถึง	selected reaction monitoring
SRM	หมายถึง	วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Standard Reference Material)
std	หมายถึง	standard
t _c	หมายถึง	ค่า t-distribution ที่จุดวิกฤต (t-critical)
TIC	หมายถึง	กระแสไอออนรวม (total - ion - current)
UK	หมายถึง	อังกฤษ
UV	หมายถึง	Ultraviolet
US-FDA	หมายถึง	the US Food and Drug Administration
USA	หมายถึง	สหรัฐอเมริกา
% v/v	หมายถึง	ร้อยละโดยปริมาตร
WHO	หมายถึง	องค์การอนามัยโลก
Wt.	หมายถึง	น้ำหนัก
\bar{x}	หมายถึง	ค่าเฉลี่ย
x _i	หมายถึง	ค่าของข้อมูลแต่ละค่า

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

ปัจจุบันธุรกิจอาหารประเภทฟาสต์ฟู้ดมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องควบคู่ไปกับอุตสาหกรรมขนมแป้งอบกรอบ (ขนมขบเคี้ยว) ซึ่งส่วนมากทำมาจากแป้งข้าวโพด ข้าวสาลี หรือ มันฝรั่ง นำมาทอดแล้วปรุงแต่งรสต่างๆ ลงไป และที่น่าเป็นห่วงคือ มีการโฆษณาขนมขบเคี้ยวอย่างมากมายทางสื่อต่างๆ โดยเฉพาะโทรทัศน์ เป็นการส่งเสริมทำให้มีการบริโภคอาหารประเภทนี้มากขึ้น โดยเฉพาะเด็กและวัยรุ่น บางครั้งไม่สนใจการรับประทานอาหารหลักทำให้ได้รับสารอาหารไม่ครบถ้วน นอกจากนี้มีรายงานวิจัยเมื่อเดือน เมษายน ปี ค.ศ. 2002 ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารแห่งชาติประเทศสวีเดน (Swedish National Food Administration; NFA) และมหาวิทยาลัยสต็อกโฮล์ม (Stockholm University) ได้สร้างความไม่สบายใจแก่ผู้บริโภคที่นิยมรับประทานอาหารจำพวกแป้งไปทั่วโลก โดยงานวิจัยดังกล่าวได้ระบุว่า อาหารจำพวกแป้งที่ผ่านการเตรียมหรือปรุงสุกด้วยอุณหภูมิสูงโดยวิธีการทอด อบ ปิ้งหรือย่าง มีสารพิษที่เรียกว่า “อะคริลาไมด์” เกิดขึ้น แต่สารนี้จะไม่เกิดขึ้นโดยวิธีการต้ม [1]

สารอะคริลาไมด์ (acrylamide) มีการใช้ทั่วโลกมากกว่า 200 ล้านกิโลกรัมต่อปี ซึ่งจะใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมเช่น เป็นโมโนเมอร์ที่นำมาผลิตโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งช่วยกรองสิ่งสกปรกหรือสารปนเปื้อนในน้ำดื่ม ซึ่งโพลีอะคริลาไมด์นั้นไม่ก่อให้เกิดพิษ นอกจากนั้นอะคริลาไมด์ยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกสำหรับบรรจุอาหาร กาว กระดาษ เครื่องสำอางและอื่นๆ ในอดีตแหล่งที่พบการปนเปื้อนของสารนี้ส่วนใหญ่เป็นในน้ำดื่ม และควันบุหรี่ปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบในบุหรี่ 1-2 ไมโครกรัมต่อบุหรี่ 1 มวน [2] สำหรับในน้ำดื่มทางสหภาพยุโรปได้กำหนดมาตรฐานไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร นอกจากนั้นยังมีการกำหนดมาตรฐานของสารอะคริลาไมด์ที่ปนเปื้อนสู่อาหารจากพลาสติกที่ห่อหุ้มอาหารไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [3] ไม่มีใครคาดมาก่อนว่าอะคริลาไมด์จะเกิดได้ในกระบวนการผลิตอาหารครั้งแรกที่มีการตรวจวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหาร คือ การตรวจในมะเขือเทศ [4] เห็ดที่ปลูกในเจลที่ผลิตจากโพลีอะคริลาไมด์ [5] ที่สงสัยว่าอาจมีบางโมโนเมอร์ของอะคริลาไมด์ที่เหลือตกค้างผลคือไม่พบการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ จนกระทั่งมีรายงานตรวจพบสารอะคริลาไมด์ในอาหารของประเทศสวีเดน ซึ่งอาหารจำพวกแป้งที่ผ่านการอบหรือทอดจะพบสารนี้ปนเปื้อนในปริมาณสูง เช่น เฟรนช์ฟราย (0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มันฝรั่งแผ่น (1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และขนมปัง (0.04 – 1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นต้น [2] สารอะคริลาไมด์มีพิษต่อระบบประสาท และมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ สถาบันวิจัยมะเร็งแห่งชาติ (International Agency for Research on

Cancer , IARC) จัดให้สารอะคริลาไมด์อยู่ในระดับที่มีความเป็นไปได้ที่จะก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ (probably carcinogenic to humans, group 2A) ถึงแม้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าสารอะคริลาไมด์เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์แต่ก็สามารถทำให้สัตว์ทดลองเป็นมะเร็งและก่อกลายพันธุ์ได้ [6, 7]

กระบวนการเกิดสารอะคริลาไมด์ในอาหารนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ในปี ค.ศ. 2002 งานวิจัยของ Mottram และคณะ [8] กับ Stadler และคณะ [9] เสนอว่าสาเหตุของการเกิดสารอะคริลาไมด์ในอาหารเกิดผ่านปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า “Maillard reaction” ปฏิกิริยานี้ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาล ซึ่งกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยา (precursors) ก็คือ แอสพาราจิ้น (asparagines) พบมากในมันฝรั่งและธัญพืช ส่วนงานวิจัยของ Yasuhara และคณะ [10] เสนอว่าการเกิดสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่มีไขมันสูงนั้นจะเกิดจากการให้ความร้อนสูงของกรดอะมิโนจะทำให้ได้แอมโมเนียและแอมโมเนียที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยากับกรดอะคริลิก (acrylic acid) ซึ่งกรดอะคริลิกในอาหารจะเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอะโครลีน (acrolein) ที่เกิดจากปฏิกิริยาขจัดน้ำออก (dehydration) ของกลีเซอรอล

สารอะคริลาไมด์มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและขาดแคลนกลุ่มโครโมฟอร์ (chromophore) จึงไม่ง่ายในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการใช้แมสสเปกโตรเมทรีต่อควบคู่กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว (LC-MS) หรือแมสสเปกโตรเมทรีต่อควบคู่กับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-MS) และใช้ไอโซโทปอะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์เนอลสแตนดาร์ด (internal standard) นั้นจึงเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในอาหาร [11]

การใช้เทคนิค GC-MS ในการตรวจวิเคราะห์อะคริลาไมด์ เนื่องจากสารนี้มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีขั้วและจุดเดือดสูง ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีนั้นจึงต้องทำการเตรียมสารอนุพันธ์ (derivatization) ก่อนที่จะตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS [12-14] การเตรียมสารอนุพันธ์ที่นิยมคือปฏิกิริยาเพิ่มเข้าโบรมีน (bromination) ข้อดีของการเตรียมสารอนุพันธ์คือสารอนุพันธ์จะระเหยง่ายและลดความมีขั้วของสารนี้ ทำให้สามารถแยกง่ายด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายเมื่อใช้สารอินทรีย์เป็นตัวสกัด ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นเพิ่มความจำเพาะมากขึ้นเมื่อใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีเป็นดีเทคเตอร์ แต่ข้อเสียของการทำอนุพันธ์นั้นคือการเสี่ยงต่อการสูญเสียสารที่สนใจ (analyte) เนื่องจากความไม่เสถียรของสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น หรือการทำปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ ความผิดพลาดของผลการตรวจวิเคราะห์ที่มากกว่าความเป็นจริง (false positive) เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงหรือมีสิ่งรบกวนจากสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองเวลาและเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานจากพิษและการกัดกร่อนของโบรมีน ส่วนการวิเคราะห์โดยตรงด้วย GC-MS ที่ไม่ต้องผ่านการเตรียมสารอนุพันธ์นั้น [15] ควรจะต้องมีการประเมินการสูญเสียอะคริลาไมด์บริเวณจุดฉีด (injection port) ส่วนการใช้เทคนิค LC-MS ในการตรวจวิเคราะห์อะคริลาไมด์ เนื่องจากสารนี้มี

จุดเดือดสูงและการละลายน้ำได้ดีที่สุด (2,155 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และเมทานอล (1,150 กรัมต่อลิตร) [16] จึงเหมาะกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว มีข้อดีคือสามารถตรวจวัดโดยตรงเมื่อสกัดด้วยน้ำ ไม่ต้องทำอนุพันธ์และสามารถเพิ่มปริมาตรที่ใช้ในการตรวจวัด (injection volume) ได้มากขึ้น แต่ข้อเสียคือการแยกในคอลัมน์รีเวอร์สเฟสจะไม่ดีเนื่องจากสารนี้มีขั้วจึงถูกหน่วงไว้ (retention) ในคอลัมน์ได้น้อย และมีสิ่งรบกวนเนื่องจากการสกัด ถึงแม้เทคนิคแมสสเปกโทเมทรีจะเป็นดีเทคเตอร์ที่มีความจำเพาะสูง แต่มวลของอะคริลาไมด์และการแตกตัวเป็นไอออนส่วนย่อย (fragment) ของสารนี้ไม่มีความจำเพาะ (specific) เนื่องจากสิ่งรบกวนที่มีมวลต่อประจุ (m/z) เหมือนกับสารอะคริลาไมด์ ซึ่งสิ่งรบกวนนี้สามารถหลีกเลี่ยงได้เมื่อใช้เทคนิคแทนเต็มแมสสเปกโทเมทรี (MS/MS) เป็นดีเทคเตอร์แต่ก็ยังไม่สมบูรณ์ [17] หลายงานวิจัยปรับปรุงวิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนก่อนจะตรวจวัดด้วยแทนเต็มแมสสเปกโทมิเตอร์โดยใช้การสกัดแบบเฟสของแข็ง (solid phase extraction , SPE) ทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น [18-25] Rosen J. และคณะ [18] เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการตรวจวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหารที่ปรุงด้วยความร้อน โดยใช้เทคนิคการเจือจางไอโซโทปและตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

รายงานการประชุม Codex เรื่อง “Food Additive and Contaminants” ขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) ระหว่างวันที่ 24-28 เมษายน ค.ศ. 2006 ได้รวบรวมวิธีวิเคราะห์และเทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในอาหาร สรุปว่าอิทธิพลของเทคนิคการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกันนั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างเต็มรูปแบบ [26] โดยทั่วไปนั้นจะใช้น้ำเป็นตัวสกัดสารอะคริลาไมด์จากอาหาร แต่ในอาหารจำพวกที่มีแป้งสูงเช่น มันฝรั่ง นั้น การสกัดด้วยน้ำค่อนข้างยากเนื่องจากการละลายร่วมของคอลลอยด์ ทำให้สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้มีลักษณะหนืดและกรองผ่านเมมเบรนได้ยากเนื่องจากเกิดการอุดตันของเมมเบรน หลายงานวิจัยต้องแยกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วด้วยความเร็วรอบต่อนาทีที่ค่อนข้างสูง [24] หรือการกรองผ่านเมมเบรนด้วยวิธี centrifuge spin filter [18] เนื่องจากเมทานอลไม่สามารถสกัดโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เช่น แป้งและเพคติน (pectin) มักจะพบในอาหารจำพวกพืช [27] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการสกัดอะคริลาไมด์ในอาหารด้วยสารละลายผสมของเมทานอลกับน้ำ เพื่อลดปัญหาการสกัดในอาหารที่แป้งสูง คงประสิทธิภาพในการสกัดสารนี้สูงและสามารถตรวจวิเคราะห์อาหารชนิดอื่นๆ ได้ ตรวจวัดสารอะคริลาไมด์ที่สกัดได้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแทนเต็มแมสสเปกโทมิเตอร์ อินเตอร์เฟสแบบสเปิร์ย์ไฟฟ้า (LC-ESI-MS/MS) และแยกสิ่งรบกวนออกจากสารที่สนใจโดยใช้การแยกของคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแทนการทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง

หลายประเทศมีการรายงานการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารพบว่าปนเปื้อนปริมาณสูง แต่ในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารนี้ ดังนั้นจึงควรมีการตรวจ

วิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการทอด อบ ปิ้งหรือย่าง เพื่อให้ได้ข้อมูลใช้เป็นแนวทางคุ้มครองผู้บริโภคให้ปลอดภัย และทำการประเมินความเสี่ยงของการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารนี้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหาร ด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS ให้สามารถปฏิบัติงานได้ง่าย รวดเร็ว ผลวิเคราะห์มีความแม่นยำและความเที่ยงสูง วิเคราะห์อาหารได้หลากหลายชนิด

2. ตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร โดยเฉพาะอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการทอด อบ ปิ้งหรือย่าง โดยเก็บตัวอย่างอาหารมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดและตรวจวัดสารอะคริลาไมด์ในอาหาร
- ทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) ได้แก่ ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection) ขีดจำกัดการวิเคราะห์หาปริมาณ (limit of quantitation) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)
- ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร โดยเฉพาะอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหาร ด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารหลากหลายชนิด
- ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารของประเทศไทย
- ข้อมูลการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้ใช้เป็นแนวทางคุ้มครองผู้บริโภคให้ปลอดภัยและสามารถนำไปใช้ประกอบการประเมินความเสี่ยงการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารนี้ของคนไทย

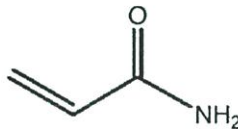
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อะคริลาไมด์

2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารอะคริลาไมด์ (CAS-No. 79-06-1) [16,18]

อะคริลาไมด์ (acrylamide) หรือมีชื่อพ้องเหมือน 2-propenamide, ethylene carboxamide, acrylic acid amide, vinyl amide และ propenoic acid amide เป็นโมเลกุลขนาดเล็กมีมวลโมเลกุล 71.08 ดาลตัน สูตรโมเลกุล C_3H_5NO สูตรโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวที่อุณหภูมิห้อง การละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในน้ำ (2,155 กรัมต่อลิตร) และละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เมทานอล (1,550 กรัมต่อลิตร) เอทานอล (860 กรัมต่อลิตร) อะซิโตน (631 กรัมต่อลิตร) อะซิโทไนไตร์ (396 กรัมต่อลิตร) และเอทิลอะซิเตต (126 กรัมต่อลิตร) แต่ละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน เฮปเทน และ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร) จุดหลอมเหลว 84.5 ± 0.3 องศาเซลเซียส และจุดเดือด 136 องศาเซลเซียส (ที่ 3.3 kPa) จะเกิดโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 84 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของอะคริลาไมด์ (chemical structure of acrylamide)

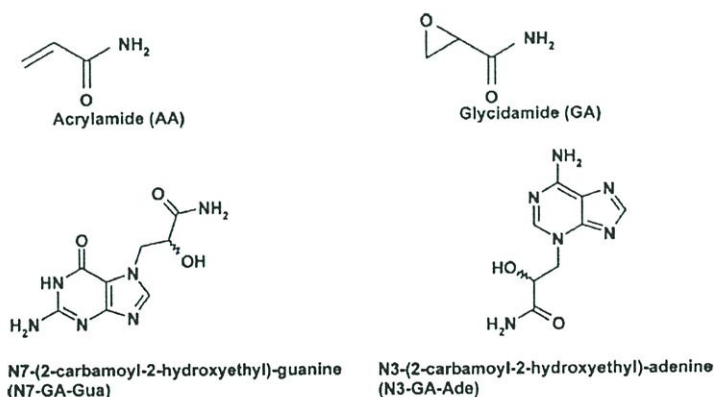
อะคริลาไมด์ขาดแคลนกลุ่มโครโมฟอร์ (chromophore) เนื่องจากข้อจำกัดการคอนจูเกชัน (conjugation) ของ π -อิเล็กตรอน ทำให้การตรวจวัดด้วย UV ค่อนข้างยาก และไม่เกิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) อะคริลาไมด์เป็น โมโนเมอร์ที่มี 2 หมู่ฟังก์ชันนัล ประกอบด้วยพันธะคู่ที่ขาดแคลนอิเล็กตรอนซึ่งว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา (reactive electron-deficient double bond) และหมู่เอไมด์ (amide) การเกิดปฏิกิริยาของ 2 หมู่ฟังก์ชันนัลนี้จะทำให้อะคริลาไมด์มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งกรดอ่อนและเบสอ่อน

2.1.2 ความเป็นพิษของสารอะคริลาไมด์ (Toxicology of acrylamide) [3, 29, 30]

สารอะคริลาไมด์สามารถก่อการกลายพันธุ์และก่อมะเร็งได้ในหนูทดลองแต่ในมนุษย์ยังไม่พบหลักฐาน ดังนั้นสารอะคริลาไมด์จึงจัดเป็นสารก่อมะเร็ง กลุ่ม 2 A คือ มีความเป็นไปได้ที่จะก่อเกิดมะเร็งในมนุษย์ สารอะคริลาไมด์เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเมตาบอไลซ์ เป็นสารอีพอกไซด์ (epoxide) ซึ่งสารเมตาโบไลต์ที่สำคัญคือ ไกลซิคาไมด์ (glycidamide) มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ที่แรงกว่าอะคริลาไมด์ ซึ่งสารนี้จะจับกับ DNA ได้ดีกว่าอะคริลาไมด์ ลักษณะของ DNA adduct ที่ได้จากการศึกษาปฏิกิริยาในหลอดทดลองของ DNA กับ ไกลซิคาไมด์ที่สำคัญ คือ N7-GA-Gua และ N3-GA-Ade (รูปที่ 2.2) เป็นสาเหตุทำลายพันธุกรรม (genetic) อัตราการเกิดปฏิกิริยาของอะคริลาไมด์กับ DNA จะช้ากว่าไกลซิคาไมด์ สารทั้งสองนี้กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ทดลองได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งในน้ำนมและขับถ่ายได้เร็ว ในหนูทดลองจะขับถ่ายเหลือเพียงครึ่งหนึ่งใน 2 ชั่วโมง การได้รับสัมผัสสารอะคริลาไมด์เป็นเวลานานในหนูทดลองจะทำให้เกิดเนื้องอก ถ้าได้รับสารนี้ในปริมาณสูงจะมีผลกระทบต่อระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์

- พิษต่อระบบประสาท จากการศึกษาคณงานในประเทศจีนที่ทำงานกับสารอะคริลาไมด์และอะคริโลไนไตรล์ (acrylonitrile) นานกว่า 2 ปี และการศึกษาในสัตว์ทดลองหลายชนิดสรุปได้ว่าค่าปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ (no observe adverse effect level, NOAEL) เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน และค่าปริมาณต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (lowest observe adverse effect level, LOAEL) เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน

- การก่อมะเร็ง ในหนูทดลองที่ให้สารนี้พบการเกิดเนื้องอกในอวัยวะต่างๆ เช่น ไทรอยด์และแอดรีนาล ส่วนในมนุษย์ ผลการศึกษาาระบาดวิทยาของผู้ได้รับสัมผัสสารนี้เป็นเวลานานในสองช่วงเวลา พบว่าการเกิดมะเร็งสมองเพิ่มขึ้นร้อยละ 15 และมะเร็งอื่นรวมกันร้อยละ 9 จึงไม่ได้หมายความว่าสารนี้ไม่สามารถก่อมะเร็งในมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าไกลซิคาไมด์ก่อให้เกิดมะเร็งที่ผิวหนัง และเซลล์สืบพันธุ์ (germ cells) มากกว่าอะคริลาไมด์



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของสารอะคริลาไมด์ สารไกลซิคาไมด์ หรือ 2, 3 – epoxypropanamide และ glycidamide -DNA adduct [2]

2.1.3 การเกิดสารอะคริลาไมด์ในอาหาร (Formation of acrylamide)

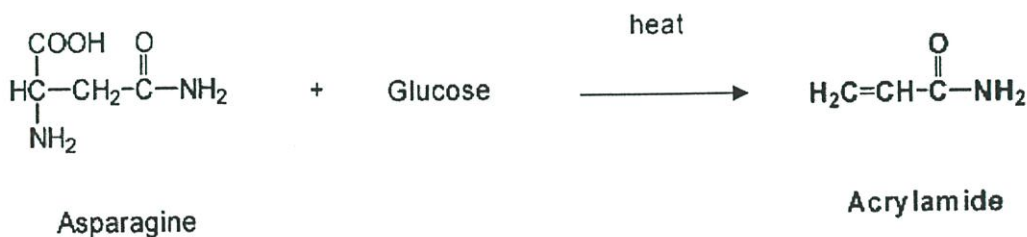
อะคริลาไมด์เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กและโครงสร้างง่าย สามารถเกิดขึ้นได้ในอาหารที่ผ่านความร้อนโดยจะเกิดผ่านกลไกหลากหลาย ซึ่งรวมไปถึงปฏิกิริยาของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน และองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร ตั้งแต่มีการตรวจพบสารอะคริลาไมด์ในอาหาร มีหลายงานวิจัยที่ศึกษากลไกของการเกิดสารนี้ [8, 9, 12, 31, 34] แต่ยังไม่ทราบแน่ชัด ข้อสังเกตต่างๆ ที่น่าสนใจของลักษณะการเกิดอะคริลาไมด์ในอาหาร [8] ดังนี้

- อาหารดิบจะไม่พบอะคริลาไมด์หรือพบปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งหมายความว่า การเกิดอะคริลาไมด์นั้นจะต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อน
- อาหารที่มีโปรตีนสูงจะพบปริมาณอะคริลาไมด์น้อยกว่าอาหารที่มีแป้งสูง
- พบปริมาณอะคริลาไมด์สูงในอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์มันฝรั่งทอด เช่น เฟรนช์ฟราย มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ
- อาหารจำพวกเนื้อทอดพบปริมาณอะคริลาไมด์ต่ำ (น้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

- การเกิดอะคริลาไมด์ในอาหารจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าในอาหารถูกระเหยไปมากขึ้น

- อุณหภูมิที่มากกว่า 120 องศาเซลเซียส จะมีอิทธิพลต่อการเกิดอะคริลาไมด์จะมีมากขึ้น

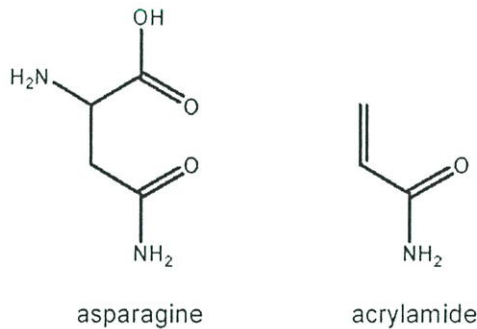
หลายกลุ่มยืนยันการเกิดอะคริลาไมด์ว่าเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดอย่างแน่นอน เช่น งานวิจัยของ Mottram และคณะ [8] รายงานว่าสารอะคริลาไมด์เกิดจากแอสพาราจีนที่ถูกให้ความร้อนกับกลูโคสหรือ dicarbonyl 2,3-butanedione และได้ตั้งสมมติฐานการเกิดสารนี้ว่าเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด ผ่าน dicarbonyl-assisted Strecker degradation ของแอสพาราจีน ในเวลาเดียวกันกับงานวิจัยของ Stadler และคณะ [9] แสดงให้เห็นการแยกสลายตัวด้วยความร้อน (pyrolysis) ของแอสพาราจีนกับกลูโคส (หรือน้ำตาลอื่นๆ) ทำให้เกิดอะคริลาไมด์ (รูปที่ 2.3) พบว่าเกิดสารอะคริลาไมด์ประมาณ 1,700 เท่าเมื่อเทียบกับการเกิดสารนี้จากการแยกสลายตัวด้วยความร้อนของสารแอสพาราจีนเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 2.3 แสดงการเกิดอะคริลาไมด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับกลูโคส [31]

จากการเจือไอโซโทปของกลูโคสและแอสพาราจีนแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลไม่ใช่โครงสร้างหลักของโมเลกุลอะคริลาไมด์ นอกจากนี้พบว่าอะตอมไนโตรเจนของอะคริลาไมด์มาจากกลุ่มเอไมด์ (amide) ของแอสพาราจีน จึงระบุได้ว่าสารแอสพาราจีนเป็นสารตั้งต้นหลัก (precursor) ในการเกิดอะคริลาไมด์ ซึ่งมีข้อสนับสนุนต่างๆดังนี้

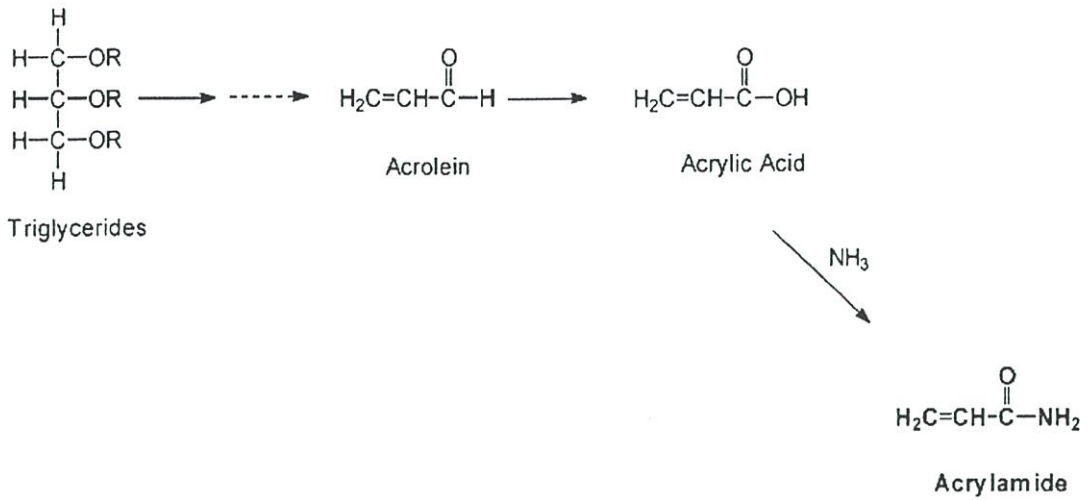
- โมเลกุลของแอสพาราจีนมีโครงสร้างใกล้เคียงกับโมเลกุลของอะคริลาไมด์ (รูปที่ 2.4) เมื่อแอสพาราจีนถูกกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) และกำจัดแอมโมเนียออก (deamination) จะได้อะคริลาไมด์เกิดขึ้น
- พบว่าผลิตภัณฑ์มันฝรั่งทอดมักจะมีปริมาณอะคริลาไมด์สูง ซึ่งในมันฝรั่งนั้นจะประกอบด้วยแอสพาราจีนอิสระ (free acrylamide) ปริมาณมาก
- แอสพาราจีนอิสระยังพบในพืชรับประทานชนิดอื่นรวมทั้งธัญพืช



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของแอสพาราจีนและอะคริลาไมด์

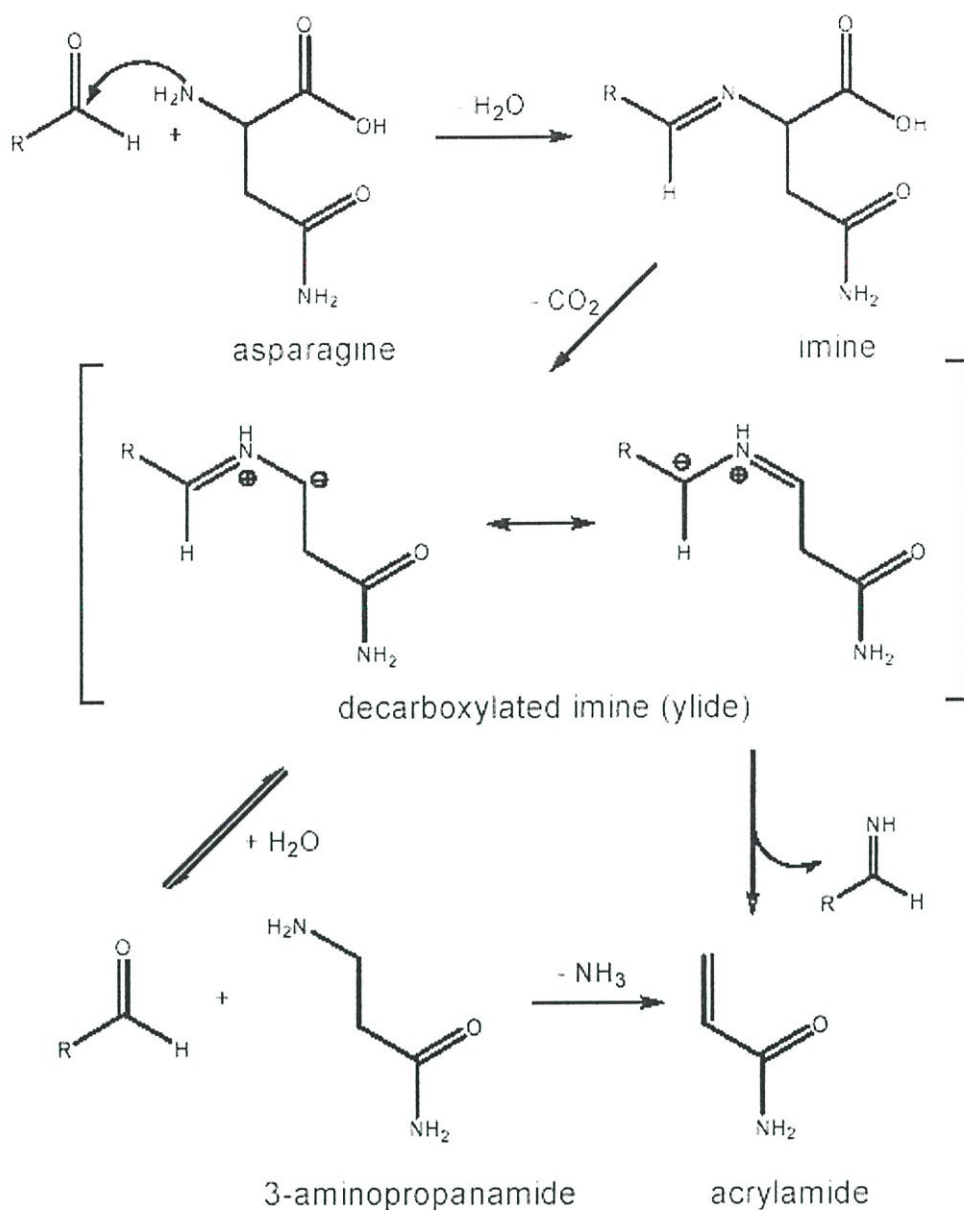
ต่อมาทีมงานวิจัยอื่นๆที่ได้ระบุเช่นกันว่า สารตั้งต้นหลักของอะคริลาไมด์คือ แอสพาราจีน และรายงานการเกิดสารอะคริลาไมด์รองลงมาคือ การให้ความร้อนแก่สารแอสพาราจีนอย่างเดียว นอกจากนั้นยังศึกษาการเกิดอะคริลาไมด์จากกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ เช่น กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) กลูตามีน (glutamine) เมทไทโอนีน (methionine) ซีสเทอีน (cysteine) และไลซีน (lysine) ที่แยกสลายตัวด้วยความร้อนกับน้ำตาลรีดิวซิงนั้น พบว่าเกิดอะคริลาไมด์เพียงเล็กน้อย [31]

งานวิจัยของ Umano, K. และ Shibamoto, K. เสนอว่าอะคริลาไมด์เกิดจากน้ำมันและสารประกอบในอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ กลีเซอรอล (glycerol) สลายตัวด้วยความร้อนได้อะโครลีน (acrolein) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้กรดอะคริลิก (acrylic acid) สุดท้ายเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะคริลิกกับแอมโมเนีย ซึ่งได้จากการสลายตัวด้วยความร้อนของสารประกอบที่มีไนโตรเจน ทำให้เกิดอะคริลาไมด์ [31] ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงการเกิดอะครีลาไมด์จากการสลายตัวของไขมัน [31]

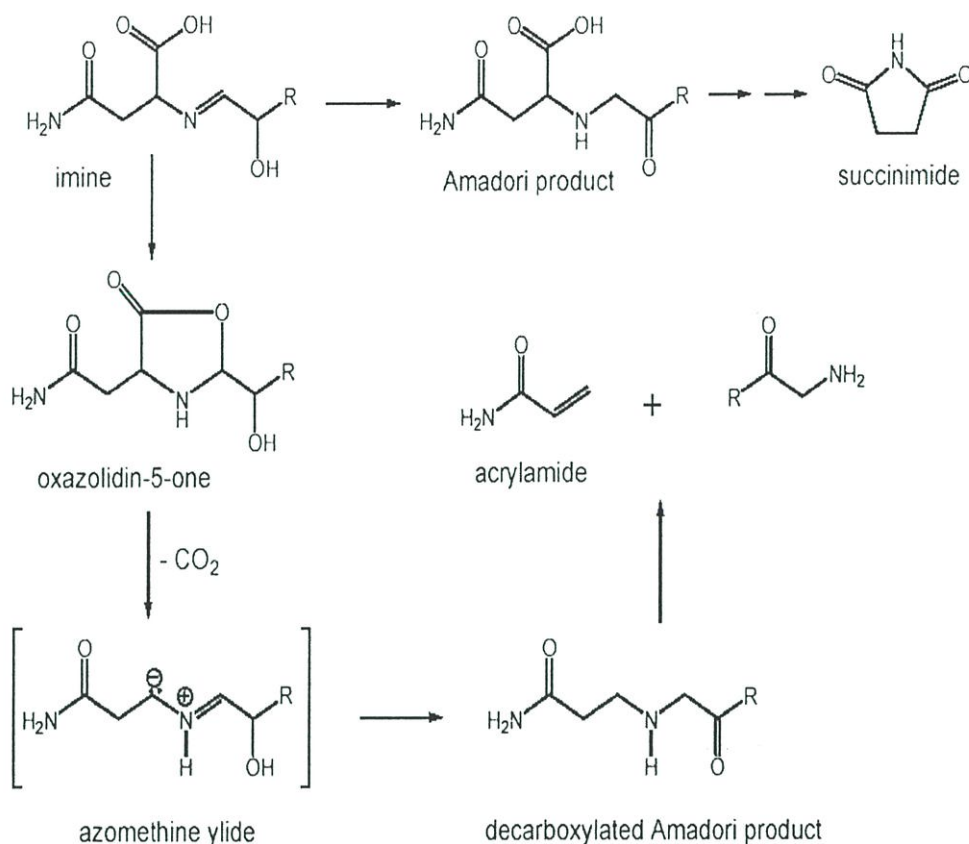
ปัจจุบันมีศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการเกิดอะครีลาไมด์ เช่น งานวิจัยของ Zyzak และคณะ [32] กลไกของการเกิดอะครีลาไมด์จากปฏิกิริยาของกรดอะมิโนแอสพาราจีนกับสารประกอบที่มีคาร์บอนิล เมื่อการให้ความร้อนทำให้เกิด Schiff base และกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ออกจาก Schiff base จากนั้นสามารถเกิดอะครีลาไมด์ได้โดยตรงจากการปฏิกิริยาจัดของอิมินหรือการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolyze) ทำให้เกิด 3-aminopropanamide จากนั้นจะสลายตัวโดยขจัดแอมโมเนียออก เกิดเป็นสารอะครีลาไมด์ (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการเกิดอะคริลาไมด์จากสมมติฐานของ Zyzak และคณะ [33]

งานวิจัยของ Yaylayan และคณะ [34] เมื่อให้การสลายตัวด้วยความร้อนของแอสพาราจีน จะทำให้เกิด maleimide เป็นผลิตภัณฑ์หลัก เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยารวมเป็นวงภายในโมเลกุล (intramolecular cyclization reaction) อย่างรวดเร็วทำให้ป้องกันการเกิดของอะคริลาไมด์ คณะวิจัยพบการเกิด succinimide จากการให้ความร้อนแก่ของผสมระหว่างแอสพาราจีนและกลูโคสเกิดเป็น Amadori product จากนั้นเกิดปฏิกิริยารวมเป็นวงภายในโมเลกุล (intramolecular cyclization) เกิดเป็น succinimide และตั้งสมมติฐานการเกิดแข่งขันของปฏิกิริยารวมเป็นวงภายในโมเลกุลระหว่าง Amadori product กับ Schiff base (ทำให้ได้ oxazolidin-5-one) เมื่อกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์

ออกจะได้ azomethine ylide ซึ่งจะไม่มีรวมเป็นวงภายในโมเลกุลเนื่องจากการหายไปของหมู่คาร์บอกซิลแต่จะทำให้เกิดอะคริลาไมด์โดยผ่านปฏิกิริยา retro Michael แสดงดังรูปที่ 2.7 จากสมมติฐานนี้สามารถอธิบายได้ว่าทำไมแอสพาราจีนจึงต้องการน้ำตาลรีดิวซิงในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้สารอะคริลาไมด์ เพราะถ้าไม่มีน้ำตาลหมู่คาร์บอกซิลของแอสพาราจีนจากเกิดเพียงการรวมเป็นวงภายในโมเลกุลทำให้ได้ succinimide



รูปที่ 2.7 แสดงกลไกการเกิดอะคริลาไมด์จากสมมติฐานของ Yaylayan และคณะ [33]

สรุปเมื่ออาหารได้รับความร้อนอาจเกิดอะคริลาไมด์ได้ 3 แนวทาง [35] คือ

1) เกิดจากอะโครลีน (2-propenal, $CH_2=CH-CHO$) ซึ่งมาจากการสลายตัวของไขมันกรดอะมิโน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างกรดอะมิโนหรือโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต อะโครลีนเป็นสารตั้งต้นที่เป็นไปได้ที่ทำให้เกิดอะคริลาไมด์ เช่นการทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียอิสระ(จากกรดอะมิโน) สามารถเปลี่ยนอะโครลีนให้เป็นอะคริลาไมด์

2) เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) การจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) กำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) ของโปรตีนและหรือกรดอะมิโน

3) เกิดจากกรดอะมิโนโดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดอะคริลาไมด์ในอาหารนอกจากสารตั้งต้นปฏิกิริยา (แอสพาราจีนและน้ำตาลรีดิวซิง) แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดอะคริลาไมด์ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาในการปรุงอาหาร สภาพแวดล้อมหรือพารามิเตอร์ในการเกิดปฏิกิริยา เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณน้ำ พื้นที่ผิวและบริเวณที่จะเกิดสีน้ำตาล [7]

2.1.4. ปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่มีในอาหารและปริมาณที่คนได้รับจากอาหาร [3, 7, 35]

หลังจากสถาบัน NFA ของสวีเดนเปิดเผยข้อมูลการพบสารนี้ในอาหารที่สำรวจหลายชนิดในเดือนเมษายน 2545 ประเทศอื่นก็ได้ทำการสำรวจอาหารในประเทศตนเองทันที ได้ข้อมูลที่สอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยสวีเดน คือ พบในอาหารทอดหรืออบ โดยเฉพาะมันฝรั่งหรือมันเทศ ขนมันฝรั่งและขนมันฝรั่งกรอบ หลายตัวอย่างพบปริมาณสูงมากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คณะที่ปรึกษา FAO/WHO ได้รวบรวมข้อมูลการสำรวจอาหารของประเทศต่างๆ ที่ได้ผลก่อนวันประชุมคือ 25-27 มิถุนายน 2545 ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารจากผลการศึกษานอร์เวย์ สวีเดน สวิตเซอร์แลนด์ อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา [35]

อาหาร/กลุ่มผลิตภัณฑ์	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	ค่าเฉลี่ย	ค่ากลาง	ค่าต่ำ-ค่าสูง	จำนวนตัวอย่าง
Crisps, potato/ sweet potato	1,312	1,343	170-2,287	38
Chip, potato	537	330	น้อยกว่า 50 -3,500	39
Batter based products	36	36	น้อยกว่า 30 - 42	2
Bakery products	112	น้อยกว่า 50	น้อยกว่า 50-450	19
Biscuits, crackers, toast, bread crisps	423	142	น้อยกว่า 30- 3,200	58
Breakfast cereals	298	150	น้อยกว่า 30- 1,346	29
Crisps, corn	218	167	34- 416	7
Bread, soft	50	30	น้อยกว่า 30- 162	41
Fish and seafood products, crumbed, battered	35	35	30-39	4
Poultry or game, crumbed, battered	52	52	39-64	2
Instant malt drinks	50	50	น้อยกว่า 50 - 70	3
Chocolate powder	75	75	น้อยกว่า 50 - 100	2
Coffee powder	200	200	170-230	3
Beer	น้อยกว่า 30	น้อยกว่า 30	น้อยกว่า 30	1

การประเมินการได้รับสัมผัสสารอะคริลาไมด์ ผู้บริโภคทั่วไปโดยส่วนใหญ่แล้วจะได้รับสารนี้เข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหาร มีหลายหน่วยงานได้ทำการศึกษาการประเมินปริมาณการได้รับสัมผัสสารอะคริลาไมด์ที่ได้จากการบริโภคอาหาร ดังสรุปในตารางที่ 2.2 การประเมินการได้รับสัมผัสจากการบริโภคอาหารในระยะเวลาสั้นพบปริมาณการบริโภคเฉลี่ย 0.2 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน และการบริโภคที่ปริมาณสูง 3.4 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน นอกจากนี้ยังมีการคาดหมายกันว่าเด็กอาจจะได้รับสารอะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหารในปริมาณที่มากกว่าผู้ใหญ่ 2-3 เท่า เมื่อใช้น้ำหนักตัวเป็นพื้นฐานในการพิจารณา ทั้งนี้ผู้บริโภคบางคนอาจได้รับสารอะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากกว่าค่าเฉลี่ย 2-3 เท่า

ตารางที่ 2.2 สรุปปริมาณการได้รับสัมผัสสารอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารประจำวัน [7]

หน่วยงาน/ประเทศ	ปริมาณการได้รับสัมผัสสารอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารประจำวัน (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน)*
FAO/WHO	0.3-0.8
EU SCF	0.2-0.4
BfR, Germany	1.1 – 3.4
BAG, Switzerland	0.28
SNT, Norway	0.32 – 1.35
AFSSA, France	0.5 - 2.9
SNFA, Sweden	0.45 – 1.03
NFCS, Netherlands	0.48 – 1.1
USA	0.43 – 2.31
UK	0.3 – 1.8
JECFA	1 – 4

* ช่วง คือ การประเมินได้รับสัมผัสจากการบริโภคเฉลี่ย ถึง สูง

สหรัฐอเมริกาโดย US-FDA เผยแพร่การสำรวจรวม 3 ช่วง คือ ตัวอย่างที่เก็บก่อน 15 พฤศจิกายน 2545 ระหว่างพฤศจิกายน 2545-7 กุมภาพันธ์ 2546 และช่วง 8 กุมภาพันธ์-ตุลาคม 2546 รวมอาหาร 22 ชนิด 449 ตัวอย่าง กับได้ตรวจปริมาณสารนี้ในอาหารตามโครงการ Total diet study [3] อันเป็นแผนงานที่ใช้ประมาณค่าได้รับสารเคมีจากอาหารต่อวัน (เช่น สารกำจัดศัตรูพืช โลหะหนัก) ของคนอเมริกันอายุและเพศต่างๆอยู่แล้ว โดยเก็บตัวอย่างอาหารปรุงสำเร็จ อาหารที่

ต้องนำมาปรุงสุกก่อนบริโภคและอาหารที่บริโภคดิบ เช่น ผลไม้จากรัฐในภาคตะวันตก กลางและเหนือใต้และตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งหมด 286 ชนิด ข้อมูลในภาพรวมจากทั้งสองโครงการพบอะคริลาไมด์ระดับต่างๆ คือ

- พบสูง ในอาหารที่มีแป้งซึ่งปรุงสุกด้วยการทอดน้ำมันและอบขนมปังบางชนิดหลังปิ้งพบสารนี้สูงขึ้น 5-6 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในขนมปังกรอบ

- พบ ในผักบางชนิดที่ปรุงสุกบางส่วนคือ แครอท สควอช ถั่วลันเตา และมะกอกดำ

- พบปริมาณไม่มาก ในขนมกรอบจากข้าวเจ้าข้าวผัดจากร้านอาหารจีน พิซซา ทาโก้ ข้าวโพดคั่วที่อบโดยไม่โครเวฟ ถั่วลันเตาอบ เนย ถั่วลันเตา เมล็ดทานตะวันอบ

- พบเล็กน้อย ในไก่ชุบแป้งทอด

- ไม่พบ ในเนื้อวัว ไก่ ตับวัว หมู แฮม ปลาตุ๋น ซึ่งทอดน้ำมัน น้ำมันมะกอกและน้ำมันพืช สหรัฐอเมริกาได้นำข้อมูลที่ได้เพิ่มใหม่มาประเมินการได้รับสัมผัสสารพิษนี้ (exposure assessment) จากการบริโภคอาหารประจำวันของคนอเมริกัน ได้ค่าเท่ากับทั้งข้อมูลปี 2546 และ 2547 คือ 0.4 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน มีการศึกษาในอังกฤษ เปรียบเทียบระดับอะคริลาไมด์ในอาหารชนิดเดียวกันที่ปรุงเองในบ้าน กับที่ผลิตเป็นการค้า พบว่าปริมาณใกล้เคียงกัน

2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวแมสสเปกโตรเมตรี (Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-MS) [36, 37, 38]

2.2.1 หลักการพื้นฐาน

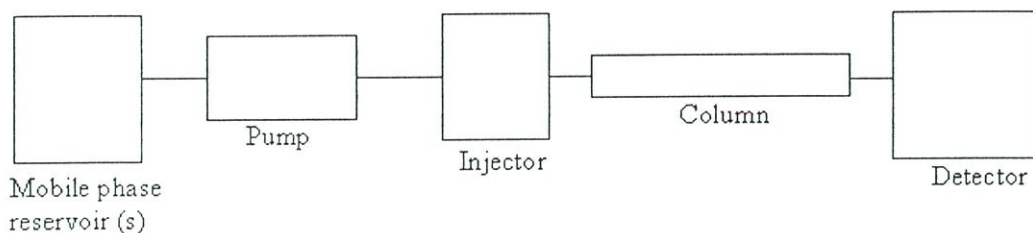
เทคนิค LC-MS ต้องมีอินเตอร์เฟซระหว่างเครื่องโครมาโทกราฟและแหล่งผลิตไอออนของเครื่อง MS ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่ต้องจัดของเหลวที่เป็นตัวทำละลายทั้งหลายออกจากส่วนที่แยกได้จากเครื่อง HPLC จึงเป็นการลดความดันของสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับแหล่งที่ทำให้ไอออนของมวลที่จะวิเคราะห์ในขณะนั้น

สำหรับเครื่อง LC-MS ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 3 อย่าง คือ

- 1) เครื่อง LC เพื่อใช้แยกสารประกอบที่ต้องการออกจากสารผสม
- 2) อินเตอร์เฟซใช้ลำเลียงสารที่วิเคราะห์เข้าสู่แหล่งผลิตไอออนของเครื่อง MS
- 3) เครื่อง MS ใช้ผลิตไอออนและวิเคราะห์มวลสารแต่ละชนิดที่แยกได้จากเครื่อง LC

ปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่การแยกสารด้วยเทคนิค HPLC มีพื้นฐานเกี่ยวข้องกับการพาร์ติชัน (partitioning) ของโมเลกุลที่จะวิเคราะห์ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นของเหลวกับเฟสนิ่ง (stationary phase) ซึ่งเป็นอนุภาคของแข็ง ส่วนประกอบที่จำเป็นของระบบ HPLC คือ มีแหล่งเก็บตัวทำละลาย (solvent reservoir) ระบบส่งตัวทำละลาย ฉีดสารแบบปริมาตรคงที่ (loop

injector) คอลัมน์และเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) (รูปที่ 2.8) สัญญาณที่ได้ส่งไปยังระบบจัดการข้อมูล (data system)



รูปที่ 2.8 โค้ดแกรมของระบบ HPLC [36]

2.2.2 แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS)

แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเครื่องมือใช้ตรวจวัดมวลของโมเลกุลมีประจุไฟฟ้าหรือไอออน แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์และหาปริมาณสารประกอบและอธิบายลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของโมเลกุล มีข้อดีที่สำคัญคือมีความจำเพาะต่อโมเลกุล (molecular specificity) สูงและมีความไวสูงในการตรวจวัด (detection sensitivity) ไอออนในแมสสเปกโตรมิเตอร์นั้นจะถูกจัดเก็บเป็นมวลต่อประจุ (m/z) เฉพาะแต่ละไอออน สัญญาณที่ได้จากดีเทคเตอร์เกิดจากการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้า ขนาดของสัญญาณไฟฟ้านั้นจะสอดคล้องกับมวลต่อประจุที่ถูกเปลี่ยนให้เป็นแมสสเปกตรัม (mass spectrum) โดยระบบข้อมูล (data system)

การเชื่อมต่อ HPLC เข้ากับ MS จึงเป็นเสมือนการประสานผลประโยชน์ อันเนื่องมาจากความสามารถในการแยกสารผสมออกจากกันด้วยค่ารีโซลูชัน (resolution) สูงๆของเทคนิค HPLC และความสามารถในการตรวจสอบลักษณะเฉพาะตัวทางโครงสร้างด้วยความไวสูงๆของเทคนิคแทนเต็มแมสสเปกโตรเมทรี (MS-MS) จึงกลายมาเป็นความสำเร็จในการหา universal detector สำหรับระบบ LC และข้อดีที่สำคัญในเบื้องต้นของเทคนิค LC-MS มีดังนี้ [38]

- เพิ่มขีดความสามารถ (capability) ของเทคนิค HPLC และ MS ให้สูงขึ้น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง HPLC ที่สามารถแยกสารด้วยค่ารีโซลูชันสูงก็ได้ หรือสามารถเลือกใช้เครื่อง MS ที่มีค่ารีโซลูชันต่ำ และราคาไม่แพงนักมาเป็นเครื่องตรวจวัดมวลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

- สามารถปรับปรุงให้มีความจำเพาะต่อโมเลกุล (molecular specificity) ของการวิเคราะห์ เนื่องจากสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้จากข้อมูลการรีเทนของกระบวนการแยก (chromatographic retention time) และข้อมูลจาก MS ที่จำเพาะต่อโครงสร้างของโมเลกุล

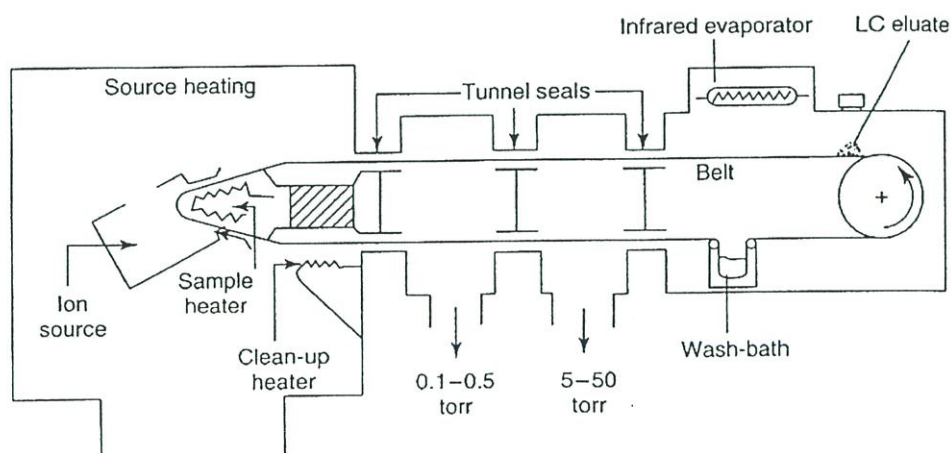
- สามารถวิเคราะห์สารผสมที่ยุ่งยากซับซ้อนได้ง่าย

- สามารถปรับปรุงความไวของการวิเคราะห์ เนื่องจากสารตัวอย่างที่เข้าสู่เครื่อง MS อยู่ในลักษณะแถบแคบๆ (narrow-focused band) ที่แยกออกจาก HPLC
- ลดขั้นตอนอื่นๆ ในการทดลองได้บ้าง ส่งผลให้สูญเสียตัวอย่างน้อยที่สุดและการย่นเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดให้สั้นลง
- ใช้สารตัวอย่างน้อยกว่าวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง LC-MS แบบแยกกันคนละเครื่อง
- เนื่องจากการแยกสารด้วย HPLC เสมือนการทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้น (sample cleanup) ดังนั้น การปรับสัญญาณในการวิเคราะห์ด้วย MS จึงทำได้ง่ายขึ้น เป็นการปรับปรุงคุณภาพข้อมูลของเมสสเปกตรัมได้อีกทางหนึ่ง

2.2.3 เทคโนโลยีของอินเตอร์เฟซ (Interface Technology)

แม้ว่าได้พยายามนำ LC มาต่อเข้ากับ MS ตั้งแต่ปี 1970 เป็นต้นมาก็ตาม ก็ยังไม่ค่อยประสบความสำเร็จอย่างมีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างทางพื้นฐานในด้านสภาวะการทำงาน อินเตอร์เฟซเป็นตัวต่อประสานระหว่าง LC และ MS ทำหน้าที่ให้โมเลกุลของสารในสถานะสารละลายแตกตัวเป็นไอออน มีการพัฒนาอินเตอร์เฟซของ LC-MS หลายรูปแบบ แต่ก็มีเพียงไม่กี่แบบที่ใช้ได้ผลดีและเป็นที่ยอมรับกันอยู่ทั่วไปมีอินเตอร์เฟซบางแบบเท่านั้นที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ปัจจุบันอินเตอร์เฟซสำหรับ LC-MS ที่นิยมใช้ คือแบบสเปรย์ไฟฟ้าและแบบผลิตไอออนทางเคมีที่มีความดันบรรยากาศ

2.2.3.1 อินเตอร์เฟซแบบสายพานเคลื่อนที่ (Moving-Belt Interface) เป็นอินเตอร์เฟซชนิดแรกสำหรับ LC-MS ที่มีการขาย แต่ก็ยังไม่คิดตลาดเท่าไรนัก เป็นการออกแบบระบบเชื่อมต่อเครื่องมือซึ่งให้สารที่แยกได้จาก LC ถูกขนถ่ายไปตามกลไกขับเคลื่อนเข้าสู่แหล่งผลิตไอออนของเครื่องเมสสเปกโตรมิเตอร์ ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 อินเตอร์เฟซแบบสายพานเคลื่อนที่ (Moving-Belt Interface) [36]

หลักการดำเนินงานแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 สารที่ถูกชะออกมา เช่น เฟสเคลื่อนที่และสารที่สนใจ (analyte) จะเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องบนสายพาน

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนการกำจัดเฟสเคลื่อนที่โดยสายพานจะเคลื่อนที่ผ่านช่องให้ความร้อน infrared heater

ขั้นตอนที่ 3 สายพานเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่แหล่งผลิตไอออน สารตัวอย่างระเหยออกจากสายพานนี้อย่างรวดเร็ว

ขั้นตอนที่ 4 ทำความสะอาดสายพานโดยการให้ความร้อนหรือมีอ่างน้ำล้างเพื่อกำจัดส่วนประกอบที่ไม่ระเหยหรือตัวอย่างที่เหลือก่อนที่จะเริ่มวิเคราะห์ครั้งต่อไป ซึ่งเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2-4

รูปแบบการสะสมบนสายพานของสารที่สนใจนั้นขึ้นอยู่กับเฟสเคลื่อนที่และอัตราการไหล โดยที่ต้องรักษาสมดุลของอัตราการสะสมของตัวทำละลาย ความเร็วของสายพานและความร้อนที่ให้โดย infrared evaporator นั้น การที่สายพานเคลื่อนที่เร็วเกินไปจะสัมพันธ์กับการสะสมซึ่งจะทำให้ตัวอย่างไม่สามารถสะสมบนสายพานได้ทุกส่วนเป็นผลทำให้กระแสไอออนรวม (total - ion - current ,TIC) ไม่สม่ำเสมอและแมสสเปกตรามีความต่อเนื่อง เป็นสาเหตุทำให้การแปลผล (interpretation) เกิดผิดพลาดได้ โดยเฉพาะเมื่อมีการเทียบ library จากเครื่องมือ การขาดความต่อเนื่องของ TIC ก็อาจเกิดขึ้นได้เหมือนกันถ้าสายพานเคลื่อนช้ามากเกินไป ภายใต้สภาวะนี้จะทำให้เฟสเคลื่อนที่เกิดหยดมากกว่าที่จะแผ่อกบนสายพาน หยดที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ต้องเพิ่มความร้อนมากขึ้นเพื่อจะระเหยตัวทำละลายและอาจทำให้สารประกอบที่ไม่เสถียรต่อความร้อนนั้นเกิดการสลายตัวได้

ข้อดีของอินเตอร์เฟสชนิดนี้

- สามารถใช้กับสภาวะของ HPLC ได้หลากหลายสภาวะเช่น อัตราการไหลและเฟสเคลื่อนที่ใช้ได้ทั้งนอร์มอลเฟสและรีเวอร์สเฟส โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีการใช้งานแบบสเปรย์สะสม (spray deposition)

- สารที่สนใจนั้นสามารถเลือกใช้วิธีการไอออไนเซชัน แบบอิเล็กตรอนอิมแพคต์ (electron impact, EI) เกิดไอออนแบบวิธีทางเคมี (chemical ionization, CI) และแบบการชนกับอะตอมความเร็วสูง (fast atom bombardment ionization , FAB) ที่หาได้ง่าย

ข้อเสียของอินเตอร์เฟสชนิดนี้

- มักพบว่าแมสสเปกตรัมที่ได้จากการใช้อินเตอร์เฟสชนิดนี้นั้นมีสัญญาณรบกวนทางเคมี (chemical background) สูง ซึ่งเกิดจากวัสดุของใช้ผลิตสายพานที่ทำมาจาก stainless steel หรือ polyimide ดังนั้นก่อนใช้งานต้องเตรียมสภาวะ (conditioning) ของสายพานประมาณ 12 ชั่วโมง

- สายพานอาจเกิดการพลิกคว่ำหรือหักในขณะที่ทำงานได้

- ไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่ไม่เสถียรต่อความร้อนเนื่องจากต้องมีการให้ความร้อนเพื่อกำจัดเฟสเคลื่อนที่และลำเลียงสารที่สนใจจากสายพานไปยังแหล่งกำเนิดไอออนของแมสสเปกโทรมิเตอร์ สารประกอบที่ระเหยยากทำให้ไม่สามารถถูกดึงออกจากสายพานได้ ยกเว้นต้องใช้วิธี FAB ในการไอออไนเซชัน

- เฟสเคลื่อนที่ที่มีสัดส่วนของน้ำอยู่ในปริมาณมากนั้นจะทำให้เกิดหยดบนสายพานแทนที่จะเป็นฟิล์ม ทำให้ขาดความต่อเนื่องของ TIC และไม่สามารถถอดแบบแมสสเปกตราได้

- พบว่ามักมีผลกระทบจาก “memory effect” เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ถึงแม้ว่าจะมีการให้ความร้อนหรืออ่างน้ำในการทำความสะอาด

- ผลจากแรงตึงผิวสามารถลดขีดจำกัดในการตรวจพบ (detection limit)

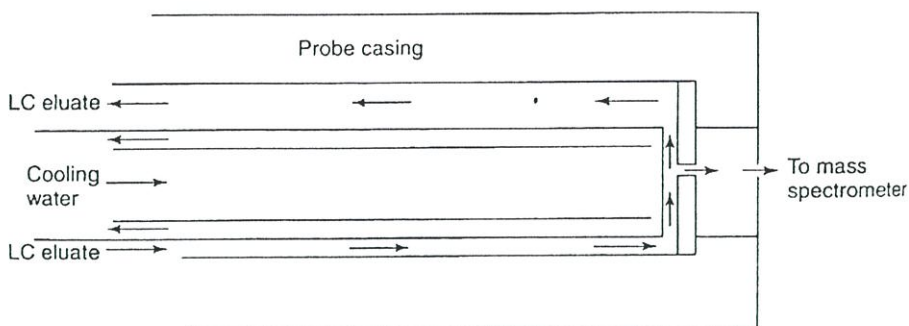
- ต้องหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่ระเหยเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการอุดตันใน tunnel seal ซึ่งจะเป็นส่วนที่แยกส่วนสุญญากาศที่แตกต่างกันของอินเทอร์เฟซ ตรงบริเวณนี้มักจะทำให้สายพานเกิดการชนได้ง่าย

2.2.3.2 อินเทอร์เฟซแบบการนำของเหลวเข้าเครื่องโดยตรง (Direct-Liquid-Introduction Interface, DLI) อินเทอร์เฟซแบบนี้สามารถนำของเหลวเข้าเครื่องโดยตรงนั้น จัดเป็นอีกเทคนิคหนึ่งปล่อยให้ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ไหลสู่แมสสเปกโทรมิเตอร์โดยตรง ที่ปลายของอินเทอร์เฟซมีรูเล็กๆ (pinhole) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมครอน ซึ่งอยู่ติดกับช่องระเหยตัวทำละลาย (desolvation chamber) ที่แนบอยู่กับแหล่งกำเนิดไอออนของแมสสเปกโทรมิเตอร์ (รูปที่ 2.10) ส่วนที่แยกจากคอลัมน์ของ HPLC จะไหลเวียนไปรอบๆ อินเทอร์เฟซจนถึง pinhole และพุ่งผ่านออกมาในลักษณะ “liquid jet” อัตราการไหลมากที่สุดที่เหมาะสมกับการทำงานของแมสสเปกโทรมิเตอร์อยู่ในช่วง 10-20 ไมโครลิตรต่อนาที โดยทั่วไปนั้น HPLC ใช้อัตราการไหลประมาณ 500 -1000 ไมโครลิตรต่อนาทีดังนั้นจะมีสารที่แยกจากคอลัมน์เพียง 1-4 % เท่านั้นที่วิ่งไปถึงแหล่งกำเนิดไอออน ทำให้ความไว (sensitivity) ต่ำ ช่องระเหยตัวทำละลายจะช่วยให้การใช้เทคนิค DLI กับ CI-MS แบบธรรมดาบังเกิดผลดียิ่งขึ้น การใช้น้ำหล่อเย็นที่ปลายอินเทอร์เฟซจะช่วยป้องกันมิให้เกิดการระเหยตัวทำละลายออกไปก่อน

ข้อดีของอินเทอร์เฟซชนิดนี้

- ไม่มีการให้ความร้อนกับอินเทอร์เฟซทำให้สามารถใช้กับตัวอย่างที่ไม่ทนความร้อนได้มากกว่าอินเทอร์เฟซแบบสายพานเคลื่อนที่

- อินเทอร์เฟซประกอบด้วยส่วนที่ไม่เคลื่อนที่ ทำให้ราคาถูก ง่ายในการติดตั้งและใช้งาน



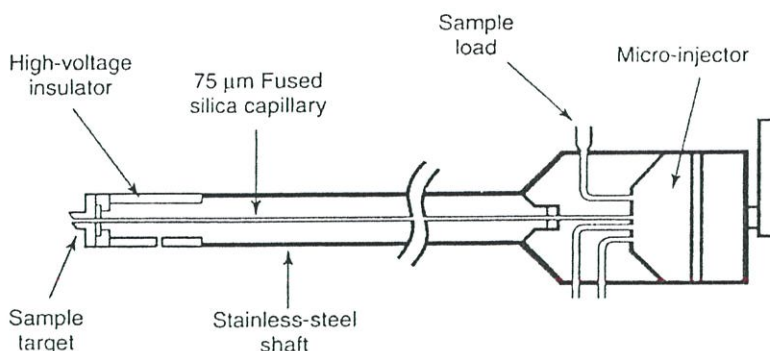
รูปที่ 2.10 อินเตอร์เฟซแบบการนำของเหลวเข้าเครื่องโดยตรง (Direct-Liquid- Introduction Interface, DLI) [36]

ข้อเสียของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

- สารประกอบที่ไม่ระเหยมักจะไม่สามารถทำให้เป็นไอออนได้
- การเกิดจุดตันของ pinhole ดังนั้นระบบต้องปราศจากของแข็ง
- ความไวต่ำ

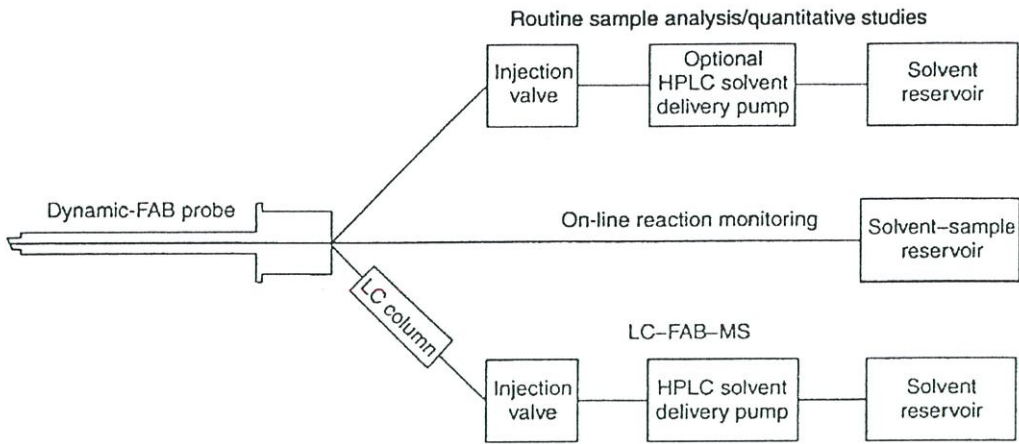
2.2.3.3 อินเตอร์เฟซแบบการชนกับอะตอมความเร็วสูงขณะที่ไหลต่อเนื่อง (Continuous -

Flow -Fast-Atom-Bombardment Interface) เทคนิค Fast Atom Bombardment (FAB) แบบดั้งเดิมนั้นจะผสมสารที่สนใจกับ matrix material ที่เหมาะสม นำสารละลายผสมนี้เข้าไปที่ปลาย probe ตรงบริเวณแหล่งกำเนิดไอออนในแมสสเปกโตรมิเตอร์จากการ bombard กับลำของอะตอมหรือไอออน ส่วนใหญ่ matrix material ที่ใช้นั้นจะเป็นของเหลว เช่น กลีเซอรอล เดิมลงไปเพื่อละลายสารที่สนใจและทำให้สารที่สนใจเกิดไอออนในเซชันได้ง่ายโดยการถ่ายโอนพลังงานพลังงานสำหรับการไอออนในเซชันได้จากอะตอมพลังงานสูง โดยทั่วไปใช้ซีนอน (xenon) หรือลำไอออน (Cs^+) อยู่ตรงบริเวณปลาย probe สารละลายผสมจะถูกชนด้วยอะตอมความเร็วสูง เมื่อนำมาต่อเชื่อมกับ HPLC การไหลแบบต่อเนื่องของ HPLC ทำให้เกิดลำของไอออน (ionizing beam) เมื่อนำเทคนิค FAB มาใช้ประโยชน์ใน LC-MS จะเรียกว่า “ continuous- flow FAB ” โดยอาจจะเติม matrix material ในสารที่ชะจาก HPLC ได้ทั้งก่อนหรือหลังคอลัมน์ และของผสมนี้จะไหลอย่างต่อเนื่องไปยังปลาย probe ที่ใส่เข้าไปในแมสสเปกโตรมิเตอร์ จากนั้น bombard กับลำของอะตอม อินเตอร์เฟซประกอบด้วย probe ที่มีหลอดจิวอยู่ตรงกลางที่จะให้สารที่ถูกชะจาก HPLC ไหลผ่าน (รูปที่ 2.11) พบว่าเทคนิค FAB เมื่อมีเฟสเคลื่อนที่จะใช้ matrix material ลดลงเหลือประมาณเพียง 5-10 % จึงลดการรบกวนสัญญาณ ทำให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค FAB แบบดั้งเดิม



รูปที่ 2.11 อินเตอร์เฟซแบบการชนกับอะตอมความเร็วสูงขณะที่ไหลต่อเนื่อง (Continuous-Flow – Fast-Atom-Bombardment Interface) [36]

การเติม matrix material ในเฟสเคลื่อนที่ก่อนที่จะทำการผ่านคอลัมน์จะมีผลกระทบต่อ การแยกของโครมาโทกราฟ แต่ถ้าเติมหลังจากผ่านคอลัมน์จะพบว่าทำให้พีคกว้าง จึงได้มีการ พัฒนาอินเตอร์เฟซแบบ “dynamic FAB” ซึ่งจะเติม matrix material ปริมาณเพียงเล็กน้อยโดยไม่ทำ ให้ประสิทธิภาพในการเกิดไอออนในเซชันลดลง กรณี static FAB สารที่สนใจละลายใน matrix material นั้นมีวัตถุประสงค์ 2 อย่างคือ ถ่ายโอนพลังงานจากลำของอะตอมหรือไอออนที่ใช้ bombard ไปยังสารที่สนใจ และการเติมเต็มพื้นที่ผิวในการ bombard ของโมเลกุลสารที่สนใจอย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดการไอออนในซ่มมากที่สุด แต่สำหรับ dynamic FAB นั้น การเติมเต็มพื้นที่ผิวไม่ สำคัญ เนื่องจากกระแสของเหลวที่ต่อเนื่องทำให้ได้โมเลกุลสารที่สนใจใหม่เสมอ วัตถุประสงค์ หลักของเติม matrix material ที่เติมลงไป คือ การถ่ายโอนพลังงานจึงสามารถใช้ปริมาณน้อยได้ โดยปกติใช้ประมาณ 1 % ความไวของ dynamic FAB ดีกว่า static FAB เป็นผลมาจากการลดลง ของการรวมตัวระหว่างสารที่สนใจและ matrix material นอกจากนี้ dynamic FAB ยังสามารถใช้ กับระบบ HPLC ที่ไม่มีคอลัมน์สำหรับแยกได้ (รูปที่ 2.12) จากความแตกต่างของความดันระหว่าง แมสสเปกโตรมิเตอร์กับสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการนั้นทำให้สามารถดึงดูสารละลาย (สารที่ สนใจและ matrix material) เข้าไปใน probe โดยผ่านหลอดจิวได้โดยตรง ข้อดีอย่างเดียวของ dynamic FAB คือสามารถศึกษาสารที่สนใจในช่วงมวลโมเลกุลต่ำกว่า 2,000 คาลตัน แต่สำหรับ static FAB ในช่วงมวลโมเลกุลสูงกว่า 10,000 คาลตัน



รูปที่ 2.12 อินเตอร์เฟซแบบ dynamic FAB แบบต่างๆ [36]

ข้อดีของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

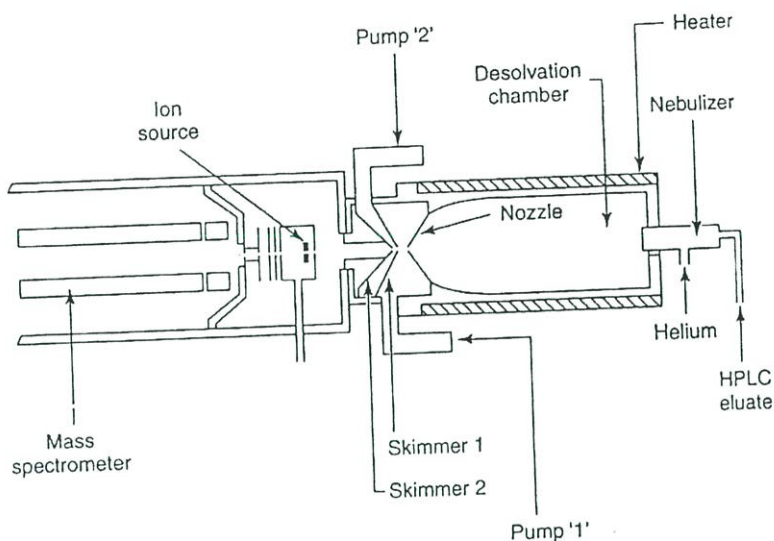
- อินเตอร์เฟซชนิดนี้เหมาะสำหรับสารประกอบที่เสถียรต่อความร้อนเพราะมีการให้ความร้อนที่ปลาย probe เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเฟสเคลื่อนที่ขณะที่ย่อย เนื่องจากเมื่อเกิดการระเหยของเฟสเคลื่อนที่จะทำให้อุณหภูมิตั้งปลาย probe ลดลง
- อินเตอร์เฟซชนิดนี้สามารถใช้กับอัตราการไหลต่ำ ดังนั้นสามารถใช้คอลัมน์ HPLC แบบไมโครบอร์ (microbore) จะให้พีคแคบและความไวสูงสามารถใช้กับตัวอย่างปริมาณน้อยได้
- สามารถใช้ปริมาณ matrix material เล็กน้อยเมื่อใช้ dynamic FAB จะลดสัญญาณรบกวนทางเคมี
- เฟสเคลื่อนที่สามารถใช้เปอร์เซ็นต์ของน้ำสูงได้

ข้อเสียของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

- การเติม matrix material ในเฟสเคลื่อนที่ก่อนผ่านคอลัมน์จะทำให้การแยกของโครมาโทกราฟีมีปัญหา ในกรณีที่ใช้คอลัมน์ที่เส้นผ่านศูนย์กลางเล็ก อัตราการไหลที่ใช้ก็จะต่ำด้วย ดังนั้นจึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของ matrix material ในเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้มีปริมาณพอเหมาะเมื่อถึงปลาย probe
- ถ้าใช้คอลัมน์ HPLC ทั่วไปและชะสารที่สนใจด้วยอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ผลที่ได้มักก็จะมีผลจากความไวลดลง

2.2.3.4 อินเตอร์เฟซแบบลำอนุภาค (Particle-Beam Interface) กลไกของอินเตอร์เฟซนี้ จะให้ส่วนที่แยกได้จาก LC ไหลผ่านรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร เข้าสู่ห้องกำจัดตัวทำละลาย (desolvation chamber) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้ของเหลวกลายเป็นหยด ผ่านกระแสน้ำไหลมาในแนวตั้งฉากเพื่อป้องกันหยดสารคืนกลับ (recoalescing) จากกระบวนการนี้จะช่วยทำให้เกลือสารที่สนใจอยู่ในสถานะที่เป็นอนุภาคแห้ง (dry particulate state) ที่เดินทางด้วยความเร็วสูง

จากนั้นลำอนุภาค ไอของตัวทำละลาย และซีเลียมจะไหลผ่านระบบแยกส่วนเชิงโมเมนตัม (momentum separation) คล้ายกับกลไกการแยกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์ของเทคนิค GC-MS ลำอนุภาคที่มีความดันต่ำๆ (10^{-6} ทอร์) เมื่อเข้าสู่แหล่งผลิตไอออนปะทะกับความร้อนแล้วระเหย (รูปที่ 2.13) วิธีนี้เหมาะสมกับอัตราการไหลได้สูงถึง 2 มิลลิลิตรต่อนาที อย่างไรก็ตาม อาจใช้อัตราการไหลในช่วง 0.1 -0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเหมาะสมกับการใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดที่เป็นสารอินทรีย์และสารละลายของลำอนุภาคนี้



รูปที่ 2.13 อินเตอร์เฟสแบบลำอนุภาค (Particle-Beam Interface) [36]

ข้อดีของอินเตอร์เฟสชนิดนี้

- สารประกอบที่เสถียรต่อความร้อนและระเหยยากไม่สามารถให้สเปกตรัม EI เมื่อใช้วิธีนำสารเข้าโดยทั่วไป ดังนั้นสามารถใช้อินเตอร์เฟสแบบลำอนุภาคแทนอินเตอร์เฟสแบบเดิมได้

ข้อเสียของอินเตอร์เฟสชนิดนี้

- ความไวของอินเตอร์เฟสแบบลำอนุภาคไม่ได้ขึ้นกับความจำเพาะของสารที่สนใจ เพียงอย่างเดียวแต่ยังขึ้นกับสถานะที่ใช้ในการทดลอง ขีดจำกัดการตรวจพบจะคงที่สูงกว่าที่ต้องการ

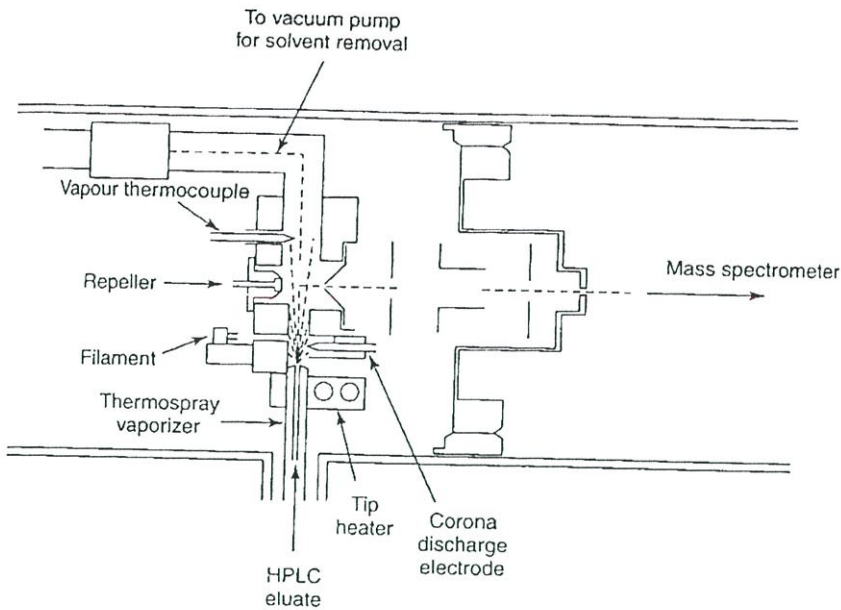
- ประสิทธิภาพของอินเตอร์เฟสแบบลำอนุภาคจะลดลงเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำสูง

2.2.3.5 อินเทอร์เฟซแบบการพ่นไอร้อน (Thermospray Interface) กระทบการของ
อินเทอร์เฟซแบบนี้ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ

- ขั้นตอนที่ 1 สารที่ชะจาก HPLC เกิดเป็นหยด (droplets)
- ขั้นตอนที่ 2 การเกิดประจุของหยดที่เกิดขึ้น
- ขั้นตอนที่ 3 การระเหยตัวทำละลายออกจากหยด
- ขั้นตอนที่ 4 เกิดไอออนจากสารที่สนใจ (analyte)

ระบบการพ่นไอร้อน แสดงผังรูปที่ 2.14 ประกอบด้วย คอลัมน์จิว (capillary) ที่ถูกให้ความร้อนตลอดเวลาเมื่อส่วนที่แยกได้จาก LC ไหลผ่าน การควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์จิวจะให้ของเหลวกลายเป็นไอประมาณ 95 % ไอที่เกิดขึ้นทำหน้าที่เป็น “nebulizing gas” และช่วยให้กระแสของเหลวเป็นหยด หยดที่เกิดขึ้นจะถูกระเหยบริเวณอินเทอร์เฟซที่มีการให้ความร้อนตามขวางและสารที่สนใจที่อยู่ในกระแสของเหลวจะเกิดเป็นไอออนโดยการทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างไอออนกับโมเลกุล (ion-molecule reaction) เช่น การเกิดไอออนแบบเคมี (chemical ionization) หรือกระบวนการระเหยให้ไอออน (ion-evaporation) ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของกระแสของเหลวและสารที่สนใจ ไอออนที่เกิดขึ้นจะถูกเหนี่ยวนำด้วยกระแสไฟฟ้าให้เข้าสู่กรวยเก็บตัวอย่างไอออน (sampling cone) ซึ่งอยู่ในแนวตั้งฉาก ส่วนที่เหลือนั้นจะถูกดูดจากแหล่งผลิตไอออนโดยการเสริมเครื่องปั๊มแบบธรรมดาไว้อีกด้วย การออกแบบอินเทอร์เฟซจะมีทั้งแบบที่ใช้ลวด (filament) และหรืออิเล็กโตรด (discharge electrode) และระบบขับเคลื่อน (repeller) ในแหล่งผลิตไอออน ซึ่งจะช่วยให้สถานะที่มีบัพเฟอร์ป้อนอยู่ในขณะที่กำลังเกิดการไอออไนซ์ ส่วนระดับในการเกิดเป็นโมเลกุลส่วนย่อยๆ นั้นเท่าที่สังเกตได้จากแมสสเปกตรัมแล้ว สามารถควบคุมได้โดยปรับค่าศักย์ไฟฟ้าของระบบขับเคลื่อน การให้ความร้อนคอลัมน์จิวมากเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของสารที่สนใจที่คอลัมน์ และถ้าอินเทอร์เฟซทำงานด้วยสถานะนี้ไปนานๆ จะทำให้คอลัมน์จิวเกิดการอุดตัน แต่ถ้าให้ความร้อนไม่เพียงพอ ก็ไม่ทำให้เกิดไอและของเหลวที่ไหลมากก็จะไม่เกิดเป็นสเปรย์

การเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระเหยได้ง่าย เช่น เกลือแอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate) ลงในเฟสเคลื่อนที่จะช่วยทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอออน โดยการเติมไอออนที่มีประจุบวก (H^+ หรือ NH_4^+) หรือประจุลบ (CH_3COO^-) ให้กับโมเลกุลที่เป็นกลางของสารที่สนใจ จากนั้นโมเลกุลของสารตัวอย่างที่เกิดเป็นไอออนแล้วก็จะสูญเสียตัวทำละลายออกไปขณะที่อยู่ในสภาพไอร้อน (heated spray) แล้วผ่านเข้าสู่เครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์เพื่อวิเคราะห์มวลต่อไป



รูปที่ 2.14 อินเทอร์เฟซแบบพ่นไอร้อน (Thermospray Interface) [36]

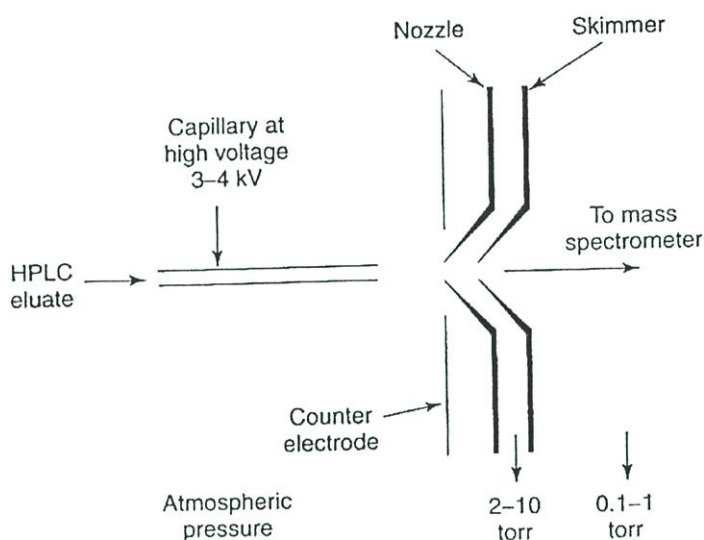
ข้อดีของอินเทอร์เฟซชนิดนี้

- สามารถปฏิบัติงานภายใต้สภาวะ HPLC ช่วงกว้าง เช่น อัตราการไหลสามารถใช้ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่สามารถใช้ส่วนประกอบของน้ำสูงชัน
- ตัวอย่างถูกไอออไนซ์โดยตรงจากสารละลาย ซึ่งสารละลายจะช่วยป้องกันความร้อนจึงทำให้ลดการสลายตัวของสารที่สนใจที่ไม่เสถียรต่อความร้อน
- เนื่องจากสเปกตราที่ได้จากอินเทอร์เฟซชนิดนี้มักประกอบด้วยไอออนที่ง่ายของสปีชีส์โมเลกุลที่เกิดจากการแตกตัวเป็นไอออนย่อยเล็กน้อย ทำให้สามารถหาปริมาณน้ำหนักโมเลกุลได้โดยไม่คลุมเครือ
- การมี discharge electrode และ filament ในแหล่งผลิตไอออนแบบพ่นไอร้อน ทำให้สามารถเพิ่มขอบเขตการศึกษาของสารประกอบได้กว้างขึ้น

ข้อเสียของอินเทอร์เฟซชนิดนี้

- อินเทอร์เฟซแบบนี้ไม่เหมาะกับสารที่สนใจที่มีมวลโมเลกุลสูง (มากกว่า 1,000 ดาลตัน)
- สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ใน HPLC นั้นควรจะระเหยได้ง่าย

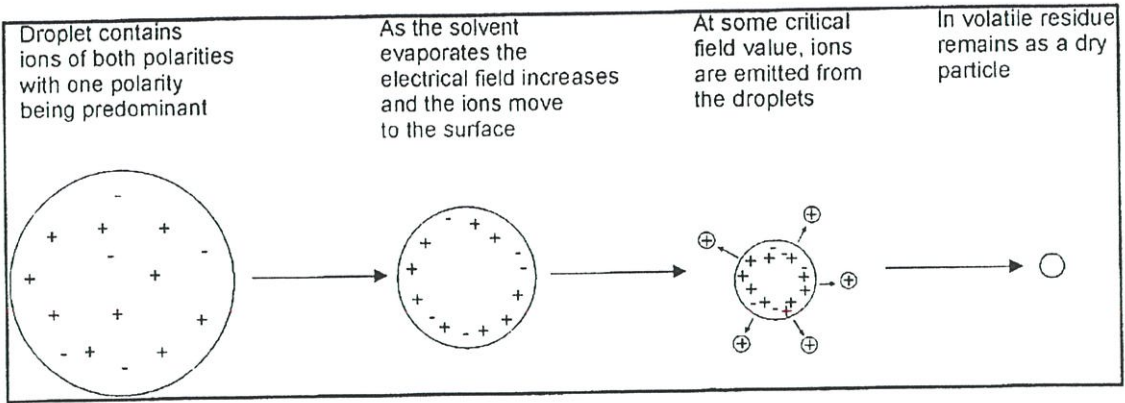
2.2.3.6 อินเตอร์เฟสแบบสเปรย์ไฟฟ้า (Electrospray Interface, ESI) จัดเป็นเทคนิคการนำส่วนที่แยกได้จาก HPLC เข้าเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์เพื่อผลิตไอออนที่ความดันบรรยากาศ (atmospheric pressure ionization, API) โดยส่วนที่แยกได้นี้ผ่านเข้าคอลัมน์จิวที่มีการให้ศักย์ไฟฟ้าแรงสูง ที่ความดันบรรยากาศ กระแสของเหลวที่ผ่านออกมาเป็นละอองขนาดเล็ก จากนั้นหยดสารจะถูกระเหยตัวทำละลายออกตรงบริเวณระหว่างความดันบรรยากาศจนถึง counter electrode จะระเหยตัวทำละลายโดยใช้กระแสของแก๊สแห้ง (drying gas) ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้แก๊สไนโตรเจน ซึ่งจะระเหยไปเรื่อยๆ ในบริเวณสเปรย์ (spraying region) จนได้ไอออนของสารที่สนใจเกิดขึ้น จากนั้นไอออนที่ได้ผ่านบริเวณปั๊ม 2 ชนิดที่แตกต่างกันเข้าสู่แมสสเปกโทรมิเตอร์ (รูปที่ 2.15) ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ออลัมน์จิวประมาณ 3-4 kV สำหรับผลิตไอออนบวก และเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในทางตรงข้ามจะผลิตไอออนลบ



รูปที่ 2.15 อินเตอร์เฟสแบบสเปรย์ไฟฟ้า (Electrospray Interface) [36]

การระเหยไอออน (ion evaporation)

หยดสารที่มีประจุที่ประกอบด้วยตัวทำละลายนั้น มีทั้งไอออนบวกและลบ แต่จะมีสภาพเป็นขั้วหนึ่งที่เด่น การเหนี่ยวนำให้เป็นกลางนั้นทำให้ประจุที่เกินมาจะอยู่บริเวณผิวหน้าของหยด (รูปที่ 2.16) เมื่อระเหยตัวทำละลายออก สนามไฟฟ้าที่บริเวณผิวหน้าของหยดจะเพิ่มขึ้นเมื่อรัศมีของหยดลดลง ถ้าหยดสารมีไอออนเกินและระเหยตัวทำละลายจากหยดเพียงพอที่จะทำให้อสนามไฟฟ้าถึงจุดวิกฤต (critical field) ไอออนจะถูกปล่อยจากผิวหน้า ด้วยแรงที่เรียกว่า “coulombic explosion” และในที่สุดตัวทำละลายจะระเหยออกจนหมด ได้อนุภาคแห้งที่ประกอบด้วย สารประกอบที่ไม่ระเหยของสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ 2.16 แผนภาพแสดงการระเหยไอออน [37]

สารประกอบไอออนในตัวทำละลายจะถูกทำให้เป็นไอออนสถานะแก๊สในแหล่งผลิตไอออน (ion source) ประสิทธิภาพและอัตราการเกิดไอออนขึ้นอยู่กับพลังงานโซลเวชัน (solvation energies) ของไอออนเฉพาะ (specific ions) ไอออนที่มีพลังงานโซลเวชันต่ำจะระเหยง่ายกว่าไอออนที่มีพลังงานโซลเวชันสูง

ข้อดีของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

- การไอออนในเซชันนั้นจะเกิดจากสารละลายโดยตรงและเหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาสารประกอบไอออนิกและไม่เสถียรต่อความร้อน

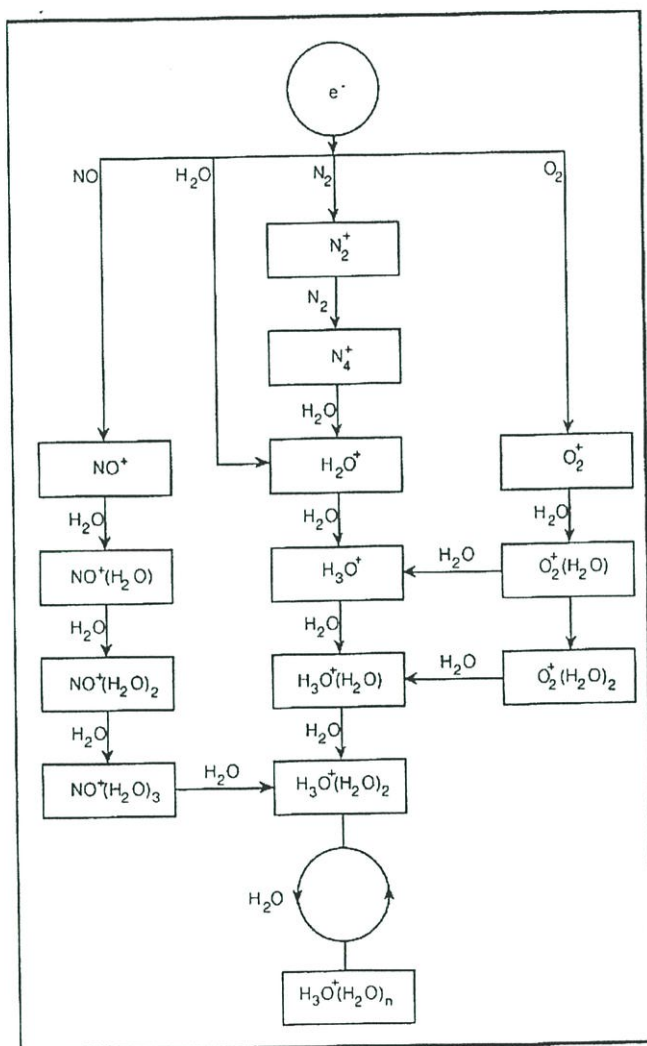
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนสามารถใช้ได้ตั้งแต่ระดับนาโนลิตรต่อนาทีถึงเกิน 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งสามารถเลือกให้เหมาะสมกับการใช้งาน ดังนั้นจึงสามารถใช้ได้ทั้งคอลัมน์ทั่วไปและไม่โครบอร์คอลัมน์

- อินเตอร์เฟซแบบ ESI เมื่อเปรียบเทียบกับอินเตอร์เฟซชนิดอื่นๆ มีจุดเด่นคือจะผลิตไอออนแบบหลายประจุ มีประสิทธิภาพในการขยายช่วงมวลของแมสสเปกโตรมิเตอร์ จึงเหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่นอกเหนือจากช่วงปกติที่วิเคราะห์ได้ดี

ข้อเสียของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

- ESI ไม่เหมาะที่จะใช้งานกับสารประกอบที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำ
- พบการบดบังสัญญาณเกิดขึ้นเนื่องจากตัวชะร่วม เมื่อวิเคราะห์ของผสมโดยตรง
- ESI เป็นการเกิดไอออนในเซชันที่ไม่รุนแรงทำให้ได้สปีชีส์ของโมเลกุลไม่เปลี่ยนแปลงและข้อมูลโครงสร้างจึงมักจะหาได้ไม่ง่าย แหล่งกำเนิดไอออนแบบ ESI นั้นจะผลิตข้อมูลโครงสร้างจากการแตกตัวเป็นไอออนส่วนย่อยที่ cone-voltage แต่สเปกตราได้นั้นจะแปลผลยาก วิธีแก้ปัญหาคือการใช้แทนเต็มแมสสเปกโตรมิเตอร์

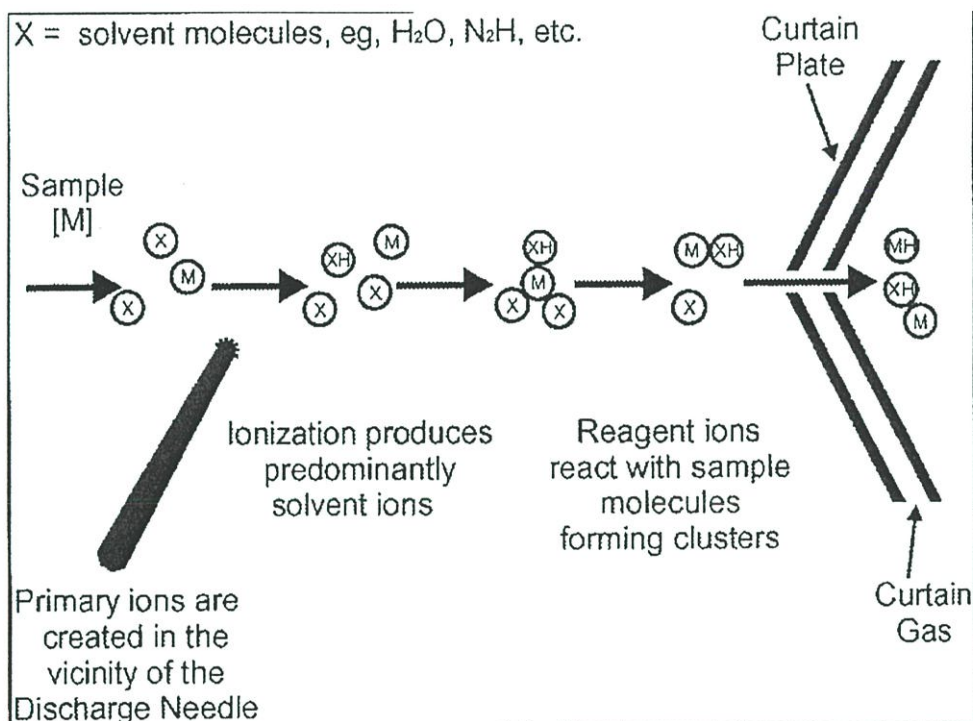
2.2.3.7 อินเตอร์เฟซแบบผลิตไอออนทางเคมีที่ความดันบรรยากาศ (Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface, APCI) ของเหลวที่แยกได้จาก LC ถูกพ่นทำให้เกิดเป็นหยดขนาดเล็กในหลอดเซรามิกที่ร้อน ซึ่งจะทำให้ตัวอย่างระเหยอย่างรวดเร็ว ดังนั้น โมเลกุลของตัวอย่างจึงไม่ถูกทำลาย ปฏิกิริยาทางเคมีที่ความดันบรรยากาศ ของ APCI ดังรูปที่ 2.17 เป็นกระบวนการของไอออนบวกที่เกิดปฏิกิริยาทางเคมี คือ โปรตอนไฮเดรต ($H_3O^+[H_2O]_n$) ซึ่งลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นได้จากผลทดลองของ Huertas และ Fontan ไอออนปฐมภูมิหลักคือ N_2^+ , O_2^+ , H_2O^+ และ NO^+ ที่เกิดขึ้นจากการถูกชนด้วยอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนนี้ได้มาจาก corona จะผลิตอิเล็กตรอนจากองค์ประกอบของอากาศที่เป็นกลางเป็นหลัก แม้ว่า NO จะไม่ใช่องค์ประกอบหลักของอากาศในสภาพแวดล้อมที่บริสุทธิ์ แต่ในแหล่งผลิตไอออนความเข้มข้นของสปีชีส์นี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทำเริ่มต้นปฏิกิริยาของ corona discharge



รูปที่ 2.17 แผนภาพแสดงปฏิกิริยา APCI [37]

สารละลายตัวอย่างถูกสเปรย์ผ่าน APCI โดยเริ่มจากการพ่นแก๊สไปในหลอดเซรามิกร้อน หยดขนาดเล็กของตัวอย่างและตัวทำละลายจะกระจายในหลอดนี้และระเหยอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงสุด การระเหยที่ไม่รุนแรงนี้ช่วยป้องกันโมเลกุลตัวอย่าง การเกิดไอออนในเซชันของ APCI จะเกิดโดย corona discharge needle ที่อยู่ตรงบริเวณปลายของหลอดเซรามิก โมเลกุลตัวอย่างจะถูกไอออนไนซ์โดยการชนกับรีเอเจนต์ไอออนที่เกิดจากการไอออนในเซชันของโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่ โมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกระเหยจะเกิดไอออนไนซ์ได้เป็นรีเอเจนต์ไอออน $[X+H]^+$ ในโหมดประจุบวก (positive mode) และ $[X+H]^-$ ในโหมดประจุลบ (negative mode) รีเอเจนต์ไอออนนี้จะทำให้โมเลกุลของตัวอย่างเสถียรเมื่อเกิดการชนกับรีเอเจนต์ไอออน (รูปที่ 2.18)

โมเลกุลของตัวอย่างจะถูกไอออนไนซ์ผ่านกระบวนการถ่ายโอนโปรตอนในโหมดประจุบวก และถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรือโปรตอนในโหมดประจุลบ พลังงานของกระบวนการเกิดไอออนในเซชันของ APCI จะมาจากการชนในสภาวะความดันบรรยากาศ



รูปที่ 2.18 แผนภาพแสดงการผลิตไอออนทางเคมีที่ความดันบรรยากาศ (APCI) [37]

ข้อดีของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

- APCI ใช้ความร้อนในการผลิตไอออนจากสารละลายน้อยกว่าการผลิตไอออนแบบ ESI ดังนั้นจึงเหมาะใช้ศึกษาสารประกอบที่ไม่เสถียรต่อความร้อน โดยไม่มีการสลายตัว
- APCI สามารถใช้ได้ดีสุดกับสารประกอบที่มีขั้วต่ำถึงสูงปานกลาง

- APCI เป็นเทคนิคที่ผลิตไอออนแบบไม่รุนแรง จึงใช้ศึกษาหาปริมาณน้ำหนักโมเลกุลของสารที่สนใจได้

- APCI สามารถใช้ได้กับอัตราการไหลสูงถึง 2 มิลลิลิตรต่อนาที ดังนั้นจึงสามารถต่อกับคอลัมน์ HPLC ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4.5 มิลลิเมตรได้

- APCI สามารถทนต่อเฟสเคลื่อนที่เป็นบัฟเฟอร์ได้มากกว่าแบบ ESI

- APCI สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะต่างๆในการทดลองได้มากกว่าแบบ ESI สามารถใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ชะแบบแกรเดียนท์ได้

ข้อเสียของอินเตอร์เฟซชนิดนี้

- สเปกตรัมที่ได้จาก APCI ที่มีไอออนที่เกิดจาก adduct ของสารที่สนใจกับเฟสเคลื่อนที่หรือโมดิฟายอร์อินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมอะซิเตต จะมีไอออน เช่น $(M+NH_4)^+$ และ $(M+CH_3COO)^+$ ซึ่งเป็นอุปสรรคในการแปลผลของสเปกตรัม

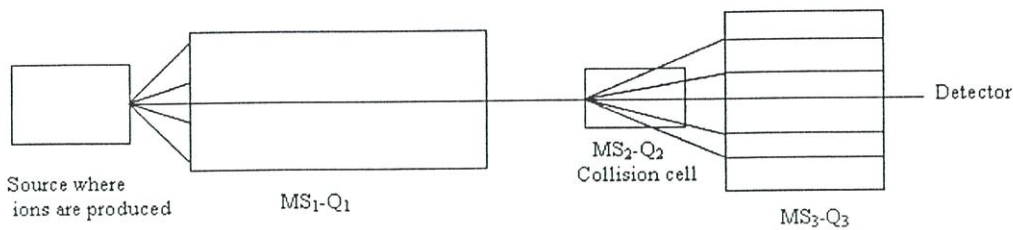
- ข้อมูลโครงสร้างนั้นหาได้ยากเนื่องจากการแตกตัวเป็นไอออนส่วนน้อยได้น้อย อาจแก้ปัญหาโดยใช้แทนเต็มแมสสเปกโตรมิเตอร์

- ที่อัตราการไหลต่ำๆนั้นประสิทธิภาพของ APCI จะไม่สามารถหาความสัมพันธ์ได้

- สารที่สนใจที่สามารถเกิดประจุในสารละลายได้จะไม่เหมาะกับการใช้ APCI

2.2.4 แมสสเปกโตรมิเตอร์แบบสามควอดรูโพล (Triple Quadrupole Mass Spectrometer)

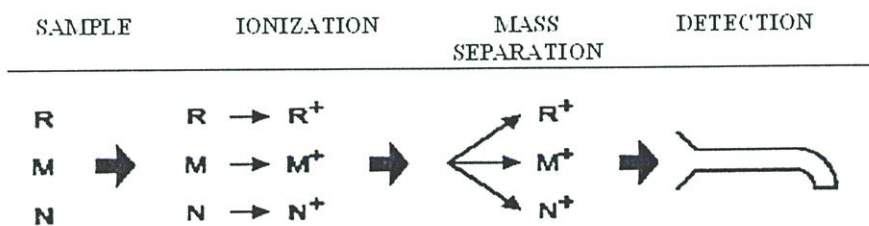
ปัญหาหลักของแมสสเปกโตรมิเตอร์ คือ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์สารผสม เทคนิคแทนเต็มแมสสเปกโตรมิเตอร์ (tandem mass spectrometry, MS-MS) จะช่วยแก้ปัญหานี้ ซึ่งมีหลายชนิด เช่น triple quadrupole, hybrid mass spectrometer, tandem mass spectrometry on the time-of-flight analyzer, quadrupole-time-of-flight instrument, tandem mass spectrometry on the ion-trap ชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ triple quadrupole mass spectrometer ซึ่งประกอบด้วย ควอดรูโพล 3 อัน คือ Q1 ทำหน้าที่เป็นเครื่องคัดแยกมวล ตัวอย่างถูกทำให้เกิดเป็นไอออน สามารถคัดแยกมวลที่ต้องการได้ จากนั้นไอออนเหล่านี้จะส่งไปยัง Q2 ทำหน้าที่ทำให้ไอออนที่ได้จาก Q1 แตกตัวเนื่องจากถูกเหนี่ยวนำจากการชนกันกับแก๊สอาร์กอน (collision-induced dissociation, CID) ได้เป็นไอออนส่วนย่อยต่างๆซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารตัวอย่างและถูกคัดแยกมวลที่ Q3 แล้วตรวจสอบสัญญาณต่อไป (รูปที่ 2.19)



รูปที่ 2.19 แผนภาพแสดง triple quadrupole mass spectrometer [36]

แมสสเปกโตรมิเตอร์แบบควอดรูโพลเดี่ยว (single quadrupole) จะแยกไอออนที่เป็นตัวแทนของโมเลกุลสารประกอบตัวอย่างโดยอาศัยมวลต่อประจุที่เฉพาะ ไอออนที่มีมวลต่อประจุเฉพาะนี้จะถูกแยกโดยการคัดแยกมวลด้วย single quadrupole และนับปริมาณมวลต่อประจุที่คัดแยกได้ทำให้ได้แมสสเปกตรัมของตัวอย่าง ซึ่งควอดรูโพลที่ใช้สำหรับแยกมวลประกอบด้วยแท่งโลหะ 4 ท่อน มีการติดตั้งความถี่คลื่นวิทยุ (RF) และศักย์ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) แก่แท่งโลหะแต่ละคู่ซึ่งทำให้เกิดสนามไฟฟ้า อยู่ภายในช่วงตามขอบเขตของแท่งโลหะเหล่านี้ โดยขึ้นอยู่กับสัดส่วน RF/DC สนามไฟฟ้าระหว่างแท่งโลหะจะคอยควบคุมให้ไอออนที่มีช่วงมวลต่อประจุแคบๆ ผ่านไปได้ เมื่อเปลี่ยนสัดส่วนของ RF/DC เพื่อควบคุมเครื่องแยกมวลชนิดนี้ สามารถสแกนหาช่วงมวลของไอออนต่างๆ ตามค่ามวลต่อประจุสูงหรือต่ำกว่านี้ให้ผ่านไปได้ ส่วนไอออนอื่นๆ ที่ก็จะชนกับแท่งควอดรูโพลและถูกกำจัดออกไปจากกระแสไอออน ในทางปฏิบัติแล้วสามารถสแกนได้เพียงช่วงสั้นๆ อย่างรวดเร็ว เช่น สแกนหาผลจากค่ามวลต่อประจุ 2-260 ภายในเวลาน้อยกว่า 100 ms และสามารถปรับศักย์ RF/DC เพื่อเลือกไอออนที่มีค่ามวลต่อประจุตามที่ต้องการให้ผ่านไปได้

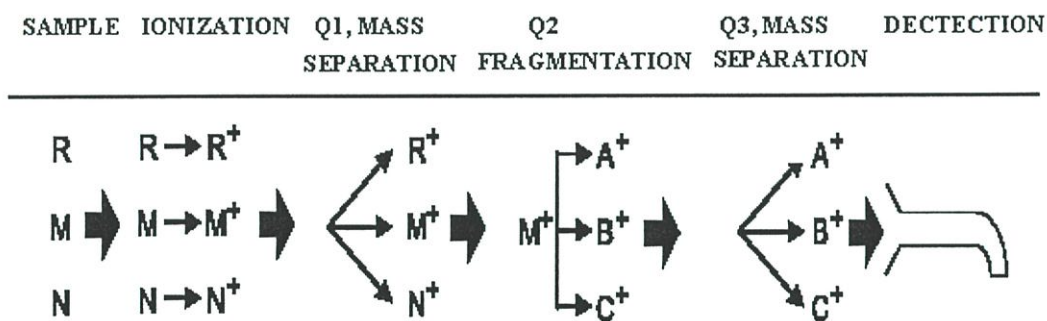
สมมุติตัวอย่างผสมที่มี 3 โมเลกุล ได้แก่ R, M และ N ถูกนำไปยัง แหล่งผลิตไอออน (ion source) ซึ่งจะเป็นการทำให้เกิดไอออนแบบไม่รุนแรง (soft ionization) ทำให้เกิดไอออน R^+ , M^+ และ N^+ (รูปที่ 2.20) ไอออนเหล่านี้จะอยู่ในรูปไอออนกึ่งโมเลกุล (quasi-molecular ions) เมื่อจับกับหนึ่งโปรตอนหรือมากกว่าจะอยู่ในโหมดประจุบวก (positive mode) หรือการดึงหนึ่งโปรตอนหรือมากกว่าหรือการจับอิเล็กตรอนจะอยู่ในโหมดประจุลบ (negative mode)



รูปที่ 2.20 การแยกสารตัวอย่างผสม R, M และ N [37]

ข้อมูลของโครงสร้างของสารตัวอย่างบางครั้งอาจได้จากการแตกตัวเป็นไอออนส่วนย่อย (fragment) ของไอออนตั้งต้นหรือไอออนแม่ (precursor ion) ในบริเวณแรกที่เกิดในการชนกับแก๊ส ซึ่งที่อยู่ระหว่าง orifice และ skimmer กระบวนการนี้มักเรียกว่า collision-induced mass spectrometry (CID/MS) ไอออนที่เกิดขึ้นในแหล่งผลิตไอออนจะถูกดึงผ่าน curtain ของแก๊สเฉื่อย แห่งใน ion optics housed ในห้องที่เป็นระบบสุญญากาศ ควอดครูปโพลจะคัดแยกมวลในระบบสุญญากาศมีความจำเพาะสูงในการคัดเลือกไอออนโดยอาศัยมวลต่อประจุ ไอออนที่คัดแยกได้นำสู่ดีเทคเตอร์ และชนกับดีเทคเตอร์จะทำให้เกิดพัลซ (pulse) ของอิเล็กตรอน พัลซอิเล็กตรอนจะถูกเก็บและเปลี่ยนสัญญาณให้เป็นแบบดิจิทัล สัญญาณที่ได้นั้นมาจากไอออนที่นับได้จะสอดคล้องกับมวลไอออน ข้อมูลที่ได้มาจะถูกถ่ายทอไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์สามารถแสดงเป็นแมสสเปกตรัมทั้งหมด ความเข้ม (intensity) ของไอออนเดี่ยวหรือหลายไอออนเทียบกับเวลาหรือกระแสไอออนรวม (TIC) เทียบกับเวลา

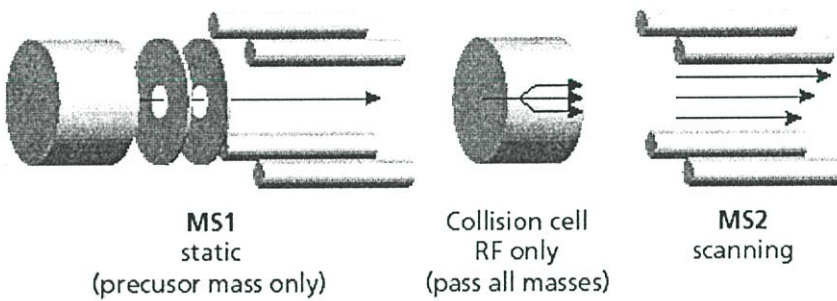
แมสสเปกโตรมิเตอร์แบบสามควอดครูปโพล (triple quadrupole) โดยที่ควอดครูปโพลที่ทำหน้าที่คัดแยกมวล (Q1 และ Q3) จะถูกแยกออกจากกันโดยควอดครูปโพลที่เกิดการชนของแก๊ส (Q2) ซึ่งควอดครูปโพลนี้จะมี RF เพียงอย่างเดียว หลักการพื้นฐานของ MS/MS ดังรูปที่ 2.21 ตัวอย่างของผสมที่ประกอบด้วย 3 โมเลกุล คือ R, M และ N ถูกนำเข้าไปในแหล่งผลิตไอออน ซึ่งจะเป็นการทำให้เกิดไอออนแบบไม่รุนแรงทำให้เกิดไอออน R^+ , M^+ และ N^+ คัดแยกไอออนที่ต้องการที่ Q1 เช่น เลือกให้ M^+ ผ่านมายัง Q2 และเกิดการแตกตัวเป็นไอออนย่อย ได้ไอออน A^+ , B^+ และ C^+ จากนั้นผ่านไปยัง Q3 เพื่อคัดแยกมวลของไอออนต่อไป



รูปที่ 2.21 การแยกของไอออนผลิตภัณฑ์ (product ion) จากของผสม R, M และ N [37]

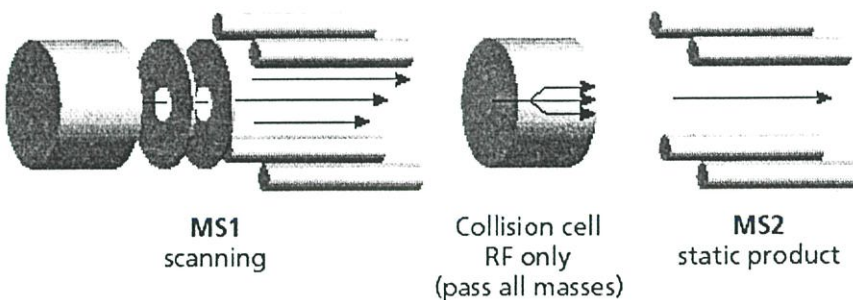
วิธีการสแกนชนิดต่างๆ

1) การสแกนไอออนผลิตภัณฑ์ (Product ion scan) เป็นวิธีการสแกนที่ใช้แพร่หลายชนิดหนึ่งใน MS/MS บางครั้งเรียกวิธีนี้ว่า “daughter ion scanning” โดยใช้เครื่องคัดแยกมวลแรก (MS1 หรือ Q1) อนุญาตให้ไอออนหนึ่ง ผ่านเข้าไปในบริเวณเซลล์การชน (collision cell) ไอออนที่ผ่านไปยัง Q2 นั้นจะแตกตัวเป็นไอออนส่วนย่อยโดยชนกับ โมเลกุลของแก๊สที่เป็นกลาง เรียกขบวนการนี้ว่า “collision- activated dissociation (CAD)” ไอออนที่แตกตัวเป็นไอออนส่วนย่อยทั้งหมดผ่านไปยัง Q3 (MS2) และคัดกรองทั้งหมดได้เป็นสเปกตรัม ซึ่งไอออนที่เกิดตรงแหล่งกำเนิดไอออนเรียกว่า “ไอออนตั้งต้นหรือไอออนแม่” ส่วนไอออนที่เกิดจากการแตกตัวเมื่อชนกับ โมเลกุลแก๊ส เรียกว่า “ไอออนผลิตภัณฑ์หรือแฟรกเมนต์ไอออน” (รูปที่ 2.22)



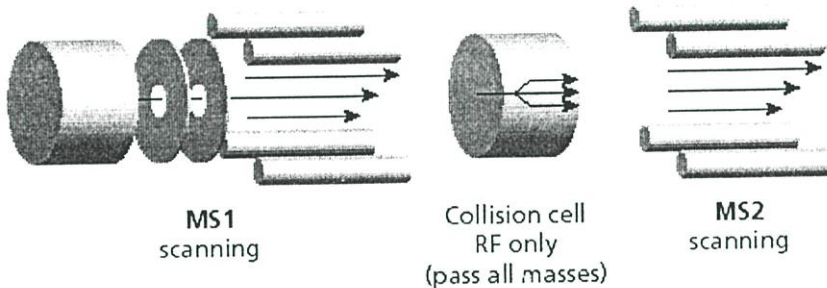
รูปที่ 2.22 แสดงการสแกนไอออนผลิตภัณฑ์ (Product ion scan)

2) การสแกนไอออนตั้งต้นหรือไอออนแม่ (Precursor ion scan) วิธีการสแกนชนิดนี้ บางครั้งเรียกว่า Parent ion scans เครื่องคัดแยกมวลที่สอง (MS2 หรือ Q3) จะคัดเลือกเฉพาะไอออนส่วนย่อยที่สนใจ และเครื่องคัดแยกมวลแรก (MS1 หรือ Q1) จะสแกนมวลของไอออนทั้งหมดในช่วงกำหนด แมสสเปกตรัมที่ได้จะแสดงมวลทั้งหมดของสารประกอบที่ทำให้เกิดเฉพาะไอออนส่วนย่อย (รูปที่ 2.23)



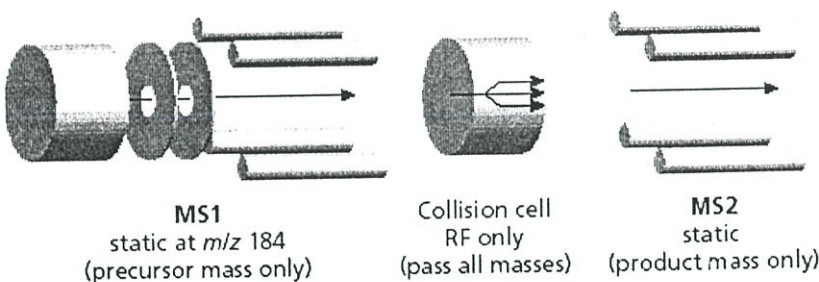
รูปที่ 2.23 แสดงการสแกนไอออนตั้งต้นหรือไอออนแม่ (Precursor ion scan)

3) การสแกนชนิดการสูญเสียโมเลกุลที่เป็นกลางคงที่ (Constant neutral loss) เมื่อเครื่องคัดแยกมวลทั้งสอง (MS1 หรือ Q1 และ MS2 หรือ Q3) ทำการสแกนด้วยค่าความแตกต่างทางมวลที่คงที่ โดยที่ค่ามวลสำหรับ Q1 สูงกว่า Q3 จะทำให้สามารถวัดค่าการสูญเสียมวลที่กำหนดซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์การชน เช่น ถ้ามวลของโมเลกุลที่สูญเสียคือ 42 ดาลตัน ทำการสแกน Q1 เริ่มที่ m/z 100 และมวลที่ผ่าน Q3 คือ 58 เมื่อ Q1 ผ่าน m/z 101 มวลที่ผ่าน Q3 ก็จะเป็น m/z 59 และที่ Q1 ผ่าน m/z 102 มวลที่ผ่าน Q3 ก็จะเป็น m/z 60 สัญญาณที่ได้จากดีเทคเตอร์ได้จากไอออนที่ผ่าน Q1 และ Q3 คือ ไอออนที่ผ่าน Q1 จะแตกตัวเป็นไอออนส่วนย่อยที่สูญเสียมวลที่สนใจ ถ้าการแตกเป็นไอออนส่วนย่อยไม่มีการสูญเสียมวลที่สนใจ ผลที่ได้คือจะไม่มีไอออนผลิตภัณฑ์ผ่าน Q3 ประโยชน์ของการสแกนชนิดนี้คือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันคล้ายกัน (รูปที่ 2.24)



รูปที่ 2.24 แสดงการสแกนชนิดการสูญเสียโมเลกุลที่เป็นกลางคงที่ (Constant neutral loss)

4) การติดตามปฏิกิริยาเดี่ยวและหลายปฏิกิริยา (Single / multiple reaction monitoring) เครื่องคัดแยกมวลทั้ง MS1 (Q1) และ MS2 (Q3) โดยที่ Q1 จะกำหนดให้คัดแยกมวลของไอออนตั้งต้นเฉพาะที่สนใจ ไปยัง Q2 เพื่อแตกย่อยไอออน ผ่านไปยัง Q3 โดยจะกำหนดให้คัดแยกมวลของไอออนส่วนย่อยของไอออนผลิตภัณฑ์เฉพาะที่สนใจ การสแกนชนิดนี้มีความเฉพาะเจาะจง (Selectivity) ในการเลือกมวลสารที่สามารถช่วยให้คำชี้แจงจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณดีขึ้นเหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ (รูปที่ 2.25)



รูปที่ 2.25 แสดงการติดตามปฏิกิริยาเดี่ยวและหลายปฏิกิริยา (Single/multiple reaction monitoring)

2.3 เทคนิคการเจือจางไอโซโทป (Isotope dilution techniques) [39, 40]

เทคนิคการเจือจางไอโซโทปเริ่มใช้มากในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการปรับปรุงค่าความแม่นยำและความเที่ยง โดยการลดปัญหาจาก calibration และผลกระทบจากเมทริกซ์ในการเตรียมตัวอย่าง นักวิเคราะห์บางคนอาจไม่มีประสบการณ์ระหว่างการสกัดตัวอย่างหรือแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ความเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถแก้ปัญหาโดยใช้ อินเทอร์เนอลสแตนดาร์ด (internal standard) และ เซอร์โรเกต (surrogate) คือสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารที่สนใจ ซึ่งสารมาตรฐานที่เจือจางไอโซโทป จัดว่าเป็นอินเทอร์เนอลสแตนดาร์ดและเซอร์โรเกตที่สมบูรณ์ สารมาตรฐานที่เจือจางไอโซโทป คือไอโซโทปของธาตุหรือโมเลกุลของสารประกอบที่เจือจางไอโซโทป เช่น เบนซีน- d_6 โดยปกติในวงแหวนของเบนซีนจะจับกับไฮโดรเจน ไฮโดรเจนทั้งหมดถูกแทนด้วยดิวทีเรียม (d) ซึ่งเป็นไอโซโทปของไฮโดรเจน (^2H) ดังนั้นจะได้เบนซีน- d_6 ซึ่งสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนกัน จะแตกต่างเพียงมวลโมเลกุลจึงถือว่าเป็นอินเทอร์เนอลสแตนดาร์ดหรือเซอร์โรเกตที่สมบูรณ์

เทคนิคการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการเติมสารประกอบที่เจือไอโซโทป จากการค้นพบไอโซโทปที่เสถียรของไฮโดรเจน คาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจน นั้นมีความสำคัญมากกับงานด้านเคมีวิเคราะห์ ไอโซโทปเสถียรมีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่มีส่วนผสมซับซ้อนซึ่งยากที่จะแยกสารที่เราต้องการวิเคราะห์ให้บริสุทธิ์และผลกระทบจากผลผลิตปริมาณต่ำและไม่แน่นอน การเติมสารประกอบเจือไอโซโทปที่ทราบความเข้มข้นที่เติมในตัวอย่างนั้นถือว่าเป็น “กระบวนการเจือจางไอโซโทป” ถ้าในตัวอย่างนั้นมีสารประกอบที่เราสนใจอยู่ด้วย หลังจากที่มีผสมสารประกอบที่เจือไอโซโทปในตัวอย่างแล้ว ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบผสมที่มีเจือจางไอโซโทป ทราบความเข้มข้นของสารประกอบเจือไอโซโทปที่เติมลงไปจึงสามารถหาปริมาณสารเดิมที่มีในตัวอย่างได้

เริ่มแรกการนำการเจือจางไอโซโทปมาประยุกต์ใช้โดยนักชีวเคมีที่สนใจเกี่ยวกับสารประกอบอินทรีย์ที่มีสารผสมซับซ้อน ในการศึกษาให้นำสารประกอบที่เจือไอโซโทปและทนต่อปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอโซโทป เช่น ไอโซโทปของไนโตรเจน (N-15) เจือปนสารไกลซีน (labeled glycine) สามารถใช้หาปริมาณไกลซีนในสารผสมกรดอะมิโนจากโปรตีน

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

D.C. Macwillims และคณะ [41] การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตกค้างใน โพลีเมอร์และโคโพลีเมอร์ของอะคริลาไมด์ ด้วยโพลารोगราฟิคและ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ สกัดอะคริลาไมด์ด้วยตัวทำละลายผสมที่ออกแบบมาเพื่อทำให้โพลีเมอร์บวมตัวได้ดี สารละลายที่ สกัดได้กำจัดสิ่งรบกวนด้วย mixed ion exchange resin ซึ่งช่วงใช้งานของโพลารोगราฟ และ ยูวี สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เท่ากับร้อยละ 0.01-0.5 และ ร้อยละ 0.005 - 0.1 ของอะคริลาไมด์ ตามลำดับ ค่าศักย์ไฟฟ้าครึ่งคลื่นสำหรับอะคริลาไมด์ คือ -1.97 โวลต์ เทียบกับขั้วอ้างอิงคาโลเมลชนิดอิ่มตัว (saturated calomel electrode, SCE) ในตัวทำละลาย 0.091 โมลาร์ของ tetra-n-butylammonium hydroxide ใน 70:30 (ปริมาตร:ปริมาตร) ของเมทานอลต่อน้ำ หาปริมาณอะคริลาไมด์จากความสูง ของคลื่น (wave height) หรือความแตกต่างหลังจากเกิดปฏิกิริยากับ dodecyl mercaptan ส่วน สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ วัดการดูดกลืนรังสีอุลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ช่วง ความเข้มข้นที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) อยู่ระหว่าง 5 -100 มิลลิกรัมต่อลิตร

S.R. Betso และ J. D. McLean [42] การตรวจวิเคราะห์โมโนเมอร์อะคริลาไมด์ใน โพลีอะคริลาไมด์ด้วยโพลารोगราฟิแบบพัลส์เชิงผลต่าง (differential pulse polarography, DPP) ทำการตรวจวัดกระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของอะคริลาไมด์ และพีคที่ได้จากกระแสนี้ใช้หาปริมาณ ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ เทคนิค DPP พิกิริยารีดักชันของอะคริลาไมด์ ที่ -2.0 โวลต์ เทียบกับขั้ว อ้างอิง SCE ซึ่งเหมาะสมในการหาปริมาณอะคริลาไมด์ ขั้นตอนการสกัดโมโนอะคริลาไมด์จาก โพลีอะคริลาไมด์ สารละลายที่ได้ทำการกำจัดสิ่งรบกวนจำพวกแคทไอออนและแอนไอออนสปีชีส์ ด้วยเรซินผสม (mixed resin) อิเล็กโตรไลต์ช่วย (supporting electrolyte) ในการเกิดรีดักชันของ โพลารोगราฟิ คือ เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 80 : 20 (ปริมาตร:ปริมาตร) ที่มี tetra-n-butylammonium hydroxide ชิดจำกัดการตรวจพบโมโนเมอร์อะคริลาไมด์ ด้วยเทคนิค DPP มีค่าน้อย กว่า 1 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

Johan Rosen และ Karl-Erik Hellenas [18] วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารที่ ผ่านการปรุงสุก วิธีนี้เดิมสารเจือไอโซโทป $^{2}d_3$ -อะคริลาไมด์ เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด สกัด ตัวอย่างด้วยน้ำ ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแบบเฟสของแข็ง (SPE) คือ Isolute Multimode 300 mg ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS อินเตอร์เฟสแบบ ESI โหมดประจุบวก ในขั้นตอนแยก โครมาโทกราฟใช้คอลัมน์ Hypercarb อนุภาคขนาด 5 ไมครอน ขนาด 50 x 2.1 มิลลิเมตร โดยใช้ น้ำ เป็นเฟสเคลื่อนที่ สำหรับ MS/MS (triple quadrupole) ใช้พิวจน์เอกลักษณะและหาปริมาณ โดยใช้ โหมดการตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (MRM) ติดตามการทรานซิชันของมวลต่อประจุ (m/z) 72/55, 72/54, 72/44, 72/27, 72/72 และ 75/58 ข้อมูลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (in-house validation) ในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากมันฝรั่งและธัญพืชที่ระดับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ตั้งแต่ 30 -10,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความถูกต้อง ร้อยละ 91-102 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัมพัทธ์ (%RSD) ร้อยละ 3- 21 และมีการทำ interlaboratory validation เปรียบเทียบกับวิธี GC-MS กับ LC-MS/MS ปริมาณอะคริลาไมด์ที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นตั้งแต่ 25 -2,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมพบว่าผลไม่แตกต่างกัน มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.998

Magnus Jezussek และ Peter Schieberle [14] วิเคราะห์ใหม่สำหรับหาปริมาณอะคริลาไมด์โดยอาศัยเทคนิคการเจือจางไอโซโทปเสถียรและการเตรียมสารอนุพันธ์ด้วย กรด 2-เมอร์แคปโตเบนโซอิก (2- mercaptobenzoic acid) ตรวจสอบด้วย LC-MS เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS 2 วิธี จากการพบว่าสารอะคริลาไมด์เมื่อทำปฏิกิริยากับ กรด 2-เมอร์แคปโตเบนโซอิก ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเป็นไทโออีเทอร์ที่เสถียร (stable thioether) ประมาณร้อยละ 45-50 และการใช้ $^{13}\text{C}_3$ -อะคริลาไมด์ เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ซึ่งได้พัฒนาขึ้นมาใช้เพื่อตรวจวัดด้วย LC-MS จากนั้นนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างมันฝรั่งแผ่น ขนมันฝรั่งหรือ ลูกก็ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์โดยตรง (ไม่ทำเป็นสารอนุพันธ์) ด้วยเครื่อง GC-MS ซึ่งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้นแตกต่างกันแต่ขีดจำกัดการตรวจพบอยู่ในระดับเดียวกัน คือ 6.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม การวิเคราะห์หาปริมาณสาร อะคริลาไมด์ในมันฝรั่งแผ่นหรือลูกก็ ด้วย 3 วิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างเดียวกันนั้นพบว่าสอดคล้องกัน และนอกจากนั้นยังมีการทดลองหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในขนมันฝรั่งโดยมีการเติมเอนไซม์อะไมเลส (amylase) หรือ โปรเตส (protease) ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพบว่าเอนไซม์ไม่ได้มีผลทำให้สารอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น

Sonja Riediker และ Richard H. Stadler [19] วิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหารโดยใช้ ESI-LC MS/MS อาศัยเทคนิคการเจือจางไอโซโทปเป็นวิธีที่ยืนยันและการหาปริมาณอะคริลาไมด์ที่ปนเปื้อนระดับต่ำที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ วิเคราะห์สกัดสารอะคริลาไมด์ด้วยน้ำ ตกตะกอนสิ่งปนเปื้อนจากเมทริกซ์ด้วยอะซิโตนไตรและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง 2 ชนิด คือ Isolut Mutimode และ cation-exchange cartridge จากนั้นนำไปตรวจวัดด้วย ESI-LC MS/MS โดยใช้ อะคริลาไมด์เจือไอโซโทป ($^{13}\text{C}_3$ - acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ในขั้นตอนการแยกโครมาโทกราฟีใช้คอลัมน์เจลโพลีเมทาอะคริเลต (polymethacrylate gel) ซึ่งอะคริลาไมด์จะถูกหน่วงไว้ (retention) ในคอลัมน์ได้ดีในสภาวะการชะแบบไอโซครติก มีค่าแฟกเตอร์ความจุ (k) เท่ากับ 1.2 เมสสเปกตรัมได้จากเทคนิค selected reaction monitoring (SRM) โดยเลือกตรวจติดตามการทรานสิชันของมวลต่อประจุ 72/55, 72/54 และ 72/27 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validation in-house) ในฉันทูพืชอาหารเข้าและแครกเกอร์ ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ทั้งภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันและห้องปฏิบัติการอื่นมีการเปลี่ยนแปลงต่ำกว่าร้อยละ 10 ขีดจำกัดการตรวจพบในแครกเกอร์และฉันทูพืชอาหารเข้าประมาณ 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์คืนกลับใน

ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอยู่ระหว่างร้อยละ 58 - 76 นอกจากนี้วิธีนี้ยังเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ รวมทั้ง บิสกิต ขนมปังกรอบ เวเฟอร์ โกโก้และถั่ว

Denis Andrzejewski และคณะ [43] วิเคราะห์หาสารอะคริลาไมด์ในกาแฟโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS เป็นวิธีที่ตัดแปลงการวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหารมาใช้วิเคราะห์กาแฟ ได้แก่กาแฟสำเร็จรูป กาแฟบด กาแฟขง ใช้อะคริลาไมด์เจือไอโซโทป ($^{13}\text{C}_3$ - acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด การวิเคราะห์กาแฟบดและกาแฟสำเร็จรูปนั้นใช้น้ำหนัก 1 และ 0.5 กรัมตามลำดับสกัดด้วยน้ำ 9 มิลลิลิตรแช่ 20 นาที ส่วนกาแฟขงใช้ 9 มิลลิลิตรนั้นนำไปผ่านชั้นตอนทำให้บริสุทธิ์โดยตรงไม่ต้องมีตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยกาแฟที่ใช้ทดสอบจำนวน 1.5 มิลลิลิตรผ่านการสกัดแบบเฟสของแข็ง ชนิด cartridge Oasis HLB (hydrophilic/lipophilic copolymer sorbent) และ Bond Elut-Accucat (cation and anion exchange sorbent) สารละลายที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตรวจวัดด้วย ESI-LC MS/MS ในโหมดประจุบวก ซึ่ง MS/MS ใช้ในการตรวจวัด ยืนยันและหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ ซิดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณสำหรับกาแฟบดและกาแฟสำเร็จรูปเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนกาแฟขง 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากสำรวจพบปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในกาแฟบด 45 – 374 นาโนกรัมต่อกรัม กาแฟสำเร็จรูป 172-539 นาโนกรัมต่อกรัม และกาแฟขง 6-16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Michael S. Young และคณะ [44] ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากมันฝรั่งด้วยเครื่อง LC-MS สกัดสารอะคริลาไมด์จากตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแบบเฟสของแข็ง 2 ชนิดคือ Oasis HLB (reverse-phase cartridge) และ Oasis MCX (mixed-mode cation-exchange cartridge) นำสารละลายตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตรผ่าน Oasis HLB ชะด้วยสารละลาย 1% ของกรดฟอร์มิกในเมทานอล นำสารละลายที่ได้ผ่าน Oasis MCX จากนั้นนำสารละลายที่ได้หลังจากการผ่าน SPE มาระเหยแห้งและละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่ก่อนจะนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS เปรอร์เซ็นต์คืนกลับเมื่อใช้อินเตอร์นอลสแตนดาร์ด อยู่ระหว่างร้อยละ 96-101 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 5-11 ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 100-2,000 นาโนกรัมต่อกรัม ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.992 (n=25) ศึกษาการความแม่นยำและเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday) พบว่า เปรอร์เซ็นต์คืนกลับเท่ากับร้อยละ 98 และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ร้อยละ 9.5 (n=15) จากการสำรวจพบปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งแผ่นตั้งแต่ 260-1,500 นาโนกรัมต่อกรัม

Franceca Calbiani และคณะ [29] พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่ผ่านการปรุงสุก ให้มีความรวดเร็วและถูกต้องโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS และมี ESI เป็นอินเทอร์เฟส พัฒนาการสกัดสารอะคริลาไมด์ด้วยน้ำที่มีกรด (acidified water) และไม่ต้องมีการทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ แยกด้วยคอลัมน์ C18 เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายกรดฟอร์มิกและเมทานอล ในสภาวะการชะแบบไอโซเครติก ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

(in-house validation) โดยทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (robustness) ชีดจำกัดการตรวจพบ ชีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ ความเป็นเส้นตรง เปอร์เซ็นต์คืนกลับและความถูกต้องโดยการเติม สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการอบและแปรงมันฝรั่ง ค่าขีดจำกัดการ ตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับน้อยกว่า 15 และ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเป็นเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ เท่ากับ 0.999-1.000 การวิเคราะห์ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน (intraday) พบค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 1.5 และความ เทียงในการวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday) พบค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 5 เปอร์เซ็นต์คืนกลับของการสกัดอยู่ในช่วง $97 \pm 3\%$ ถึง $99 \pm 2\%$ ($n = 6$) โดยใช้อะคริลาไมด์ เจือไอโซโทป ($^{13}\text{C}_3$ -acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

Alain Pittet และคณะ [45] พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ ในอาหาร จำพวกธัญพืชซึ่งมีการปนเปื้อนสารนี้ในปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยใช้ เครื่อง GC-MS โดยการสกัดด้วยน้ำ ทำให้อยู่ในสถานะกรดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II และการทำปฏิกิริยาเพิ่มเข้าโบรมีน (bromination) ในพันธะคู่ของอะคริลาไมด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยา คือ 2,3-dibromopropionamide นั้นจะสกัดด้วย เอทิลอะซิเตตต่อ เฮกเซนในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมโซเดียมซัลเฟตเพื่อลดความชื้นและทำให้ บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Florisil เปลี่ยนสารอนุพันธ์ให้เป็น 2-bromopropenamide โดยปฏิกิริยา dehydrobromination ด้วย triethylamine และทำการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และใช้อะคริลาไมด์ เจือไอโซโทป ($^{13}\text{C}_3$ - acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ทดสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์ พบว่า การทวนซ้ำได้ (repeatability) และการทำซ้ำได้ (reproducibility) มีค่าเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่าร้อยละ 10 ชีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์คืนกลับจากการเติม สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่ระดับ 5-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในช่วง ระหว่างร้อยละ 93- 104

K. Hoenicke และคณะ [46] การวิเคราะห์อะคริลาไมด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และ GC-MS/MS ซึ่งการวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS/MS มีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ วิธีที่หนึ่ง สามารถใช้วิเคราะห์อาหารหลากหลายชนิดเช่น มันฝรั่งแผ่น เฟรนช์ฟราย ธัญพืชอาหาร เข้า ขนมปัง และกาแฟแก้ว ใช้ตัวอย่าง 2 กรัม กำจัดไขมันด้วยไอโซเฮกเซน (iso-hexane) สกัด สาร อะคริลาไมด์จากตัวอย่างด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร และใช้ ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 60 องศา- เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการเติมอะซิโตนไตรี สารละลาย carrez I และ carrez II ตามลำดับ นำตัวอย่างหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถึง 60 ตัวอย่างต่อวัน ส่วนวิธีที่ สองนั้นเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากกว่าวิธีแรก แต่สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเมทริกซ์ซับซ้อน

เช่น โกลี กากาแฟชง โมลาส และ มอลต์ ใช้ตัวอย่าง 2- 10 กรัม สกัดสารอะคริลาไมด์จากตัวอย่างด้วยน้ำจำนวน 50 มิลลิลิตรและใช้ ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมไอโซเฮกเซน สารละลาย carrez I และ carrez II นำตัวอย่างหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นน้ำมาทำให้อิ่มตัวด้วยโซเดียมคลอไรด์และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตจำนวน 50 มิลลิลิตร รวมสารละลายในชั้นของเอทิลอะซิเตตและทำให้เข้มข้นขึ้น โดยระเหยให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร นอกจากนี้วิธีที่สองยังเหมาะสมกับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS ช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะ ซึ่งทั้งสองวิธีใช้อะคริลาไมด์เจือไอโซโทป ($^2\text{d}_3$ -acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ชัดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณสำหรับ HPLC- MS/MS และ GC-MS/MS เท่ากับ 30 และ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ

Kit Granby และ Sisse Fagt [47] ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในกาแฟละลายตัวอย่างกาแฟคและกาแฟสำเร็จรูป (ละลายกาแฟด้วยน้ำในสัดส่วนเหมือนกับการบริโภคจริง) นำกาแฟที่ละลายแล้ว จำนวน 40 มิลลิลิตร เติมอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ($^2\text{d}_3$ -acrylamide) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็งชนิด Isolute Multimode 300 mg ด้วยเครื่อง automatic SPE วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ESI โหมดประจุบวก ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตัวอย่างกาแฟพร้อมดื่มเติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร พบเปอร์เซ็นต์คืนกลับเท่ากับร้อยละ 96 ± 14 และ 100 ± 8 ตามลำดับ และการทำซ้ำได้ที่วิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันเท่ากับ ร้อยละ 14 และ 9 ตามลำดับ

Cavalli S. และคณะ [48] การตรวจวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในน้ำดื่มโดย ion-exclusion chromatography-mass spectrometry โดยการฉีดตรงในปริมาณมาก คอลัมน์ microbore ICE-AS1 ในการแยกและตรวจวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทมิเตอร์ในโหมด selected - ion monitoring ด้วยเครื่องวิเคราะห์แบบ single quadrupole (ทำให้เกิดไอออนด้วยวิธีสเปรย์ไฟฟ้า) ปริมาตรที่ฉีดสูงถึง 500 ไมโครลิตร ความเป็นเส้นตรง 0.5 -5 ไมโครกรัมต่อลิตร การทวนซ้ำได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับร้อยละ 16 และ 12 ตามลำดับ ชัดจำกัดการตรวจพบ 0.20 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb) เมื่อฉีดที่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

B.Loye Eberhart II และคณะ [49] การหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเครื่อง LC-MS ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและไม่แพง วิธีนี้พัฒนาให้สามารถวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด โดยการเติมสารอะคริลาไมด์เจือไอโซโทป (1-C^{13} acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดในผลิตภัณฑ์อาหาร 6.00 กรัม เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเอทิลีนไดคลอไรด์ (ethylene dichloride) จำนวน 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer) และหมุนเหวี่ยงที่ $2,700 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนชั้นบนมา 8 กรัม และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต จำนวน

10, 5 และ 5 มิลลิลิตร รวมส่วนที่สกัดทั้งหมด เดิมโซเดียมซัลเฟตเพื่อลดความชื้นและเพิ่มความเข้มข้นโดยระเหยให้เหลือปริมาตรประมาณ 100 -200 ไมโครลิตร ตรวจวัดอะคริลาไมด์ด้วย ESI-LC-MS วิเคราะห์มวลแบบ single quadrupole คอลัมน์ที่ใช้แยก คือ C18 (YMC ODS, 5 ไมครอน ขนาด 2.0 x 150 มิลลิเมตร) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำกับสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ของแอมโมเนียมอะซิเตต ปรับ pH เป็น 4.6 ด้วยกรดฟอร์มิก ตรวจติดตามมวลต่อประจุ เท่ากับ 72 (อะคริลาไมด์) และมวลต่อประจุ เท่ากับ 73 (อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) สำหรับในอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนเช่น กาแฟและโกโก้ นั้นเพิ่มขั้นตอนการใช้ SPE (Sep-Pak Plus C18) ในการทำบริสุทธิ์เพื่อปรับปรุงการแยกของโครมาโทแกรมและเพิ่มอายุการใช้งานของคอลัมน์ ซิดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 0.998 และ เปอร์เซ็นต์คืนกลับจากการเติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในอาหารที่แตกต่างกัน 11 ชนิด ผลที่ได้น่าเชื่อถือ ในมันฝรั่งแผ่นมีความเที่ยงในการวิเคราะห์โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 5-8 การตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS นั้นเป็นทางเลือกหนึ่ง ซึ่งปัจจุบันใช้ LC-MS/MS และ GC-MS ซึ่งต้องทำเตรียมสารอนุพันธ์ นอกจากนั้นวิธีนี้ยังเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อนเช่น กาแฟ โกโก้ และอาหารที่มีเกลือสูง

Jingjing Jiao และคณะ [22] พัฒนาวิธีหาปริมาณอะคริลาไมด์ในนมผงเด็กและอาหารเด็กในโถโดยใช้ ESI-LC MS/MS อาศัยเทคนิคการเจือจางไอโซโทป ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเติมปิโตรเลียมอีเทอร์เพื่อกำจัดไขมัน และสกัดด้วยละลายโซเดียมคลอไรด์ ทำการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวด้วยเอทิลอะซิเตตและทำให้บริสุทธิ์ด้วย SPE Oasis HLB 200 mg cartridge ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ดี ได้แก่ ความทวนซ้ำได้ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่าร้อยละ 5 และเปอร์เซ็นต์คืนกลับเท่ากับร้อยละ 86-97 การสำรวจพบระดับการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในนมผงสำหรับเด็กและอาหารเด็กในโถเท่ากับ 3.01-9.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมและ 6.80-124.93 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถหาปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารเด็กซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนน้อยกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมได้

Yu Zhang และคณะ [23] ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารธัญพืชสำหรับเด็กทารกโดยใช้ ESI-LC MS/MS อาศัยเทคนิคการเจือจางไอโซโทป วิธีนี้กำจัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ก่อนแล้วสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ต่อจากนั้นสกัดแบบของเหลว-ของเหลวด้วยเอทิลอะซิเตตและทำให้บริสุทธิ์ใช้ SPE Oasis HLB cartridges คอลัมน์ที่ใช้ Atlantis dC18 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 210 มิลลิเมตร x 1.5 มิลลิเมตร โดยใช้ 10% ของเมทานอลต่อ 0.1% ของกรดฟอร์มิกในน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ให้ผลที่ดี ความทวนซ้ำได้พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่าร้อยละ 6.5 และเปอร์เซ็นต์คืนกลับร้อยละ 87-96 การสำรวจพบการปนเปื้อนอะคริลาไมด์ในข้าวธัญพืชสำหรับ

ทารกและผลิตภัณฑ์อาหารรัฐพีชอื่นๆ เท่ากับ 3.3-37.1 และ 10.9-1568.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับในกรณีตัวอย่างมีโปรตีนมากนั้น สามารถเพิ่มขั้นตอนการกำจัดโปรตีนในการ ขั้นตอนการเตรียมตัวได้

E.Bermudo และคณะ [24] ตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารโดยใช้ LC-MS/MS มีแหล่งผลิตไอออนคือ วิธีการผลิตไอออนทางเคมีที่ความดันบรรยากาศ (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI) และ ion-trap เป็นเครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ไม่ใช่วัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษาแต่เป็นทางเลือกหนึ่งแทนการใช้ ESI และ triple quadruple เพื่อวิเคราะห์มวล งานวิจัยนี้ศึกษาการทำให้อาหารที่สกัดให้บริสุทธิ์ด้วยการต่อเชื่อมของการสกัดแบบเฟสของแข็ง 2 ชนิด ที่มีตัวดูดซับชนิด highly cross-linked polystyrene-divinylbenzene polymeric sorbents คือ Strata-X-C และ ENV⁺ พบเปอร์เซ็นต์คืนกลับสูงร้อยละ 85 และการทำซ้ำได้ดี มีค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 12 เมื่อใช้การสกัดแบบเฟสของแข็ง 2 ชนิด การแยกด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ มีขีดจำกัดการตรวจพบสำหรับสารละลายมาตรฐาน เท่ากับ 250 พิโคกรัม และตัวอย่าง 45 นาโนกรัมต่อกรัม การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยการแบบครั้งต่อครั้ง (run-to-run) และวันต่อวัน (day-to-day) พบว่าค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 3.3 และ 8 ตามลำดับ

Hamide Z. Senyuva และ Vural Gokmen [17] พัฒนาวิธีให้ง่ายและรวดเร็วสำหรับหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งและอาหารจำพวกพืชโดยใช้ LC-MS อินเตอร์เฟส APCI โหมคประจุบวก ใช้ 0.01 มิลลิโมลาร์ ของกรดอะซิติก และเครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลอง (vertex mixer) ในการสกัดอะคริลาไมด์ก่อนจะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์อาหารที่ผ่านการปรุงได้ในหลากหลายชนิด รวมทั้ง มันฝรั่งแผ่น มันฝรั่งทอด มันฝรั่งกรอบ ขนมปัง บิสกิตและลูกก็ พบว่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยในช่วงความเข้มข้นอะคริลาไมด์ 100-1,000 นาโนกรัมต่อกรัม เท่ากับร้อยละ 99.7 และความทวนซ้ำได้ เท่ากับร้อยละ 1.8 การวิเคราะห์ LC-MS มีการระบุสิ่งปนเปื้อนหลักที่ได้จากการสกัดคือ สารวาเลิน (valine) ซึ่งมี yield characteristic $[M+H]^+$ และสารประกอบเฉพาะ มวลต่อประจุของ ไอออนผลิตภัณฑ์คือ 118 และ 72 ตามลำดับ ซึ่งสารวาเลินจะไปเพิ่มสัญญาณของ baseline ครอบคลุมความแม่นยำและความเที่ยงในการหาปริมาณ และผลมีความไวต่ำในการใช้ mode selected ion monitoring หลีกเลี่ยงผลกระทบจากสารวาเลิน โดยใช้ การใช้ delay time สำหรับเครื่อง LC-MS หรือใช้ SPE แบบ strong cation-exchanger sorbent

E.K. Paleologos และ M.G. Kontominas [50] พัฒนาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ และเมทาอะคริลาไมด์ (methaacrylamide) ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ชนิด นอร์มอลเฟสและยูวี เป็นคิเทคเตอร์ วิธีวิเคราะห์อาศัยการแยกของสารที่สนใจวิเคราะห์ในคอลัมน์มี หัวของ HPLC ที่ออกแบบสำหรับใช้แยกกรดอินทรีย์ และเป็นวิธีที่ใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของอะคริลาไมด์

และเมทาอะคริลาไมด์ไปพร้อมกัน โดยในรูป protonated forms และเป็นผลผลิตที่ได้จากไฮโดรไรซิส คือ อะคริลิก (acrylic acid) และเมทาอะคริลิก (methacrylic acid) เพื่อใช้ยืนยัน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร วิเคราะห์ที่ง่ายซึ่งได้การแยกที่ชัดเจนของพีกเป้าหมายจากพีครบกวน ซีดจำกัดการตรวจพบ 10 ไมโครกรัมต่อลิตรของสารที่สนใจทั้ง 2 ชนิด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ทั้งระหว่างวัน (inter-day) และภายในวันเดียว (intra-day) น้อยกว่าร้อยละ 1.0 ใช้อะซิโตนในโครมาโทกราฟีในการชะ ทำให้ขีดจำกัดตรวจพบและเวลาที่ถูกหน่วงไว้ลดลง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของพีค วิเคราะห์นี้ประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์และเมทาอะคริลาไมด์ในอาหาร เปรอร์เซ็นต์คืนกลับเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างไม่ได้สารสนใจ (sample blank) อยู่ระหว่างร้อยละ 95 -103

Jose A. Rufian และ Francisco J. Morales [51] ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งแผ่นโดยใช้ LC-MS อาศัยเทคนิคเจือจางไอโซโทปที่เสถียร (stable isotope dilution) ผลิตภัณฑ์จากมันฝรั่งเป็นตัวแทนอาหารที่ปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ที่มีบริโภคนั้นเป็นประจำ สกัดสารอะคริลาไมด์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เติมสารอะคริลาไมด์เจือไอโซโทป ($^{13}\text{C}_3$ -acrylamide) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez และการสกัดแบบเฟสของแข็งที่มีการประยุกต์มาใช้เมทานอลเป็นตัวชะ ศึกษาจุดวิกฤตในการสกัดระหว่างสัดส่วนของน้ำหนักรมันฝรั่งต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้พบว่าสัดส่วนที่ดีที่สุดคือ 0.125 กรัมต่อ 1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ การนำน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์มาใช้เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้สารอะคริลาไมด์สูญหายระหว่างการทำให้เมทานอลแห้งนั้นทำให้มีเปอร์เซ็นต์คืนกลับสูง การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซีดจำกัดการตรวจพบ และขีดจำกัดวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 23.2 และ 91.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.999 ที่ความเข้มข้น 25-1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เปรอร์เซ็นต์คืนกลับร้อยละ 98.8 วิธีนี้นำมาประยุกต์กับมันฝรั่งแผ่นที่จำหน่ายตามท้องตลาด ทดสอบความทนซ้ำได้ เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ ร้อยละ 3.9 การสำรวจพบว่าผลิตภัณฑ์มันฝรั่งแผ่นในระดับอุตสาหกรรมและระดับท้องถิ่นนั้นมีปริมาณอะคริลาไมด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Vural Gokmen และ Hamide Z. Senyuva [27] ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนและพัฒนาการเตรียมตัวอย่างใช้เมทานอลเป็นตัวสกัดสารอะคริลาไมด์และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้สารละลาย carrez I และ II จากนั้นทำการระเหยเพื่อเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายจากเมทานอลเป็นน้ำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วย SPE Oasis HLB นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS ใช้คอลัมน์ ODS-3 เฟสเคลื่อนที่ วิธีการชะแบบไอโซเกรดิก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย กรดอะซิติกเข้มข้น 0.01 มิลลิโมลาร์ของ 0.2 % กรดฟอริกในน้ำ อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรอร์เซ็นต์คืนกลับของมันฝรั่ง

แผ่น บิสกิตและกาแฟอยู่ในช่วง ร้อยละ 92.8 -101.5 ค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ร้อยละ 4.1 หรือน้อยกว่า ซิดจำกัดการตรวจพบและซิดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 2 และ 6 นาโนกรัมต่อกรัม ได้จากอัตราส่วนของสัญญาณและสัญญาณรบกวน (signal to noise) 3 ต่อ 1 และ 9 ต่อ 1 ตามลำดับ

Innocenzo G. Casella และคณะ [52] ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์และกรดอะคริลิกโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลว มีวิธีการชะแบบไอโซครีติก และ pulsed electrochemical เป็นดีเทคเตอร์ จากคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของขั้ว polycrystalline platinum ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของโมเลกุลของ อลิฟาติกห่วงโซ่สั้นแบบไม่อิ่มตัว (short-chain unsaturated aliphatic) เช่น อะคริลาไมด์และอะคริลิกในสารละลายที่เป็นกรด สารที่สนใจวิเคราะห์แยกด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวแบบรีเวอร์สเฟสและตรวจวัดด้วย pulsed amperometric แบบ two-step waveform สำหรับตรวจหาปริมาณสารละลายที่เป็นน้ำที่มีอะคริลาไมด์และอะคริลิก มีซิดจำกัดการตรวจพบ 20 นาโนโมลาร์ (1.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และ 45 นาโนโมลาร์ (3.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ tree-step waveform แบบเดิมกับ แบบ two-step waveform ซึ่งแสดงสมรรถภาพของการวิเคราะห์ในเทอม ซิดจำกัดการตรวจพบ ช่วงความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำและการทำซ้ำได้ (reproducibility) สามารถใช้งานนานขึ้น วิเคราะห์รวมขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (clean-up) ด้วยสารละลาย carrez และการสกัดแบบเฟสของแข็ง แบบ strong cation exchanger ด้วยน้ำทำให้สามารถหาปริมาณอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำในอาหาร เช่น กาแฟและมันฝรั่งทอด

Yu Zhang และคณะ [53] ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณในอาหารทอดโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีดีเทคเตอร์ คือ อิเล็กตรอนแคปเจอร์ (GC-ECD) วิธีนี้จะกำจัดไขมันด้วยเฮกเซน และใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์สกัดอะคริลาไมด์จากตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ทำอนุพันธ์ด้วยโพแทสเซียมโบรเมต ($KBrO_3$) และโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ทำการสกัดแบบของเหลวของเหลว โดยใช้เอทิลอะซิเตต และทำสารละลายที่สกัดได้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณด้วย GC-ECD และ GC-MS เพื่อยืนยัน คอลัมน์ที่ใช้ในการแยก คือ HP-INNOWax capillary column ซิดจำกัดการตรวจพบของวิธีวิเคราะห์ประมาณ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซิดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (GC-ECD) เปรอร์เซ็นต์คืนกลับของอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample) ที่ความเข้มข้นระดับ 150, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (แต่ละความเข้มข้นจำนวน 4 ซ้ำ) มีค่าอยู่ในระหว่าง ร้อยละ 87 - 97 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่าร้อยละ 4

Varal Gokmen และคณะ [54] พัฒนาริธีตรวจวิเคราะห์มันฝรั่งแผ่นด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง ตรวจวัดด้วย ไดโอดอาร์เรย์ (LC-DAD) ให้เป็นวิธีที่ง่ายและเร็ว สามารถตรวจวิเคราะห์อาหารจำพวกมันฝรั่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ สกัดอะคริลาไมด์ด้วยเมทานอล ทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II ระเหยเมทานอลออกและเปลี่ยนเป็น

น้ำเป็นตัวทำละลาย และสกัดด้วยเฟสของแข็ง Oasis HLB นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณด้วย LC-DAD และยืนยันด้วย LC-MS การแยกของโครมาโทกราฟด้วยอันตรกิริยาชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของคอลัมน์ ซึ่งอะคริลาไมด์จะหน่วงไว้ได้ดีในคอลัมน์ ที่สถานะน้ำ 100 % ค่าแฟกเตอร์ความจุ (k) เท่ากับ 3.67 เวลาที่ถูกละลายไว้ (RT) เท่ากับ 2.54 จีตจำกัดการตรวจพบ 4.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (3 เท่าของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน ที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร) เปอร์เซ็นดีคืนกลับเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (จำนวนระดับละ 4 ซ้ำ) อยู่ในช่วงร้อยละ 92.8 – 96.2 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 5

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย

3.1.1 สารมาตรฐานและวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน

1. อะคริลาไมด์ (C_3H_5NO) ผลิตภัณฑ์ของ SIGMA ALDRICH ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.0
2. d_5 -อะคริลาไมด์ (C_3D_5NO) ผลิตภัณฑ์ของ SIGMA ALDRICH (ร้อยละของอะตอมดิวทีเรียม 98 อะตอม)
3. วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Standard Reference Material, SRM) SRM2387 Peanut Butter ผลิตภัณฑ์ของ NIST ระบุค่า reference concentration value ของสารอะคริลาไมด์ เท่ากับ 87.0 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

3.1.2 สารเคมี

1. โพแทสเซียม เฮกซะไซยาโนเฟอเรท (potassium hexacyanoferrate) analytical grade ผลิตภัณฑ์ของ FLUKA
2. ซิงค์ซัลเฟต (zinc sulphate) analytical grade ผลิตภัณฑ์ของ UNIVAR
3. เมทานอล (methanol) chromatography grade ผลิตภัณฑ์ของ MERCK
4. กรดฟอร์มิก (formic acid) analytical grade ผลิตภัณฑ์ของ MERCK
5. กรดอะซิติก (acetic acid) analytical grade ผลิตภัณฑ์ของ MERCK
6. แก๊สไนโตรเจน
7. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องบดตัวอย่าง
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว (centrifuge) ผลิตภัณฑ์ของ HERMLE รุ่น Z400
3. หลอดพลาสติกสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge tube) พลาสติกชนิด polypropylene copolymer ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิดพลาสติกชนิด polypropylene
4. เครื่องเขย่า (shaker) ผลิตภัณฑ์ของ YAMOTO รุ่น SA300
5. autopipett ขนาด 5- 40, 40-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร
6. เครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลอง (vortex mixture) VORTEX-2 GENIE

7. syringe filter ชนิดไนลอน (nylon) รูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร แบบ disposable
8. ขวดแก้ว derivatize ขนาด 4 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
9. เฟสของแข็งสำหรับสกัด Oasis HLB 6 cc. (200 mg) และเฟสของแข็งสำหรับสกัด Oasis MCX 3 cc (60 mg) ผลิตภัณฑ์ของ Water
10. คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Phenomenex
11. คอลัมน์ Atlantis dC18 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Water
12. เครื่องซั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง Satorius model AC 211S
13. เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถนะสูงของบริษัท Agilent รุ่น 1100 ประกอบด้วยปั๊มแบบ binary pump เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sample) และส่วนควบคุม อุณหภูมิคอลัมน์ เชื่อมต่อกับแท่นเคมีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS) รุ่น API 4000 ของบริษัท Applied Biosystem MDS SCIEX

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหารโดยใช้เครื่อง LC-ESI-MS/MS

3.2.1.1 ศึกษาการแยกสิ่งรบกวน (interference) ในสารละลายตัวอย่างออกจากสารที่สนใจเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS

3.2.1.2 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดสารอะคริลาไมด์ในอาหาร (โดยเฉพาะอาหารที่มีแป้งปริมาณมาก เช่น มันฝรั่ง)

3.2.2 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารเมทริกต่างๆด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร

โดยการเก็บตัวอย่างอาหารที่สงสัยจะมีปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์โดยเฉพาะอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน และทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3.2.4 สรุปรวบรวมและประเมินผลการศึกษา

3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.3.1.1 สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (stock standard solution)

ชั่งสารมาตรฐานอะคริลาไมด์ 0.0500 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 6 เดือน

3.3.1.2 สารละลายมาตรฐาน 2d_3 - อะคริลาไมด์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (internal standard solution)

ชั่งสารมาตรฐาน 2d_3 - อะคริลาไมด์ 0.0500 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (2d_3 -อะคริลาไมด์ เปลี่ยนเป็น 2d_3 - อะคริลาไมด์ อย่างรวดเร็วเมื่อละลายในน้ำ) เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 6 เดือน

3.3.1.3 สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (working standard solution)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

3.3.1.4 สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (spike standard solution)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 10 และ 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

3.3.1.5 สารละลายมาตรฐาน 2d_3 - อะคริลาไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (working internal standard solution)

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 2d_3 -อะคริลาไมด์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration standard solution)

สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่มีสารละลายมาตรฐาน 2d_3 - อะคริลาไมด์ เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นอินเทอร์นอล-สแตนดาร์ด โดยปีเปิดสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.1.3) จำนวน 0, 5, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 7 ใบ ตามลำดับ และปีเปิดสารละลายมาตรฐาน 2d_3 - อะคริลาไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.1.5) จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรทุกขวด ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3 การเตรียมสารละลายเคมี

3.3.3.1 สารละลาย carrez I

ซังโปแตสเซียม เฮกซะไซยาโนเฟอเรท 15 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน จำนวน 100 มิลลิลิตร

3.3.3.2 สารละลาย carrez II

ซังซิงค์ซัลเฟต 30 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน จำนวน 100 มิลลิลิตร

3.3.3.3 สารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 50, 60, 70, 80 และ 90 % โดยปริมาตร

ดวงเมทานอล จำนวน 50, 60, 70, 80 และ 90 มิลลิลิตร ลงในน้ำปราศจากไอออน จำนวน 50, 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.3.4 สารละลาย 0.1 % โดยปริมาตร ของกรดอะซิติกในสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร

ปีเปิดกรดอะซิติกจำนวน 1 มิลลิลิตร ในสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.3.3.5 สารละลาย 0.1 % โดยปริมาตร ของกรดฟอร์มิกในสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร

ปีเปิดกรดฟอร์มิกจำนวน 1 มิลลิลิตร ในสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.3.3.6 สารละลาย 0.1 % โดยปริมาตร ของกรดอะซิติก (เฟสเคลื่อนที่)

ปีเปิดกรดอะซิติกจำนวน 1 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองชนิดเซลลูโลส อะซิเตต (cellulose acetate) ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

3.3.4 ศึกษาการแยกสิ่งรบกวน (interference) ในสารละลายตัวอย่างออกจากสารที่สนใจเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS

3.3.4.1 กำจัดสิ่งรบกวนโดยการทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา คือ SRM2387 peanut butter ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารอะคริลาไมด์จากตัวอย่างและทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง 2 ชนิด คือ Oasis HLB และ Oasis MCX ตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS เปรียบเทียบโครมาโทแกรมก่อนและหลังทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยเฟสของแข็ง เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ Atlantis dC18 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร วิธีการระบบไอโซเครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที

ขั้นตอนการศึกษา

3.3.4.1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม เติม d_3 -อะคริลาไมด์จำนวน 400 นาโนกรัม ตัวทำละลายที่ใช้สกัดตัวอย่าง คือ น้ำ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย carrez I และ carrez II อย่างละ 100 ไมโครลิตร เวลาที่ใช้เขย่าเพื่อสกัด 20 นาที ปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นำสารละลายตัวอย่างส่วนใสที่สกัดได้ กรองผ่าน syring filter ชนิดไนลอน (nylon) ขนาด 0.45 ไมครอน ลงในขวดสีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร ตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS

3.3.4.1.2 การทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยเฟสของแข็ง ต้องปรับสภาพเฟสของแข็งก่อนใช้งาน ด้วยเมทานอล 2 มิลลิลิตร และ น้ำ 2 มิลลิลิตร เมื่อปรับสภาพเฟสของแข็งเรียบร้อยแล้ว นำสารละลายตัวอย่างส่วนใส จากข้อ 3.3.4.1.1 จำนวน 2 มิลลิลิตร ผ่านเฟสของแข็ง Oasis HLB เมื่อสารละลายตัวอย่างผ่านเฟสของแข็งหมดแล้ว ชะด้วยน้ำจำนวน 2 มิลลิลิตร เก็บส่วนของสารละลายที่ชะได้ไว้และนำมาผ่านเฟสของแข็ง Oasis MCX โดยต้องปรับสภาพเฟสของแข็งก่อนใช้งาน ด้วย เมทานอล 2 มิลลิลิตร และ น้ำ 2 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านเฟสของแข็งโดยจะทิ้งส่วนของสารละลาย 10 หยดแรก สารละลายที่เก็บได้ กรองผ่าน syring filter ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน ลงในขวดสีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร ตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS

3.3.4.2 การแยกโครมาโทกราฟของสารที่สนใจออกจากสิ่งรบกวน

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา คือ SRM2387 peanut butter ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารอะคริลาไมด์จากตัวอย่าง เปรียบเทียบการแยกโครมาโทกราฟของสารที่สนใจออกจากสิ่งรบกวนเมื่อใช้คอลัมน์ 2 ชนิด คือ คอลัมน์ Atlantis dC18 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร และคอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร แทนการทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง

ขั้นตอนการศึกษา

ทำการเตรียมตัวอย่างเหมือนข้อ 3.3.4.1.1 ตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS ขั้นตอนการแยกใช้ วิธีชะแบบไอโซครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของ กรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เปรียบเทียบการแยกของโครมาโทกราฟของคอลัมน์ 2 ชนิด ดังที่กล่าวข้างต้น

3.3.5 ศึกษาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดสารอะคริลาไมด์ในอาหาร (โดยเฉพาะอาหารที่มีแป้งปริมาณมาก)

3.3.5.1 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัด ตัวอย่าง

ศึกษาตัวทำละลายผสมเมทานอลในน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ คือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 % โดยปริมาตร เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด ทำการศึกษาในตัวอย่าง 2 ชนิด คือ SRM2387 peanut butter และมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1 โดยกำหนดให้ตัวแปรอื่นๆ คงที่ คือ น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เวลาที่ใช้เขย่าเพื่อสกัด 20 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง (ทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II) พิจารณาผล การสกัดและเลือกตัวทำละลายผสมเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วนเหมาะสมในการสกัด

3.3.5.2 ศึกษาน้ำหนักของตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัด

ทำการแปรน้ำหนักตัวอย่าง 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายผสมเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วนที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3.5.1) ทำการศึกษาในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1 โดยกำหนดให้ตัวแปรอื่นๆ คงที่คือ ตัวทำละลาย ปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เวลาที่ใช้เขย่าเพื่อสกัด 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วย สารละลาย carrez I และ carrez II) นำชิ้นของตัวทำละลายที่สกัดครั้งแรกออก แล้วทำสกัดซ้ำครั้ง (สกัดครั้งที่ 2) เพื่อดูปริมาณอะคริลาไมด์คงเหลือหลังจากการสกัดครั้งแรก พิจารณาผลการสกัด และเลือกช่วงน้ำหนักที่เหมาะสมในการสกัด

3.3.5.3 ศึกษาสภาวะอื่นๆ

3.3.5.3.1 ทดลองเติมกรดลงในตัวทำละลายผสมเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วนที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3.5.1) คือ 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในตัวละลายที่เหมาะสม และ 0.1 % โดยปริมาตรของกรดฟอร์มิกในตัวละลายที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3.3.4 และ 3.3.3.5) เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด กำหนดให้ตัวแปรอื่นๆ คงที่คือ น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เวลาที่ใช้เขย่าเพื่อสกัด 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II) แล้วทำสกัดซ้ำอีกครั้ง ทำการศึกษาในตัวอย่าง มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 2

3.3.5.3.2 เพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายที่สกัด โดยเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายผสมเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วนที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3.5.1) จากเดิม 10 มิลลิลิตร เป็น 15 มิลลิลิตร โดยกำหนดให้ตัวแปรอื่นๆ คงที่คือ ตัวทำละลาย น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม เวลาที่ใช้เขย่าเพื่อสกัด 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II) นำชั้นของตัวทำละลายที่สกัดครั้งแรกออก แล้วทำสกัดซ้ำอีกครั้ง ทำการศึกษาในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 2

3.3.5.3.3 เพิ่มเวลาในการสกัด โดยเพิ่มเวลาในการเขย่าจากเดิม 20 นาที เป็น 30 นาที กำหนดให้ตัวแปรอื่นๆ คงที่คือ ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3.5.1) น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (ทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II) นำชั้นของตัวทำละลายที่สกัดครั้งแรกออก แล้วทำสกัดซ้ำอีกครั้ง ทำการศึกษาในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 2

3.3.6 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เมื่อได้ตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารอะคริลาไมด์ในอาหารแล้ว ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในแมทริกซ์ต่างๆ โดยเตรียมตัวอย่างอาหารที่ไม่มีสารที่สนใจ (sample blank) คือ ข้าวต้มสุก ข้าวโพดต้มสุก ถั่วต้มสุก ขนมันฝรั่งนึ่ง มันฝรั่งต้มสุก กุ้งและเมล็ดคาแฟตากแห้ง บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งตัวอย่างอาหารที่เตรียมนี้จะใช้เป็นตัวแทนของอาหารประเภทต่างๆ เมื่อเตรียม sample blank เรียบร้อยแล้วเริ่มทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

3.3.6.1 ความเป็นเส้นตรง (linearity)

การทดสอบโดยการนำสารละลายมาตรฐาน 7 ระดับความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.2) ทำการวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS โดยวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ สภาวะที่ใช้แยกคือ คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร วิธีการชะแบบไอโซเครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที นำผลการทดสอบที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคสารละลายมาตรฐาน (อะคริลาไมด์ m/z 72/55) ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (2d_3 -อะคริลาไมด์ m/z 75/58) และอัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด นำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย (regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the method of least squares) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) หรือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995 [55] และยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วย residual plots (ภาคผนวก ก.)

3.3.6.2 ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) [56]

วิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละเมทริกซ์ที่ไม่มีสารที่สนใจตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ (ข้อ 3.4) จำนวน 7-10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นในตัวอย่าง โดยที่ $LOD = \text{ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นในตัวอย่าง} + 3SD$ และค่าโดยประมาณของ LOQ (estimated LOQ) = ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นในตัวอย่าง + 10SD

การคำนวณ

$$\text{ค่าเฉลี่ย } (\bar{x}) = \frac{\sum x_i}{n} \quad (3.1)$$

เมื่อ x_i คือ ค่าของข้อมูลแต่ละค่า
 n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน } (SD) = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.2)$$

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

$$LOD \text{ (limit of detection)} = \bar{x} + 3SD$$

$$\text{estimated LOQ (limit of quantitation)} = \bar{x} + 10SD$$

3.3.6.3 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) [56]

วิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละเมทริกซ์ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample) ที่มีค่าความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า LOQ โดยประมาณ (estimated LOQ) ตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ (ข้อ 3.4) จำนวน 7-10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ค่าที่ได้ควรอยู่ในเกณฑ์ตามที่กำหนด (ภาคผนวก จ.) แต่ถ้าระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการประมาณค่า LOQ นั้นต่ำหรือสูงเกินไป สามารถเพิ่มหรือลดได้ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ต้องพิจารณาว่าค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์นั้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับหรือไม่

การคำนวณ

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3} \quad (3.3)$$

เมื่อ

C_1 คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample หรือ fortified sample)

C_2 คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง (unspiked sample หรือ unfortified sample)

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

$$\text{RSD}(\%) = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \quad (3.4)$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ย

3.3.6.4 ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy)

วิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละเมทริกซ์ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ ที่ระดับ LOQ, 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ตามขั้นตอน (ข้อ 3.4) จำนวน 7-10 ซ้ำ ความแม่นยำพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับและความเที่ยงพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (SRM) จำนวน 7-10 ซ้ำ ความแม่นยำพิจารณาจากค่าเฉลี่ยที่ได้ต้องอยู่ในช่วงใบรับรองระบุและประเมินค่าถูกต้อง (trueness) ของวิธีวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง (ภาคผนวก ช.) และศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 2 แบบ คือ การทวนซ้ำได้ (repeatability) เมื่อทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียว (intra-day) และ การทำซ้ำได้ (reproducibility) เมื่อทำการวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day) พิจารณาความเที่ยงของการวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร

เมื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเรียบร้อยแล้ว จากนั้นเริ่มทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่สงสัยจะมีการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ โดยเฉพาะอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน เช่น ทอด อบ ปิ้งหรือย่าง เช่น ขนมขบเคี้ยวหรืออบกรอบบรรจุซองที่วางขายทั่วไปตามร้านมินิมาร์ท หรือร้านขายของชำ อาหารอื่นๆที่ขายตามแผง

ลอย ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS เตรียมตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ตามขั้นตอนข้อ 3.4

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร

3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

3.4.1.1 บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดตัวอย่าง

3.4.1.2 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งลงในหลอดพลาสติกสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว บันทึกน้ำหนักที่ถูกต้อง

3.4.1.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน² d₅-อะคริลาไมด์ (อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 40 ไมโครลิตรลงในตัวอย่าง

3.4.1.4 ปิเปตสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร จำนวน 10 มิลลิตรเพื่อสกัดตัวอย่าง ปั่นด้วยเครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลอง ประมาณ 1 นาที

3.4.1.5 เติมสารละลาย carrez I และ carrez II อย่างละ 100 ไมโครลิตร

3.4.1.6 ปั่นด้วยเครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลอง ประมาณ 1 นาที จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.7 นำมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.8 ปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสจำนวน 0.7 มิลลิตร ในขวด derivatize เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน (หรือเป่าให้ปริมาตรสารละลายตัวอย่างเหลือน้อยกว่า 20 ไมโครลิตร) ทันทีกักเก็บน้ำ จำนวน 0.7 มิลลิตร ปิดฝาและปั่นด้วยเครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลอง ประมาณ 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่าน syring filter ชนิดไนลอน (nylon) ขนาด 0.45 ไมครอน ลงในขวดสีชา ขนาด 2 มิลลิตร และตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร

3.4.1.9 ในกรณีที่สารละลายตัวอย่างไม่สามารถแยกฟิสิกของสิ่งรบกวนออกจากฟิสิกของสารที่สนใจ ให้กำจัดสิ่งรบกวนโดยการสกัดแบบเฟสของแข็ง Oasis MCX 3 cc (60 mg) โดยต้องปรับสภาพเฟสของแข็งก่อนใช้งานด้วย เมทานอล 2 มิลลิตรและน้ำ 2 มิลลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสจากข้อ 3.4.1.7 จำนวน 2 มิลลิตรผ่าน Oasis MCX ทั้งสารละลายส่วนที่ผ่านเฟสของแข็งประมาณ 10 หยดแรก จากนั้นเก็บสารละลายซึ่งที่ผ่านเฟสของแข็ง แล้วปฏิบัติต่อตามข้อ 3.4.1.8

3.4.2 สภาวะที่เหมาะสมของโครมาโทกราฟของเหลวแทนเต็มแมสสเปกโทรมิเตอร์ (LC-MS/MS) สำหรับวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์

คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร วิธีการชะแบบไอโซครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 ด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ทำการตรวจติดตามเปลี่ยนแปลงไอออนของแทนเต็มแมสสเปกโทรมิเตอร์ แบบ การตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (multiple reaction monitoring, MRM) การทรานซิชันมวลต่อประจุของสารอะคริลาไมด์ 72/55 , 72/44 และ 72/72 ซึ่งได้จากไอออนแม่ (precursor ion) คือ m/z 72 แยกย่อยไอออนเป็นไอออนผลิตภัณฑ์ (product ion) คือ m/z 55, 44 และ 72 และการทรานซิชันมวลต่อประจุของ ²d₃-อะคริลาไมด์ m/z 75/58 ซึ่งได้จากไอออนแม่ คือ m/z 75 แยกย่อยไอออนเป็นไอออนผลิตภัณฑ์ คือ m/z 58 การคำนวณหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ใช้พื้นที่ใต้พีค (peak area) การทรานซิชัน m/z 72/55 (อะคริลาไมด์) และ m/z 75/58 (อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ²d₃-อะคริลาไมด์)

เครื่องแทนเต็มแมสสเปกโทรมิเตอร์ของ Applied Biosystem MDS SCIEX รุ่น API 4000 แหล่งผลิตไอออน คือ Turbo spray (ESI) วิเคราะห์มวลด้วย triple quadrupole และซอฟต์แวร์ (software version) : analyst 1.4.2

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งผลิตไอออนสำหรับวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ ในโหมดประจุบวก (positive mode)

พารามิเตอร์	ค่ากำหนด
temperature	400
Collision Gas (CAD)	6
Curtain Gas (CUR)	11
Ion Source Gas 1 (GS ₁)	60
Ion Source Gas 2 (GS ₂)	55
Ion Spray Voltage (IS)	5500

ตารางที่ 3.2 แสดงสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (multiple reaction monitoring, MRM)

	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell Time (mSec)	DP*	EP*	CE* (volts)	CXP* (volts)
อะคริลาไมด์	71.800	44.000	100	40	10	21	6
	71.800	55.000	100	40	10	16	8
	71.800	71.900	100	40	10	6	12
² d ₃ - อะคริลาไมด์	75.000	58.100	100	40	10	8	8

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

3.4.3 การควบคุมคุณภาพและรายงานผล

การควบคุมคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์

- ทำแบลนด์ของวิธีวิเคราะห์ (blank method) ทุก 5 % ของแต่ละชุดการทดลอง (batch)
- ทำซ้ำ (duplicate) ทุก 5 % ของแต่ละชุดการทดลอง
- เปร็เซ็นต์คืนกลับ (เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง) ทุก 5 % ของแต่ละชุดการทดลอง

การรายงานผลวิเคราะห์

- กรณีค่าที่ได้น้อยกว่า LOD รายงาน “ไม่พบ”
- กรณีค่าที่ได้อยู่ระหว่าง LOD และ LOQ รายงาน “น้อยกว่า LOQ”
- กรณีค่าที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับ LOQ รายงาน “ค่าตามจริง”

บทที่ 4

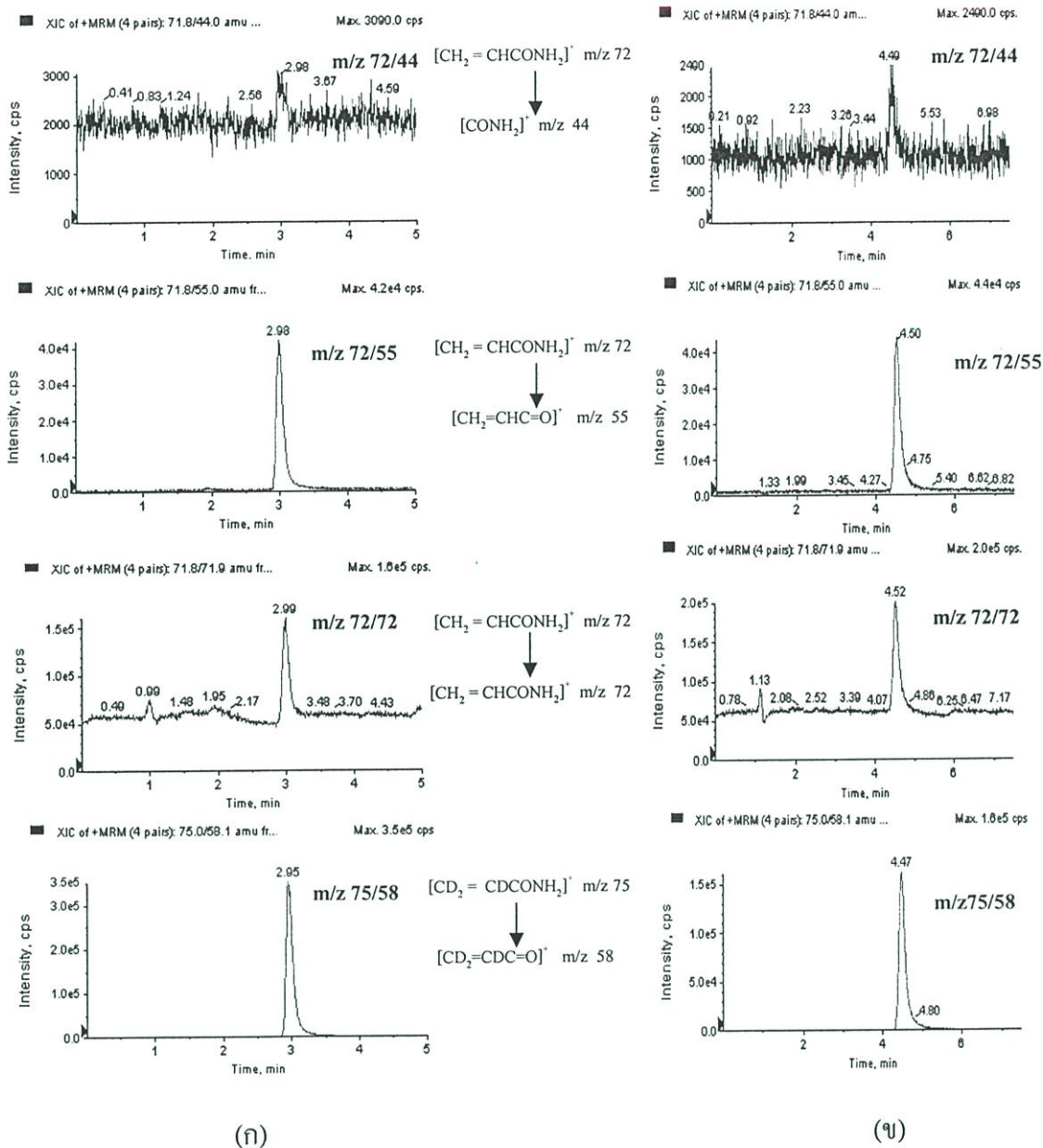
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS โดยใช้เทคนิคการเจือจางไอโซโทป

การวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในอาหารที่มีแมทริกซ์ค่อนข้างซับซ้อนนั้นทำได้ยาก เนื่องจากสารนี้มีโมเลกุลขนาดเล็กจึงต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะสูง การเลือกใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว เนื่องจากอะคริลาไมด์มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี (hydrophilic properties) สามารถทำได้ง่ายโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเป็นสารอนุพันธ์ หลังจากแยกสารอะคริลาไมด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแล้ว ดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้คือ แทนเด็มแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS/MS) ซึ่งมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจวิเคราะห์โครงสร้างเฉพาะตัวของไอออน (characteristic ions) ของอะคริลาไมด์ได้ นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ได้มีการเติมสารที่สนใจที่เจือไอโซโทปในตัวอย่างเพื่อเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (internal labeled standard) เรียกว่า “เทคนิคการเจือจางไอโซโทป” ซึ่งนิยมใช้แพร่หลายในการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการความถูกต้อง โดยจะช่วยให้ข้อมูลที่ได้รับความถูกต้องมากขึ้นเพราะช่วยปรับแก้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ผิดพลาดจากการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการปฏิบัติงาน เช่น ขั้นตอนสกัด ขั้นตอนตรวจวัดด้วยเครื่องมือ

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ของงานวิจัยนี้เลือกใช้ LC-MS/MS อินเตอร์เฟสเป็นแบบ ESI และเครื่องวิเคราะห์มวล ชนิด triple quadrupole ในโหมดประจวบกว ตรวจสอบติดตามการทรานสิชันของไอออนจากไอออนแม่ (precursor ion) เป็นไอออนผลิตภัณฑ์ (product ion) แบบตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (MRM) คือ m/z 72/44 , 72/55 , 72/72 และ 75/58 โดยที่ MS ตัวแรก (Q1) เลือกไอออนแม่ของสารอะคริลาไมด์ คือ $[\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2]^+$ m/z 72 และ $^2\text{d}_3$ -อะคริลาไมด์ (อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) คือ $[\text{CD}_2 = \text{CDCONH}_2]^+$ m/z 75 จากนั้นไอออนแม่ที่ถูกคัดเลือกที่ Q1 ผ่านไปยัง MS ช่วงที่ 2 (Q2) ไอออนแม่ที่ได้เกิดการชนด้วยแก๊ส (CID) เกิดเป็นไอออนผลิตภัณฑ์ขึ้นและถูกคัดเลือกมวลที่ MS ส่วนที่ 3 (Q3) การแตกย่อยไอออนหลักของอะคริลาไมด์ คือ acryloyl cation $[\text{CH}_2=\text{CHC}=\text{O}]^+$ m/z 55 ซึ่งเกิดจากสูญเสียมอนิเอทิล และ $[\text{CONH}_2]^+$ m/z 44 เกิดจากสูญเสียมอนิเอทิล ส่วน $^2\text{d}_3$ -อะคริลาไมด์ คือ $[\text{D}_3\text{H}_3\text{O}]^+$ m/z 58 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมที่ได้จากการตรวจติดตามการทรานสิชันของไอออนแบบติดตามหลายปฏิกิริยา (MRM) ของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ ที่มี $^2\text{d}_3$ -อะคริลาไมด์ เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด วิธีการระเหยไอโซครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้คอลัมน์ในการแยก 2 ชนิด คือ Atlantis dC18 อนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.1 ก) และคอลัมน์

Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.1 ข) สำหรับการคำนวณหาปริมาณอะคริลาไมด์ เลือกการทรานสิชันของไอออน m/z 72/55 (อะคริลาไมด์) และ m/z 75/58 (อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) เนื่องจากมี intensity สูง ส่วนการทรานสิชันอื่นๆ นั้นใช้สำหรับการยืนยันสารอะคริลาไมด์ในบางกรณี



รูปที่ 4.1 MRM โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์เข้มข้น 10 $\mu\text{g/l}$ (m/z 72/44, 72/55 และ 72/72) ที่มี d_3 -อะคริลาไมด์เข้มข้น 40 $\mu\text{g/l}$ (m/z 75/58) (ก) คอลัมน์ Atlantis dC18 5 μm 2.1 x 150 mm. (ข) คอลัมน์ Luna Su C18 100 \AA 2.00 x 250 mm.

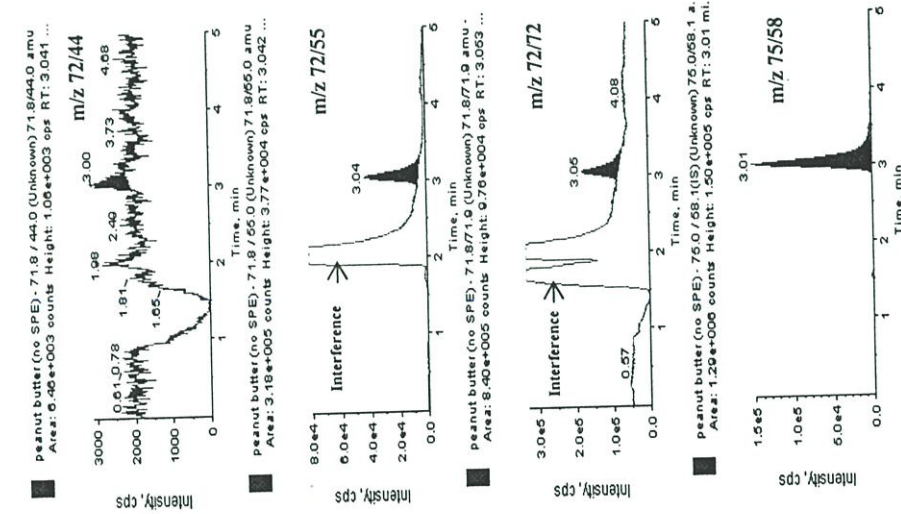
4.1.1 ผลการศึกษาการแยกสิ่งรบกวน (interference) ในสารละลายตัวอย่างออกจากสารที่สนใจเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS

เมื่อสกัดสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างด้วยน้ำ และทำให้สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II และตรวจวิเคราะห์ LC-ESI-MS/MS เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ Atlantis dC18 อนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร วิธีการระบบไอโซครอติกเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที อะคริลาไมด์จะถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 3.0 นาที และสิ่งรบกวนเป็นพีกที่มีขนาดใหญ่จะถูกชะออกมาก่อนอะคริลาไมด์เล็กน้อย จึงทำให้ baseline สูงขึ้นและรบกวนสัญญาณของพีกอะคริลาไมด์ (รูปที่ 4.2 ก m/z 72/55) ซึ่งสิ่งรบกวนหรือตัวชะร่วม (co-elution) นี้มาจากขั้นตอนการสกัด เป็นผลให้สัญญาณที่ได้ผิดพลาด (false signals) ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ไม่ถูกต้อง

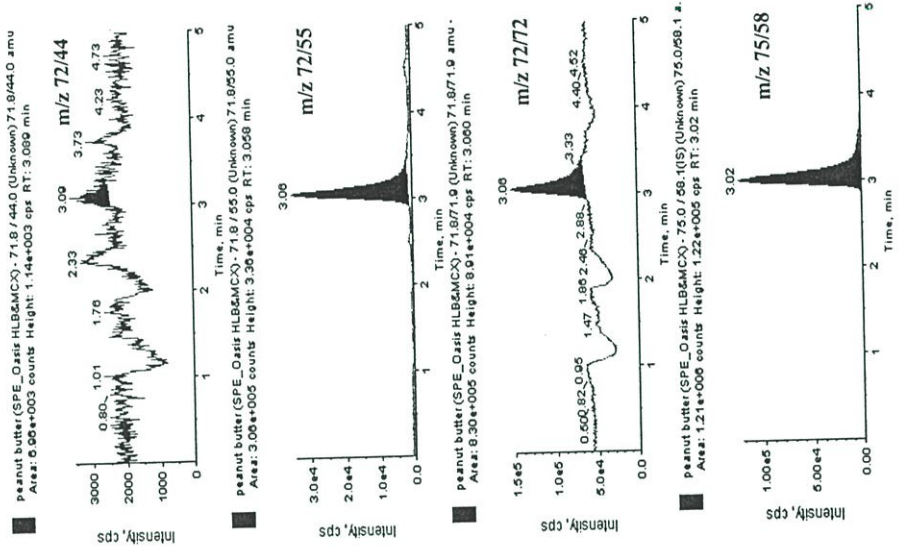
งานวิจัยของ Senyuva H.Z. และ Gokmen V. [17] มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งปนเปื้อนหลักและระบุว่าสารนี้ คือ สารวาตินซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งและทดลองกำจัดสิ่งรบกวน 2 วิธี คือ วิธีแรกโดยการตั้ง delay time ที่เครื่องมือ โดยจะปล่อยสารละลายที่ชะได้ในช่วงแรกทิ้งจนใกล้เวลาที่สารอะคริลาไมด์จะถูกชะออกมาจึงเปลี่ยนกลับมาเริ่มทำงาน ซึ่งจะป้องกันการปนเปื้อนในแมสสเปกโตรมิเตอร์ วิธีที่ 2 คือ การทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดแบบเฟสของแข็งชนิด Oasis MCX งานวิจัยของ Michael S. Young และคณะ [44] วิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากมันฝรั่ง ตัวทำละลายที่ใช้สกัดคือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และทำสารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแบบเฟสของแข็ง 2 ชนิด คือ Oasis HLB และ Oasis MCX นอกจากนี้ยังมีการใช้การสกัดแบบเฟสของแข็งที่มีสมบัติทางเคมีแตกต่างกัน อีกหลายชนิด เช่น graphitized carbon, ion-exchanger, mixed material [16] สำหรับงานวิจัยนี้ตอนแรกผู้วิจัยได้ทดลองเลือกใช้ Oasis HLB และ Oasis MCX ในการทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ แยกด้วยคอลัมน์ Atlantis dC18 อนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร เมื่อพิจารณาที่ m/z 72/55 พบว่าพีกของสิ่งรบกวนที่ถูกชะที่เวลาประมาณ 2.0 นาทีนั้นจะถูกกำจัดออกไป (รูปที่ 4.2 ข) ซึ่งเฟสของแข็งชนิด Oasis HLB ประกอบด้วยส่วนมีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (nonpolar) คือ poly(divenylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) สามารถดูดซับทั้งสารมีขั้วและไม่มีขั้วพร้อมๆกัน โดยส่วนที่ชอบน้ำจะหน่วงอยู่กับ N-vinylpyrrolidone และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะหน่วงอยู่กับ m-divenylbenzene สารอะคริลาไมด์จะถูกหน่วงไว้ในตัวดูดซับของเฟสของแข็ง Oasis HLB และสามารถชะออกมาด้วยน้ำ ส่วนเฟสของแข็งชนิด Oasis MCX เป็นประเภท mixed mode ion-exchange ประกอบด้วยกลุ่ม sulfonic acid ($-SO_3H$) อยู่บนผิวหน้าของดูดซับ poly(divenylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) ซึ่งเป็นวัสดุชนิดเดียวกันกับ Oasis HLB สามารถแลกเปลี่ยนไอออนบวกได้ดี (strong cation exchange) เป็นที่ทราบกันดีว่ากรดอะมิโนเป็นได้ทั้งประจุบวกและลบเพราะมี

คุณสมบัติเป็น amphoteric ดังนั้นกรดอะมิโนวาตินที่เป็นสารรบกวนหลักนั้นจะถูกหน่วงไว้ในเฟสของแข็ง จึงทำให้สารรบกวนลดลงเมื่อใช้เฟสของแข็งชนิด Oasis MCX

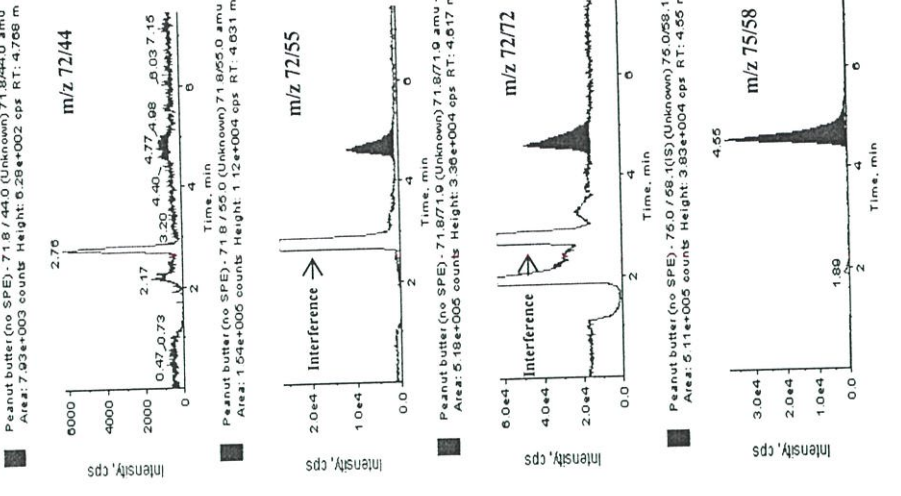
สำหรับงานประจำของห้องปฏิบัติการนั้นการใช้การสกัดแบบเฟสของแข็งจะทำให้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เป้าหมายหลักของการปรับปรุงโครมาโทแกรมก็คือต้องการแยกพีคสิ่งรบกวนออกจากสารที่สนใจ ซึ่งสามารถปฏิบัติได้ง่ายโดยอาศัยเทคนิคการแยกด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟของเหลว การเพิ่มความยาวของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกเพื่อยืดเวลาให้สารอะคริลาไมด์ถูกหน่วงไว้ในคอลัมน์นานขึ้น ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ศึกษา คือ คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร และคอลัมน์เดิมที่ใช้ คือ คอลัมน์ Atlantis dC18 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร โดยใช้สภาวะการแยกแบบเดิม โครมาโทแกรมที่ได้ดังรูปที่ 4.2 (ค และ ก) เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากการแยกด้วย 2 คอลัมน์ พบว่าคอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร สามารถแยกพีคของอะคริลาไมด์จากพีคของสิ่งรบกวนได้อย่างชัดเจน โดยไม่ต้องใช้การสกัดแบบเฟสของแข็ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือก คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร ในการแยกอะคริลาไมด์จากสิ่งรบกวน วิธีการชะแบบไอโซเครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสารอะคริลาไมด์จะถูกชะที่เวลา 4.5 ± 0.2 นาที อัตราส่วนความไม่สมมาตรของพีค (tailing factor) ประมาณ 1.3 ส่วนพีครบกวนจะถูกชะที่เวลาประมาณ 2.7 นาที ซึ่งสามารถแยกจากพีคของอะคริลาไมด์



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.2 MRM โครมาโทแกรม ของสารละลายตัวอย่าง SRM2387 peanut butter สกัดด้วยน้ำ (ก) คอลัมน์ Atlantis dC18 5 μ m 2.1 x 150 mm. (ไม่ใช่ SPE)
 (ข) คอลัมน์ Luna Su C18 100 °A 2.00 x 250 mm (ไม่ใช่ SPE)

4.1.2 ผลการศึกษาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารอะคริลาไมด์ในอาหารเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-ESI-MS/MS

สารอะคริลาไมด์ละลายน้ำได้ดีและละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อย ดังนั้นการวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในอาหารจึงนิยมใช้สกัดด้วยน้ำ แต่ข้อเสียก็คือ สารสกัดร่วมอื่นๆที่ไม่ต้องการ (co-extractive) จะออกมาด้วย เช่น เกลือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ทำให้มีผลต่อการตรวจวัดและระบบการแยกเชื่อมจึงจำเป็นต้องทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ก่อนตรวจวัด บางห้องปฏิบัติการมีขั้นตอนการกำจัดไขมัน (defatting step) จากอาหารก่อนที่จะเริ่มขั้นตอนการสกัด ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เช่น เฮกเซน ทูโลอิน เอทิลอะซิเตต หรือ ไชโคลเฮกเซน ข้อดีของการกำจัดไขมันก็คือจะช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์และป้องกันการอุดตันของเฟสของแข็ง (SPE) ไม่ได้มีผลทำประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น [56] ตัวทำละลายชนิดอื่นๆที่ใช้สกัด เช่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ [22, 23, 44, 51] สารละลายกรดฟอร์มิก [29] สารละลายกรดอะซิติก [17] เมทานอล [27] และสารละลายผสมของน้ำและไดคลอโรมีเทน [31]

การสกัดด้วยน้ำทำให้มีตัวชะร่วม ดังนั้นการวิเคราะห์อะคริลาไมด์ส่วนใหญ่จะกำจัดโปรตีนด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II และการสกัดแบบเฟสของแข็ง ก่อนตรวจวัดด้วย LC-MS และข้อเสียอีกอย่างหนึ่งที่พบคือ การใช้น้ำสกัดอาหารประเภทที่มีปริมาณแป้งมาก เช่น มันฝรั่ง พบว่าสารละลายตัวอย่างที่ได้มีลักษณะหนืดเนื่องจากน้ำจะละลายแป้งออกมาด้วย ซึ่งจะทำให้การแยกหรือกรองด้วยเมมเบรนก่อนตรวจวิเคราะห์นั้นค่อนข้างยาก จากคุณสมบัติของเมทานอลไม่สามารถสกัดโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เช่น แป้งและเพคตินที่มักมีในอาหารจำพวกพืช จึงทำให้สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้นั้นจะใสมากกว่าการใช้น้ำสกัด แต่เมทานอลละลายอะคริลาไมด์ต่ำ (1,150 กรัมต่อลิตร) เมื่อเทียบกับน้ำ (2,155 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นการใช้ละลายผสมของเมทานอลและน้ำช่วยลดปัญหาในการสกัดอาหารที่มีปริมาณแป้งมากและมีประสิทธิภาพการสกัดดีกว่าจะใช้เมทานอลอย่างเดียวในการสกัด

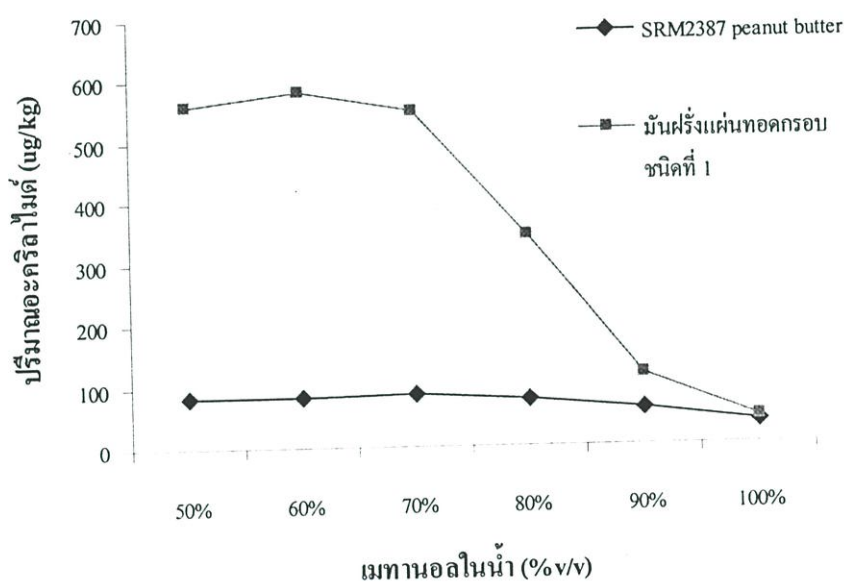
4.1.2.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วนต่างๆในการสกัดตัวอย่าง 2 ชนิด คือ SRM2387 peanut butter ซึ่งระบุปริมาณอะคริลาไมด์ 87.0 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ชนิดที่ 1 สกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 % โดยปริมาตร น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เวลาเขย่า 20 นาที จำนวน 2 ชั่วโมง ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.1 เมื่อสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 50-70% โดยปริมาตร พบว่าปริมาณสารอะคริลาไมด์ใน SRM2387 peanut butter มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 81.2-86.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจะมีค่าของอะคริลาไมด์อยู่ในช่วงที่ระบุในใบรับรอง (79.2-94.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ชนิดที่ 1 เมื่อสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 50-70% โดยปริมาตร พบว่าปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้นั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายผสมของเมทานอลกับน้ำ

ที่อัตราส่วนต่างๆที่ใช้ในการสกัดกับปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้ (รูป 4.3) พบว่าประสิทธิภาพการสกัดของทั้งสองตัวอย่างที่ศึกษานั้นเป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือ เมื่อสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 50-70% โดยปริมาตร ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันแต่ปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้จะเริ่มลดลงเรื่อยๆเมื่อปริมาณเมทานอลเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.1 แสดงผลสกัดของตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของเมทานอลในน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ ในตัวอย่าง SRM2387 peanut butter และมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1

เมทานอลในน้ำ (% v/v)	ปริมาณสารอะคริลาไมด์เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
	SRM2387 peanut butter (79.2 - 94.8 µg/kg)	มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ชนิดที่ 1
50 %	81.2	560
60 %	82.2	582
70 %	86.4	550
80 %	75.9	343
90%	58.2	114
100 %	35.1	43.3

หมายเหตุ น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาตรตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร และจำนวน 2 ซ้ำ



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำที่อัตราส่วนต่างๆในตัวอย่าง SRM2387 peanut butter และมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1

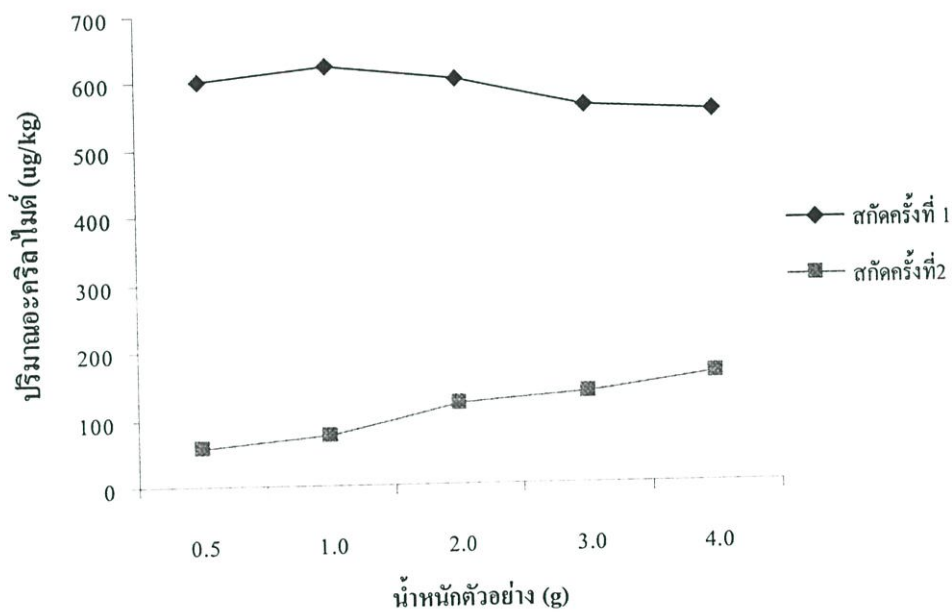
ผลจากการศึกษานานวิชัยนี้เลือกสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด เนื่องจากต้องการให้มีส่วนผสมของน้ำน้อยที่สุดแต่ยังคงประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีไว้ เป็นการรวมข้อดีในการสกัดของเมทานอลกับน้ำ การที่มีส่วนผสมของเมทานอลในปริมาณมากนั้นสามารถทำให้แห้งได้ง่ายด้วยแก๊สไนโตรเจนเมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเป็นน้ำ โดยปกติเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่ได้หลังจากปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วแล้วจะมีทั้งหมด 3 ชั้น คือ ชั้นของแข็งของชิ้นส่วนอาหารที่รวมตัวอยู่ด้านล่าง ชั้นต่อมาเป็นส่วนสารละลายตัวอย่างที่ใส และชั้นบนเป็นชั้นไขมัน เมื่อต้องการนำสารละลายส่วนใสมาใช้ในขั้นตอนต่อไปต้องระวังชั้นของไขมันที่อาจจะติดมาด้วย แต่เมื่อใช้สารละลายผสมเมทานอลในน้ำในการสกัดคือ ชั้นไขมันในสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดจะอยู่ด้านล่างทั้งนี้เนื่องจากความหนาแน่นของสารละลายผสมเมทานอลในน้ำน้อยกว่าไขมัน ทำให้สามารถนำสารละลายส่วนใสออกมาได้ง่ายขึ้น เมื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาช่วงน้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัดต่อไป

4.1.2.2 ผลการศึกษาน้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสม ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ศึกษา คือ ฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ชนิดที่ 1 ช่วงน้ำหนักที่ศึกษา คือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 กรัม สกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัดจำนวน 10 มิลลิลิตร เวลาเขย่า 20 นาที จำนวน 2 ชั่วโมง หลังจากสกัดครั้งแรกแล้วจะทำการสกัดซ้ำอีกครั้งเพื่อดูปริมาณอะคริลาไมด์ที่เหลือจากการสกัดครั้งแรก รวมปริมาณอะคริลาไมด์ของการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 เป็นปริมาณที่สกัดได้ทั้งหมด ดังตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบการสกัดครั้งที่ 1 เมื่อคิดเทียบกับปริมาณที่สกัดได้ทั้งหมดมีค่าตั้งแต่ร้อยละ 77.2-91.2 จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอะคริลาไมด์ของการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ในตัวอย่างฝรั่งแผ่นทอดกรอบ ชนิดที่ 1 ที่น้ำหนักต่างๆ (รูปที่ 4.4) พบว่าที่ปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้ครั้งที่ 1 ที่น้ำหนักตัวอย่างตั้งแต่ 2.0 กรัมขึ้นไป จะเริ่มมีปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้ลดลงเรื่อยๆ ส่วนปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้ครั้งที่ 2 ก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงว่ามีปริมาณอะคริลาไมด์ที่เหลือในตัวอย่างหลังจากการสกัดครั้งที่ 1 มากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกน้ำหนักที่ประมาณ 0.5 - 1 กรัม เป็นช่วงน้ำหนักที่เหมาะสมในการสกัด

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของน้ำหนักตัวอย่างที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การสกัดในตัวอย่าง
มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			เปอร์เซ็นต์การสกัด ครั้งที่ 1 เทียบกับ ปริมาณอะคริลาไมด์ ที่สกัดได้ทั้งหมด (%)
	สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	รวมทั้งหมด	
0.5	600	58.0	658	91.2
1.0	622	75.7	698	89.1
2.0	600	119	719	83.4
3.0	560	136	696	80.5
4.0	549	162	711	77.2

หมายเหตุ สกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70% โดยปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เวลาแช่ 20 นาที
จำนวน 2 ซ้ำ



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารอะคริลาไมด์ของการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2
ในตัวอย่างมันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 1 ที่น้ำหนักต่างๆ

4.1.2.3 ผลการศึกษาสถานะอื่นๆในการสกัดเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การสกัดครั้งที่ 1 ทดลองเติมกรดอะซิติกและกรดฟอรั่มิกในสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด และใช้ตัวทำละลายเดิมในการสกัด คือ สารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร แต่ทดลองเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและเพิ่มเวลาในการสกัด จากตารางที่ 4.3 พบว่าเปอร์เซ็นต์การสกัดครั้งที่ 1 ที่สถานะต่างๆกันพบว่ามีค่าตั้งแต่ร้อยละ 85.6 -91.2 เมื่อเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายและเวลาการเขย่าพร้อมกันนั้นพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสกัดครั้งที่ 1 สูงสุดประมาณร้อยละ 91 เมื่อเทียบกับสถานะอื่นๆแล้วจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยซึ่งแตกต่างสูงสุดประมาณร้อยละ 6 การเติมกรดนั้นไม่ได้ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การสกัดอย่างเห็นได้ชัด เคยมีรายงานการทดลองสกัดอะคริลาไมด์ในตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ 0.1% ของกรดฟอรั่มิกในน้ำ 0.5 % ของกรดฟอรั่มิกในเมทานอล และ 5 มิลลิโมลาร์ของกรดเฮปตะฟลูออโรบิวทาโนอิกในน้ำ (heptafluorobutanoic acid in water) พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน [25] งานวิจัยของ S. Eriksson และ P. Karlsson [58] สกัดสารอะคริลาไมด์ที่ pH ต่างกัน ตั้งแต่ 2 -7.5 ให้ผลการสกัดไม่แตกต่างกับการใช้น้ำสกัด ส่วนการเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายนั้นจะมีผลต่อความไวของขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ทำให้มีค่าสูงขึ้นเพราะสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะถูกเจือจาง การเพิ่มเวลาการเขย่าถึงแม้จะไม่เห็นผลชัดเจนแต่ในการวิเคราะห์ตัวอย่างหลากหลายชนิดนั้นการเพิ่มเวลาเขย่าของสกัดจาก 20 นาทีเป็น 30 นาทีจะทำให้มั่นใจในผลการสกัดยิ่งขึ้น

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การสกัดสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบชนิดที่ 2 ในสถานะต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	ปริมาตรที่ใช้สกัด (ml)	เวลาเขย่า (นาที)	ปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			เปอร์เซ็นต์การสกัดครั้งที่ 1 เทียบกับปริมาณอะคริลาไมด์ที่สกัดได้ทั้งหมด (%)
			สกัดครั้งที่ 1	สกัดครั้งที่ 2	รวมทั้งหมด	
70%เมทานอลในน้ำ	10	20	464	77.5	542	85.6
0.1 % กรดฟอรั่มิกใน 70%เมทานอลในน้ำ	10	20	517	71.3	588	87.9
0.1 % กรดอะซิติกใน 70%เมทานอลในน้ำ	10	20	512	73.4	585	87.5
70%เมทานอลในน้ำ	15	20	549	65.3	614	89.4
70%เมทานอลในน้ำ	10	30	561	60.8	622	90.2
70%เมทานอลในน้ำ*	15	30	542	51.8	594	91.2

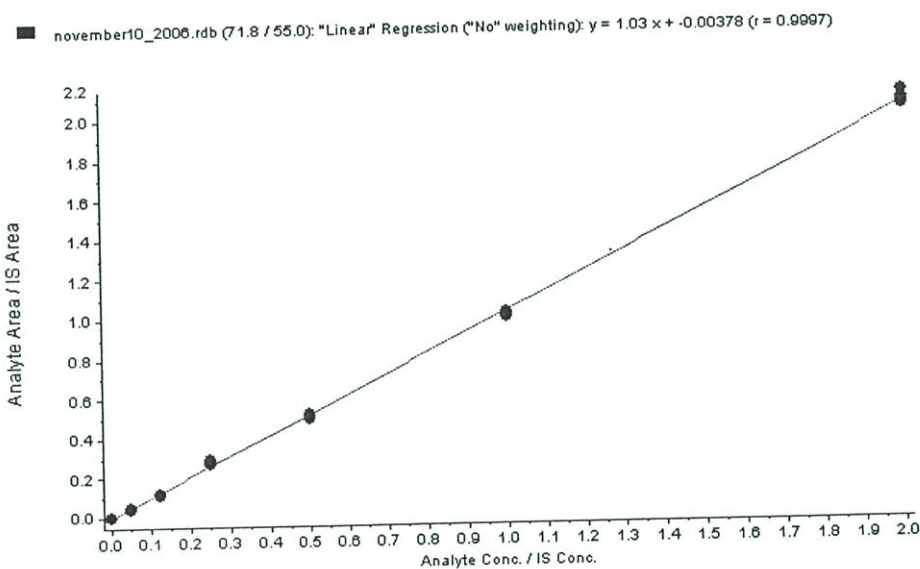
หมายเหตุ น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม และจำนวน 3 ซ้ำ (*จำนวน 6 ซ้ำ)

ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกสถานะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดอะคริลาไมด์ในอาหาร คือ น้ำหนักตัวอย่างประมาณ 0.5 - 1 กรัม สารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัด ปริมาตรที่ใช้จำนวน 10 มิลลิลิตรและเวลาในการเขย่า 30 นาที

4.2 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

4.2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

นำสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่มีสารละลายมาตรฐาน 2d_3 -อะคริลาไมด์ เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตรเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ที่ได้พีคสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (แกน y) และอัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (แกน x) ซึ่งการคำนวณนี้ได้จากเครื่องมือ ซอฟต์แวร์ Analyst 1.4.2 ได้กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.5) สมการที่ได้จาก $y = 1.03x - 0.00378$ ความชันเท่ากับ 1.03 จุดตัดแกน y เท่ากับ -0.00378 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งเข้าใกล้ 1 และอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (มากกว่า 0.995) แสดงว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรง และทำ residual plot เพื่อยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้น ซึ่ง residual plot พบกระจายตัวของ y-residual อยู่รอบค่า 0 (ภาคผนวก ก.) ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์จะเตรียมสารละลายมาตรฐานและสร้างกราฟมาตรฐานใหม่ทุกครั้งพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.999



รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ (m/z 72/55) ความเข้มข้น 0-80 $\mu\text{g/l}$ ที่มี 2d_3 -อะคริลาไมด์ (m/z 75/58) เข้มข้น 40 $\mu\text{g/l}$ เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

4.2.2 ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดการวิเคราะห์

ปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

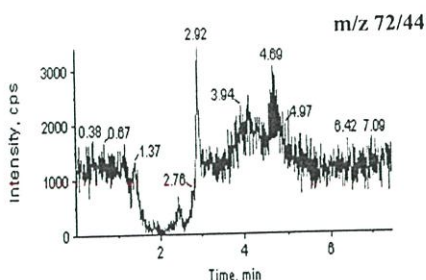
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์ ปริมาณ (LOQ) ของวิธีตรวจวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในอาหารด้วย LC-ESI-MS/MS ที่ได้พัฒนาขึ้น จากการตรวจวิเคราะห์สารอะคริลาไมด์ใน sample blank ซึ่งเป็นตัวแทนของเมทริกซ์ต่างๆ ในอาหาร ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ถั่ว ถั่วลิสง ขนมนึ่งและกาแฟ โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างปฏิบัติ ตามข้อ 3.4 สำหรับตัวอย่างกาแฟนั้นต้องเพิ่มขั้นตอนด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง ชนิด Oasis MCX ในการเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากมีตัวชะร่วมนที่รบกวนสัญญาณของอะคริลาไมด์ที่ไม่สามารถ แยกได้ จึงต้องกำจัดออกด้วยการสกัดแบบเฟสของแข็ง แต่ละเมทริกซ์นั้นทำการวิเคราะห์ 7- 10 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละเมทริกซ์ ค่าขีดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ ค่าเฉลี่ย ± 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ของแต่ละเมทริกซ์) ค่าขีดจำกัดการตรวจพบของทุก เมทริกซ์ที่กล่าวมาข้างต้นอยู่ในช่วง 1.27 -13.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนขีดจำกัดการวิเคราะห์ ปริมาณได้จากการวิเคราะห์ sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้น ระดับต่ำสุดที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งทุกเมทริกซ์ที่กล่าวข้างต้นมีค่า ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้นถั่วที่มีขีดจำกัดการ วิเคราะห์ปริมาณที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยร้อยละ 85.0- 101.3 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 5.2 -10.9 (ตารางที่ 4.5) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ตารางที่ 4.4 แสดงขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของการวิเคราะห์อะคริลาไมด์ในอาหาร (เมทริกซ์ต่างๆ)

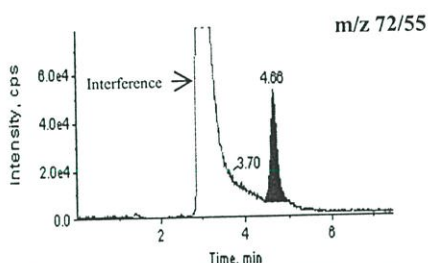
ชนิดเมทริกซ์	อะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
	LOD	LOQ
ข้าว	7.76	20.0
ข้าวโพด	7.61	20.0
มันฝรั่ง	6.58	20.0
ถั่ว	13.6	30.0
ผลไม้	1.27	20.0
ขนมนึ่ง	5.81	20.0
กาแฟ*	6.96	20.0

* เพิ่มการทำสารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยเฟสของแข็ง Oasis MCX ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

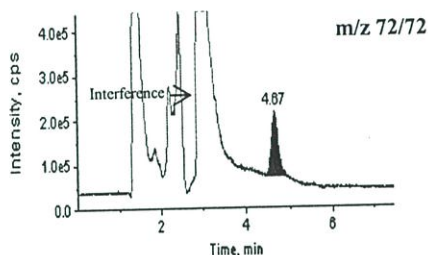
coffee + std 400 ng no. 1 - 71.8 / 44.0 (Unknown) 71.8444.0 amu - sam
Area: 6.89e+003 counts Height: 1.32e+003 cps RT: 4.694 min



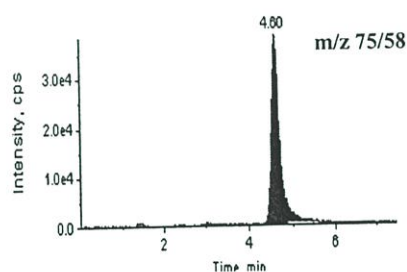
coffee + std 400 ng no. 1 - 71.8 / 55.0 (Unknown) 71.855.0 amu - sam
Area: 5.01e+005 counts Height: 4.67e+004 cps RT: 4.659 min



coffee + std 400 ng no. 1 - 71.8 / 71.9 (Unknown) 71.871.9 amu - samp
Area: 1.59e+006 counts Height: 1.45e+005 cps RT: 4.666 min

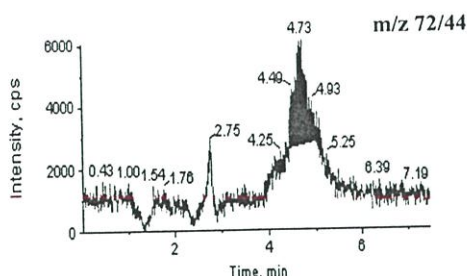


coffee + std 400 ng no. 1 - 75.0 / 58.1(S) (Unknown) 75.058.1 amu - .
Area: 5.10e+005 counts Height: 3.84e+004 cps RT: 4.60 min

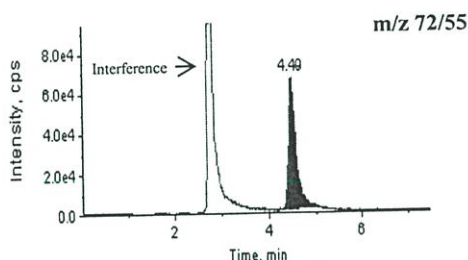


(ก)

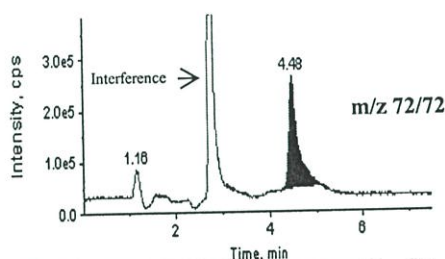
coffee + std 400 ng no. 1 (SPE_MCX) - 71.8 / 44.0 (Unknown) 71.844.
Area: 5.47e+004 counts Height: 3.38e+003 cps RT: 4.728 min



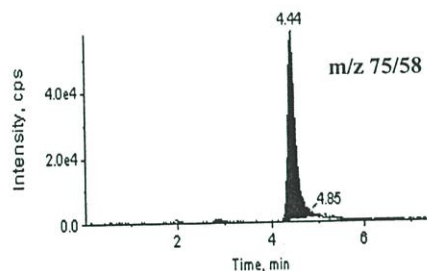
coffee + std 400 ng no. 1 (SPE_MCX) - 71.8 / 55.0 (Unknown) 71.855..
Area: 7.74e+005 counts Height: 6.56e+004 cps RT: 4.491 min



coffee + std 400 ng no. 1 (SPE_MCX) - 71.8 / 71.9 (Unknown) 71.871..
Area: 3.05e+006 counts Height: 2.18e+005 cps RT: 4.494 min



coffee + std 400 ng no. 1 (SPE_MCX) - 75.0 / 58.1(S) (Unknown) 75..
Area: 6.77e+005 counts Height: 5.76e+004 cps RT: 4.44 min



(ข)

รูปที่ 4.6 MRM โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างเมล็ดกาแฟ ที่เติมสารละลายมาตรฐาน อะคริลามิค 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ก) ไม่ใช่ SPE ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (ข) ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วย SPE Oasis MCX

การทำให้สารละลายตัวอย่างบริสุทธิ์ด้วยสกัดแบบเฟสของแข็ง ชนิด Oasis MCX เพียงชนิดเดียวก็เพียงพอในการกำจัดสิ่งรบกวน ตัวอย่างเช่นการตรวจวิเคราะห์กาแฟซึ่งมีเมทริกซ์ที่ซับซ้อน เมื่อตรวจวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วย LC-ESI MS/MS พบว่าพีครบกวนจะทำให้ baseline สูงขึ้น และรบกวนพีคของอะคริลาไมด์ (รูปที่ 4.5 ก m/z 72/55) และเมื่อเพิ่มขึ้นตอนการสกัดแบบเฟสของแข็ง พบว่าขนาดของพีครบกวนลดลง (รูปที่ 4.5 ข m/z 72/55) นอกจากนั้นยังทดลองศึกษาการใช้เฟสของแข็ง Oasis MCX กับตัวอย่าง SRM2387 peanut butter (ตารางที่ 4.6) พบปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย 93.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ระบุในใบรับรอง (79.2-94.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ส่วนเฟสของแข็งชนิด Oasis HLB นั้นมีประโยชน์คือช่วยกำจัดไขมันและยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์นานขึ้น ไม่ได้ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการแยก ในขั้นตอนการทดลองเมื่อสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของเมทานอลในน้ำนั้น สารละลายตัวอย่างที่ได้จะใสและไขมันจะอยู่ข้างล่างเนื่องจากมีความหนาแน่นมากกว่าสารละลายผสมของเมทานอลในน้ำ ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของไขมันในสารละลายตัวอย่างได้ส่วนหนึ่ง จึงไม่จำเป็นต้องใช้เฟสของแข็งชนิด Oasis HLB

4.2.3 ความเที่ยง (Precision) และ ความแม่นยำ (Accuracy)

การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (20 และ 30) , 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในเมทริกซ์ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด คือ ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ถั่ว ผลไม้ ขนมปิ้ง และกาแฟ โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อ 3.4 ผลดังตารางที่ 4.5 พบว่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยร้อยละ 85.0 -106.1 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 1.9-10.9 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

จากการทดลองวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ของตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter ผลดังตารางที่ 4.6 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 10 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความทวนซ้ำได้ (repeatability) และ การทำซ้ำได้ (reproducibility) ดี ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนั้นการประเมินความถูกต้อง (trueness) ของตัวอย่าง SRM2387 peanut butter (ภาคผนวก ข.) เมื่อวิเคราะห์ 7 ซ้ำภายในวันเดียวกันนั้น พบว่าไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval, CI) ของปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย เท่ากับ 83.7 ± 3.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ใบรับรองระบุ คือ 79.2 - 94.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้มีความแม่นยำ

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ
ของแต่ละเมทริกซ์

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณอะคริลาไมด์ที่เติม ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ปริมาณอะคริลาไมด์ที่ ตรวจพบเฉลี่ย \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD, (%)	เปอร์เซ็นต์คืนกลับ เฉลี่ย (%)	จำนวนซ้ำ (n)
ข้าว	0	2.93 \pm 1.61			10
	20*	19.5 \pm 2.0	10.3	98.2	8
	400	378 \pm 14	3.7	96.6	10
	800	761 \pm 20	2.6	97.7	10
ข้าวโพด	0	1.97 \pm 1.88			10
	20*	20.9 \pm 1.8	8.6	97.6	7
	400	376 \pm 11	2.9	95.8	10
	800	740 \pm 33	4.5	97.2	10
มันฝรั่ง	0	1.63 \pm 1.65			9
	20*	18.3 \pm 2.0	10.9	86.4	7
	400	368 \pm 20	5.4	95.7	10
	800	748 \pm 15	2.0	96.8	10
ถั่ว	0	5.85 \pm 2.59			10
	30*	36.6 \pm 1.9	5.2	101.3	8
	400	382 \pm 33	8.6	98.5	10
	800	790 \pm 39	4.9	102.9	10
ผลไม้ (กล้วย)	0	0.16 \pm 0.37			10
	20*	17.1 \pm 1.4	8.2	87.7	10
	400	389 \pm 17	4.5	102.4	10
	800	780 \pm 30	3.8	101.9	10
ขนมปัง	0	2.30 \pm 1.17			10
	20*	17.2 \pm 1.4	8.1	86.9	9
	400	393 \pm 13	3.3	101.6	10
	800	799 \pm 32	4.0	103.6	10
เมล็ดกาแฟ**	0	1.71 \pm 1.75			7
	20*	18.6 \pm 1.9	10.2	85.0	7
	400	416 \pm 10	2.4	104.4	7
	800	845 \pm 16	1.9	106.1	7

* ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

** เพิ่มการทำสารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยการสกัดแบบเฟสของแข็ง Oasis MCX ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ตารางที่ 4.6 แสดงความทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยวิเคราะห์ภายในวันเดียว (intra-day) และการทำซ้ำได้ (reproducibility) โดยวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day) ในตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter

จำนวนซ้ำ (n)	ปริมาณอะคริลาไมด์ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		ค่าเฉลี่ย \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Repeatability RSD _r (%)
	SRM2387 peanut butter			
วันที่ 1	7	91.4, 79.5, 81.6, 83.7, 82.3, 85.9, 81.5	83.7 \pm 3.9	4.7
วันที่ 2	3	88.2, 94.1, 90.7	91.0 \pm 3.0	3.3
วันที่ 3	3	90.7, 92.0, 93.1	91.9 \pm 1.2	1.3
วันที่ 4*	3	94.3, 90.6, 94.4	93.1 \pm 2.2	2.4
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		88.4 \pm 5.2		
Reproducibility RSD _R (%)		5.9		

* เพิ่มการทำสารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยเฟสของแข็ง Oasis MCX ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

จากการทดลองศึกษาการสูญเสียอะคริลาไมด์เมื่อเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยใช้สารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ให้มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่มี $^2\text{d}_3$ -อะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดและไม่มีอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (ภาคผนวก ฉ.) พบว่าเมื่อไม่มีอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดนั้นมีเปอร์เซ็นต์คืนกลับได้เพียงร้อยละ 73.1 แต่เมื่อมีการใช้ $^2\text{d}_3$ -อะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดพบว่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับได้สูงร้อยละ 100 ดังนั้นการใช้สารสนใจที่เจือไอโซโทปเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดในการตรวจวิเคราะห์นั้นช่วยแก้ไขความผิดพลาดของระบบ (systematic error) ทำให้ผลวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องมากขึ้น

4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร

ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารของประเทศไทยนั้นยังไม่มีกรายงานมาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ตรวจวิเคราะห์อาหารประเภทต่างๆ ที่สงสัยจะมีการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด 161 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งตามชนิดของผลิตภัณฑ์อาหาร 8 ประเภท ดังตารางที่ 4.7 ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนั้นอยู่ในช่วง ไม่พบ จนถึง 3,466 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ขนมขบเคี้ยวหรืออบกรอบบรรจุของ จำนวน 57 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนอะคริลาไมด์ระหว่าง ไม่พบ จนถึง 3,466 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แบ่งย่อยเป็น 5 ประเภทตามวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ผลิต คือ ประเภทข้าวและแป้งที่ทำจากข้าวต่างๆ เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ประเภทข้าวโพดและแป้ง

และบริเวณใกล้เคียงเป็นหลัก เมื่อเปรียบเทียบผิวหนังของผลิตภัณฑ์กับน้ำหนักแล้ว ถ้าผิวหนังมากกว่าน้ำหนักของผลิตภัณฑ์มากๆ ทำให้มีโอกาสพบอะคริลาไมด์มากขึ้นด้วย

กาแฟสำเร็จรูป จำนวน 3 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนอะคริลาไมด์ตั้งแต่ 37.2- 409 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่ามัธยฐาน 404 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อะคริลาไมด์ในกาแฟนั้นเกิดขึ้นในกระบวนการคั่วและจะลดลงตามระยะเวลาเก็บแ่จะบรรจุในภาชนะปิด [59]

ตารางที่ 4.7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหาร

ชนิดของผลิตภัณฑ์อาหาร	จำนวน ตัวอย่าง	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
		ต่ำสุด-สูงสุด	ค่ามัธยฐาน
1. ขนมขบเคี้ยวหรืออบกรอบบรรจุซอง			
- ประเภทข้าวและแป้งที่ทำจากข้าวต่างๆ	14	ไม่พบ-761	67.1
- ประเภทข้าวโพด แป้งข้าวโพด	17	ไม่พบ-488	57.2
- ประเภทมันฝรั่ง แป้งมันฝรั่ง	9	528-3,466	1,336
- ประเภทมันชนิดอื่น เช่น มันเทศ เผือก แป้งมันสำปะหลัง	4	60.9 -363	82.0
- ประเภทถั่วและเมล็ดพืช	13	ไม่พบ -141	43.0
2.ขนมหรือของว่างไทย			
- ผลิตภัณฑ์จากข้าวและแป้งที่ทำจากข้าวต่างๆ	32	น้อยกว่า 20.0 -347	42.5
- ผลิตภัณฑ์จากมัน เผือก	8	24.8-496	63.4
- ผลิตภัณฑ์จากถั่ว	8	น้อยกว่า 30.0 -56.0	34.2
3. ขนมปังกรอบ บิสกิต แครกเกอร์ คุกกี้ เวเฟอร์	24	ไม่พบ -486	50.4
4. เฟรนฟรายด์	2	220-482	351
5. คุกกี้ช็อกโกแลต	3	28.6-154	44.6
6. บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป	6	103-203	152
7. ผักและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน (ทอด กวน อบ ตากแห้ง)	18	ไม่พบ-628	น้อยกว่า 20.0
8. กาแฟสำเร็จรูป	3	37.2 – 409	404

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร โดยใช้วิธีเจือจางไอโซโทปและตรวจวัดด้วย LC-ESI-MS/MS นี้มีความแม่นยำและเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ การใช้สารที่สนใจเจือจางไอโซโทป (2d_3 -อะคริลาไมด์) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ทำให้ช่วยแก้ไขความผิดพลาดของระบบ (systematic error) ที่อาจเกิดขึ้นขั้นตอนการสกัดหรือการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ ทำให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องมากขึ้น ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว ปลอดภัยจากสารเคมีที่เป็นอันตราย เพราะไม่ต้องเตรียมสารอนุพันธ์ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้วันละประมาณ 30 ตัวอย่างหรืออาจมากกว่านั้นถ้ามีเครื่องเขย่าและเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่สามารถทำงานได้ครั้งละหลายๆตัวอย่าง และสามารถวิเคราะห์อาหารได้หลากหลายชนิด

การตรวจวิเคราะห์อะคริลาไมด์ด้วย LC-ESI-MS/MS เครื่องวิเคราะห์มวลแบบ triple quadrupole ในโหมดประจวบกว โดยตรวจติดตามการทรานสิชันของไอออนแบบตรวจติดตามหลายปฏิกิริยา (MRM) คือ m/z 72/44, 72/55, 72/72 และ 75/58 การคำนวณหาปริมาณอะคริลาไมด์เลือกใช้การทรานสิชันของไอออน m/z 72/55 ของอะคริลาไมด์และ m/z 75/58 ของ 2d_3 -อะคริลาไมด์ (อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) ส่วนการทรานสิชันของไอออนแบบอื่นนั้นใช้สำหรับเพื่อยืนยันในบางกรณี

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดอะคริลาไมด์ในตัวอย่างอาหาร คือ สารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายในการสกัด สามารถสกัดอาหารหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารที่มีปริมาณแป้งสูง ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ 10 มิลลิลิตร น้ำหนักตัวอย่าง 0.5-1 กรัม เวลาเขย่า 30 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย carrez I และ carrez II

สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้สามารถแยกสิ่งรบกวนออกจากสารที่สนใจโดยใช้คอลัมน์ Luna Su C18 ขนาดอนุภาค 100 อังสตรอม ขนาด 2.00 x 250 มิลลิเมตร แทนการสกัดแบบเฟสของแข็งที่มีราคาสูง มีเฉพาะบางตัวอย่างเท่านั้นที่ไม่สามารถแยกพีกรบกวนได้ เช่น กาแฟ หรือมันฝรั่งบางตัวอย่าง จำเป็นต้องใช้การสกัดแบบเฟสแข็งช่วยในการกำจัดสิ่งรบกวนนี้ ซึ่งสกัดแบบเฟสของแข็ง ชนิด Oasis MCX แบบ mixed-mode ion exchange สามารถแลกเปลี่ยนไอออนบวกได้ดี กรดอะมิโนวาเลีนที่เป็นสารรบกวนหลักจะถูกหน่วงไว้ในเฟสของแข็งชนิดนี้ สภาวะการ

แยก คือ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.1 % โดยปริมาตรของกรดอะซิติกในน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 วิธีการชะแบบไอโซครติก อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พัฒนาขึ้นนี้ในอาหารที่มีเมทริกซ์แตกต่างกัน ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ถั่ว ขนมหัง ผลไม้ (กล้วย) กาแฟ เมื่อเติมสารละลายมาตรฐาน อะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้น 20 -800 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีเปอร์เซ็นต์คืนกลับเฉลี่ยอยู่ระหว่างร้อยละ 85.0-106.1 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 11 การวิเคราะห์ตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter พบว่าการทวนซ้ำได้ (repeatability) จากการวิเคราะห์ภายในวันเดียว (intra-day) และการทำซ้ำได้ (reproducibility) จากการวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day) มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 10 และประเมิน trueness พบว่าไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval, CI) ของปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ย เท่ากับ 83.7 ± 3.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ระบุในรับรอง 79.2 – 94.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงและความแม่นยำเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร ค่าขีดจำกัดการตรวจพบของทุกเมทริกซ์ มีค่าน้อยกว่า 14 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณของทุกเมทริกซ์ มีค่าเท่ากับ 20.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้นถั่วมีค่าเท่ากับ 30.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.999 (ที่ระดับความเข้มข้น 2-80 ไมโครกรัมต่อลิตร)

เก็บตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆที่สงสัยจะมีการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนและทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด 161 ตัวอย่าง ปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ในอาหารที่สำรวจนั้นอยู่ในช่วง ไม่พบ (น้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจพบ) จนถึง 3,466 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าขนมขบเคี้ยวหรืออบกรอบบรรจุของที่ผลิตจากมันฝรั่งและแป้งมันฝรั่งมีการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์สูงสุด มีค่ามัธยฐาน เท่ากับ 1,336 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่ผลิตจากวัตถุดิบอื่นนอกจากมันฝรั่งและกาแฟ ได้แก่ ข้าว แป้งสาลี ข้าวโพด แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง เผือก มันเทศ ถั่ว ผักและผลไม้ พบว่ามีค่ามัธยฐาน อยู่ระหว่าง น้อยกว่า 20 – 82.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่าอาหารเหล่านี้มีการปนเปื้อนอะคริลาไมด์น้อยกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากมันฝรั่งประมาณ 16 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพบปริมาณแอสพาราจีนและน้ำตาลรีดิวซิงต่ำ โดยเฉพาะข้าว (rice) พบปริมาณแอสพาราจีนประมาณ 15 -25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนข้าวสาลี (wheat) พบปริมาณแอสพาราจีนประมาณ 75-2,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [59] และจากการสำรวจก็พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากข้าวสาลีจะมีการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์สูงกว่าผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากข้าว นอกจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตแล้วยังสังเกตการปนเปื้อนอะคริลาไมด์ในอาหารได้จากลักษณะภายนอก

เช่น อาหารประเภทแป้งที่ลักษณะแผ่นบาง (พื้นที่ผิวมาก) เมื่อผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้วมีสีน้ำตาลเข้มส่วนใหญ่จะมีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในปริมาณสูง ดังนั้นในกระบวนการให้ความร้อนไม่ควรใช้อุณหภูมิสูงหรือเวลานานเกินไป อาจทำให้ปริมาณการเกิดอะคริลาไมด์ลดลงได้

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนอะคริลาไมด์ในอาหารของงานวิจัยนี้ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางคุ้มครองผู้บริโภคให้ปลอดภัย และสามารถนำไปใช้ประกอบการประเมินการได้สัมผัสอะคริลาไมด์จากการบริโภคอาหารประจำวันและการประเมินความเสี่ยงการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารนี้ของคนไทยได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

การสกัดสารอะคริลาไมด์ในอาหารด้วยสารละลายผสมของเมทานอลและน้ำ นั้นเป็นทางเลือกหนึ่งของตัวทำละลายที่ใช้สกัด ควรศึกษาตัวทำละลายที่เป็นสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) กับน้ำที่ใช้สกัด เช่นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ชนิดอื่นๆ หรืออัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายผสม ถึงแม้ว่าอะคริลาไมด์จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี แต่จะส่วนผสมของน้ำที่ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มขึ้น ข้อดีของการมีตัวทำละลายอินทรีย์ในสารละลายที่ใช้ในการสกัด คือ สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้สามารถระเหยได้ง่าย ทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ซึ่งทำให้ เพิ่มความไว (sensitivity) ของวิธีวิเคราะห์ และวิเคราะห์อาหารที่มีการปนเปื้อนอะคริลาไมด์ในระดับต่ำๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Swedish National Food Administration. Press release from Livsmedelsverket, National Food Administration. “**Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuffs.**” [Online]. Available: http://www.slv.se/templates/SLV_Page.aspx?id=6182. 2002.
- [2] Twaddle N.C., McDaniel L.P., Gamboa da Costa G., Churchwell M.I., Beland F.A. and Doerge D.R. “Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F₁ mice using LC-ES/MS/MS.” **Cancer Letters**. Vol.207, 2004, pp. 9-17.
- [3] อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์. “อะคริลาไมด์ในอาหาร: สองปีหลังค้นพบ.” **ว ุกรรมวิทย พ.** 47(2), 2548. หน้า 139-150.
- [4] Castle L., Campos, M.J. and Gilbert J. “Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry.” **J. Sci. Food Agric**. Vol.54, 1991, pp. 549-555.
- [5] Castle L. “Determination of acrylamide monomer in mushroom grown on polyacrylamide gel.” **J. Sci. Food Agric**. Vol.41, 1993, pp. 1261-1263.
- [6] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. “**IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.**” [Online]. Available: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/volume60.pdf>. 1997.
- [7] Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee On Food Additive and Contaminants. “**Discussion paper on Acrylamide.**” [Online]. Available: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac38/fa38_35c.pdf. 24-28 April 2006.
- [8] Mottram D.S., Wedzicha B.J. and Dodson A.T. “Acrylamide is formed in the Maillard reaction.” **Nature**. Vol.419, 2002 , pp. 448-449.
- [9] Stadler R.H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P.A., Robert M.C. and Riediker S. “Acrylamide form Maillard reaction products.” **Nature**. Vol.419, 2002 , pp. 449-450.
- [10] Yasuhara A., Tanaka Y., Hengel M. and Shibamoto T. and Riediker S. “Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems.” **J. Agric. Food Chem**. Vol. 51, 2003, pp. 3999-4003.

- [11] Rufian-Henares J. A. and Morales F. J. "Determination of acrylamide in potato chip by a reversed-phase LC-MS method based on stable isotope dilution assay." **Food Chemistry**. Vol. 97, 2006, pp. 555-562.
- [12] Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S. and Tornqvist M. "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs." **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, 2002. pp. 4998-5006.
- [13] Ono. H., Chuda Y., Ohnishi-Kameyama M., Yada H., Ishizaka M., Kobayashi H. and Yoshida M. "Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in Processed Japanese foods." **Food Addit. Contam.** Vol.20, 2003. pp. 215-220.
- [14] Jezussek M. and Schieberle P. "A new LC/MS method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2- mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods." **J. Agric. Food Chem.** Vol. 51 (27), 2003. pp. 7866-7871.
- [15] Biedermann M., Biedermann-Brem S., Noti A. and Grob K. "Two GC-MS Method for the Analysis of Acrylamide in Foodstuff." **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**. Vol. 93, 2002. pp. 638-652.
- [16] Castle L. and Eriksson S. "Analytical Method Used to Measure Acrylamide Concentrations in Foods." **Journal of AOAC International**. Vol. 88, No.1, 2005. pp. 274-284.
- [17] Senyuva H. Z. and Gokmen V. "Interference – free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography – mass spectrometry method." **Food Chemistry**. Vol. 97, 2006. pp. 539-545.
- [18] Rosen J. and Hellenas K.E. "Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry." **Analyst**. Vol. 127, 2002. pp. 880-882.
- [19] Riediker S. and Stadler R. H. "Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry." **J. Chromatogr. A**. Vol.1020, 2003. pp. 121-130.
- [20] Andzejewski D., Roach J. A. G., Gay M. L. and Musser S. M. "Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS." **J. Agric. Food Chem.** Vol. 52, 2004. pp. 1996-2002.
- [21] Granby K. and Fagt S. "Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee." **Analytica Chimica Acta**. Vol. 520, 2004. pp. 177-182.

- [22] Jiao J., Zhang Y., Ren Y., Wu X. and Zhang Y. “Development of quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry.” **J. Chromatogr. A.** Vol.1099, 2005. pp. 198-202.
- [23] Zhang Y., Jiao J., Ren Y., Wu X. and Zhang Y. “Determination of acrylamide in infant cereal – based foods by isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry.” **Analytica Chimica Acta.** Vol.551, 2005. pp. 150-158.
- [24] Bermudo E., Moyano E., Puignou L. and Galceran M.T. “Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass – spectrometry using an improved clean – up procedure.” **Analytica Chimica Acta.** Vol. 559, 2006. pp. 207-214.
- [25] Nielsen N. J., Granby K., Hedegaard R. V. and Skibsted L. H. “A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagines and reducing sugars in bread.” **Analytica Chimica Acta.** Vol. 557, 2006. pp. 211-220.
- [26] Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additive and Contaminants. “Discussion Paper on Acrylamide.” **Codex alimentarius commission.** Hague, Natherlands, 24-28 April, 2006.
- [27] Gokmen V. and Senyuva H. Z. “A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods.” **J. Chromatogr. A.** Vol. 1120, 2006. pp. 194-198.
- [28] Swedis Scientific Expert Committee “**Acrylamide in Food-Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods.**” [Online] . Available: <http://www.li.se/dokument/news/nyheter/Acrylamid%20Expertrapport%20Final.pdf> . 2002.
- [29] Calbiani F., Careri M., Elviri L., Mangia A. and Zagnoni I. “Development and Single-Laboratory Validation of a Reversed-Phase Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry Method for Identification and Determination of Acrylamide in Foods.” **Journal of AOAC International.** Vol. 87(1), 2004. pp. 107-115.
- [30] Svensson K., Abramsson L., Becker W., Glynn A., Hellens K.-E., Lind Y. and Rosen J. “Dietary intake of acrylamide in Sweden.” **Food and Chemical Toxicology.** Vol.41, 2003. pp. 1581-1586.

- [31] Becalski A., Lau B. P.-Y., Lewis D. and Seaman S.W. "Acrylamide in Foods : Occurrence, Sources, and Modeling." **J. Agric. Food Chem.** Vol.51 (3), 2003. pp. 802-808.
- [32] Zyzak D. V., Sanders R.A., Stojanovic M., Tallmadge D.H., Eberhart B. L., Ewald D.K., Gruber D. C., Morsch T.R., Strothers M.A., Rizzi G. P. and Villagran M.D. "Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods." **J. Agric. Food Chem.** Vol.51, 2003. pp. 4782-4787.
- [33] Amrein T. M., Swiss Federal Institute of Technology Zurich. "Systematic Studies on Process Optimization to Minimize Acrylamide Contents in Food." [Online]. Available: <http://e-collection.ethbib.ethz.ch/ecol-pool/diss/fulltext/eth16311.pdf>. 2005.
- [34] Yaylayan V.A., Wnorowski A. and Locas C. P. "Why Asparagine Needs Carbohydrates to Generate Acrylamide." **J. Agric. Food Chem.** Vol.51, 2003. pp. 1753-1757.
- [35] Report of a Joint FAO/WHO Consultation. "Health Implications of Acrylamide in Food." [Online]. Available: http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_full.pdf. 25-27 June 2000.
- [36] Bob Ardrey. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry : An Introduction.** Chichester : John Wiley & Sons Ltd. 2003.
- [37] Applied Biosystems/MDS SCIEX. **API 4000 LC/MS/MS Hardware Manual.** Ontario Canada : 2002.
- [38] ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย. หลักการเบื้องต้นและการประยุกต์ใช้เทคนิคกลุ่มควมในเคมีวิเคราะห์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2543.
- [39] "Isotope Dilution in Chemical Analysis." [Online]. Available : http://www.wcaslab.com/tech/isotope_dilution.htm.
- [40] "Isotope Dilution Techniques." [Online]. Available: <http://www.answers.com/topic/isotope-dilution-techniques>.
- [41] Macwilliams C.D., Kaufman C.D. and Waling F.B. "Polarographic and Spectrophotometric Determination of Acrylamide in Acrylamide Polymers and Copolymer " **Anal. Chem.** Vol. 37, No. 12, 1965. pp.1546 -1552.
- [42] Betso R.S. and McLean D.J. "Determination of acrylamide monomer by differntail pulse polarography " **Anal. Chem..** Vol. 48, No. 4, 1976. pp. 766-770.

- [43] Andzejewski D., Roach J. A. G., Gay M. L. and Musser S. M. "Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS." *J. Agric. Food Chem.* Vol. 52, 2004. pp. 1996-2002.
- [44] Young M. S., Jenkins K. M. and Mallet C. R. 2004. "Solid-Phase Extraction and Cleanup Procedures for Determination of Acrylamide in Fried Potato Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry." *Journal of AOAC International.* Vol. 87(4), 2004. pp. 961-964.
- [45] Pittet A., Perisset A. and Oberson J.-M. "Trace level determination of acrylamide in cereal – based foods by gas chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr. A.* Vol.1035, 2004. pp. 123-130.
- [46] Hoenicke K., Gatermann R., Harder W. and Hartig L. "Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta.* Vol.520, 2004. pp. 207-215.
- [47] Granby K. and Fagt S. "Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee." *Analytica Chimica Acta.* Vol.520, 2004. pp. 177-182.
- [48] Cavalli S., Polesello S. and Sacconi G. "Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography – mass spectrometry" *J. Chromatogr. A.* Vol. 1039, 2004. pp. 155-159.
- [49] Eberhart B. L., Ewald D. K., Sanders R. A., Tallmadge D. H. and Zyzak D. V. "Quantitation of Acrylamide in Food Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry." *Journal of AOAC International.* Vol.88(4), 2005. pp. 1205-1211.
- [50] Paleologos K.E. and Kontominas G.M. "Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection." *J. Chromatogr. A.* Vol. 1077, 2005. pp. 128-135.
- [51] Rufian-Henares J. A. and Morales F. J. "Determination of acrylamide in potato chips by a reversed – phase LC – MS method based on a stable isotope dilution assay." *Food Chemistry.* Vol.97, 2006. pp. 555-562.
- [52] Casella G. I., Pierri M. and Contursi M. "Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulse electrochemical detection." *J. Chromatogr. A.* Vol. 1107, 2006. pp. 198-203.

- [53] Zhang Y., Dong Y., Ren Y. and Zhang Y. "Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector." **J. Chromatogr. A.** Vol. 1116, 2006. pp. 209-216.
- [54] Gokmen V., Senyuva H. Z., Acar J. and Sarioglu K. "Determination of acrylamide in potato chips and crisp by high-performance liquid chromatography" **J. Chromatogr. A.** Vol. 1088, 2005. pp. 193-199.
- [55] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine. "Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds" [Online]. Available: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04d-0146-gdl0001.pdf>. November 7, 2005
- [56] ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2549
- [57] Petersson V.E., Rosen J, Turner C., Danielsson R. and Hellenas –E. K. "Critical factor and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: An optimization study." **Analytica Chimica Acta.** Vol.557, 2006. pp.287-295.
- [58] Eriksson S. and Karlsson P. "Alternative extraction techniques for analysis of acrylamide in food : Influence of pH and digestion enzymes" **LWT.** Vol.39, 2006. pp.392-398.
- [59] Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additive and Contaminants. "Proposed Draft Code of Practice for The Reduction of Acrylamide in Food." **Codex alimentarius commission.** Beijing, China, 16-20 April, 2007.

ภาคผนวก

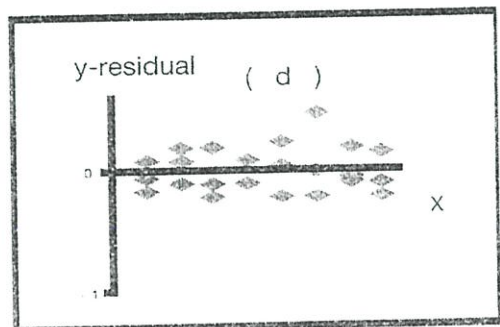
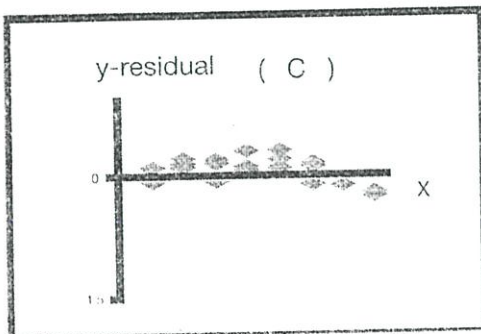
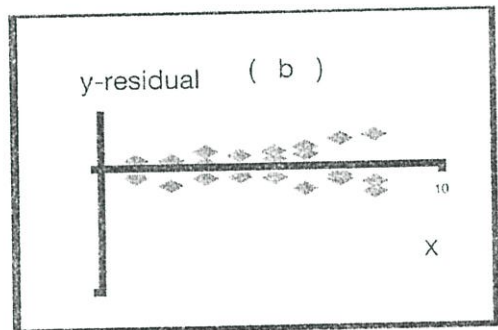
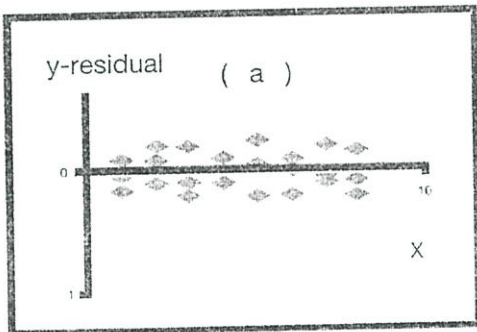
ภาคผนวก ก.

การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วย residual plots

Residual plots คือการพลอตระหว่างค่า y-residual บนแกน y และค่า x บนแกน x เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรงของเส้นกราฟที่สร้างขึ้นจาก y และ x และเพื่อดูว่ามีค่าสุดต่างหรือไม่ ถ้าเส้นกราฟมีความเป็นเส้นตรง ควรมีการกระจายของ y-residuals รอบๆค่าศูนย์ เพราะถึงแม้ว่า ค่า y ที่อ่านได้แต่ละค่าจะไม่ขึ้นกับค่า y อื่นๆ แต่ y-residual จะขึ้นซึ่งกันและกันเพราะผลรวมจะเป็นศูนย์เสมอ [56]

รูปแบบต่างๆของ residual plots (รูปที่ ก.1)

- (a) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y อย่างเป็นเส้นตรง
- (b) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y อย่างเป็นเส้นตรง แต่ค่าแปรปรวนของ y ที่ x มีค่าสูงๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากค่าแปรปรวนของ y ที่ x ต่ำๆ กรณีนี้การพลอตกราฟมาตรฐานต้องพลอตแบบ weighted regression line
- (c) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y ที่ไม่ใช่แบบเส้นตรง
- (d) แสดงความสัมพันธ์ของ x และ y อย่างเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสุดต่าง



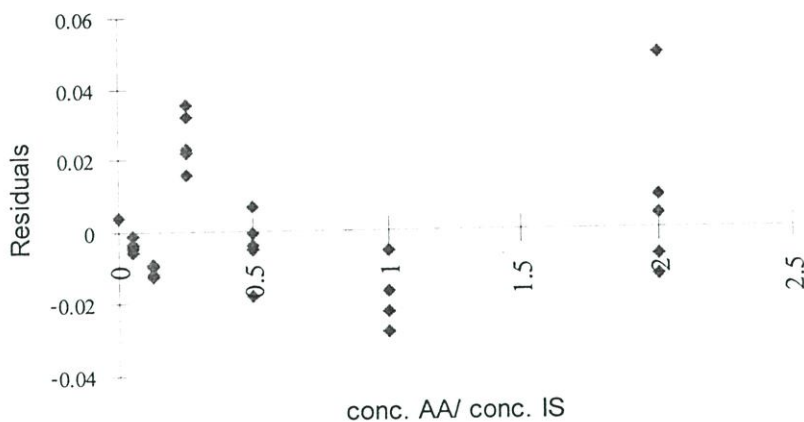
รูปที่ ก.1 แสดง Residual plots รูปแบบต่างๆ [56]

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยการนำสารละลายมาตรฐาน 7 ระดับความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.2) ทำการวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS โดยวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ นำผลการทดสอบที่ได้คำนวณอัตราส่วนของพื้นที่ที่ได้พีคสารละลายมาตรฐาน (อะคริลาไมด์ m/z 72/55) ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (2d_3 -อะคริลาไมด์ m/z 75/58) และอัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (ตารางที่ ก.1) และสร้างกราฟมาตรฐานจากความสัมพันธ์ระหว่าง y และ x

ตารางที่ ก.1 แสดงพื้นที่ที่ได้พีคและ residuals ของอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มี 2d_3 -อะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ)

ความเข้มข้นของ AA ($\mu\text{g/l}$)	ความเข้มข้นของ 2d_3 -AA (IS) ($\mu\text{g/l}$)	อัตราส่วนของความเข้มข้น (แกน x)	พื้นที่ที่ได้พีคของ AA (m/z 72/55)	พื้นที่ที่ได้พีคของ 2d_3 -AA (IS) (m/z 75/58)	อัตราส่วนของพื้นที่ที่ได้พีค (แกน y)	Residuals
0	40	0.00	0	2180000	0.000	0.003842539
0	40	0.00	0	2100000	0.000	0.003842539
0	40	0.00	0	2030000	0.000	0.003842539
0	40	0.00	0	2020000	0.000	0.003842539
0	40	0.00	0	2070000	0.000	0.003842539
2	40	0.05	86300	2060000	0.042	-0.005593904
2	40	0.05	88800	2040000	0.044	-0.003957696
2	40	0.05	86900	2020000	0.043	-0.004467306
2	40	0.05	91600	1970000	0.046	-0.000989646
2	40	0.05	85600	1940000	0.044	-0.003363397
5	40	0.12	226000	1970000	0.115	-0.009760766
5	40	0.12	228000	1980000	0.115	-0.009330063
5	40	0.12	224000	1940000	0.115	-0.009017661
5	40	0.12	220000	1950000	0.113	-0.011661066
5	40	0.12	221000	1970000	0.112	-0.012298837
10	40	0.25	542000	2020000	0.268	0.015511136
10	40	0.25	558000	1960000	0.285	0.031888182
10	40	0.25	552000	2010000	0.275	0.02182117
10	40	0.25	538000	1950000	0.276	0.02309174
10	40	0.25	550000	1910000	0.288	0.035152419
20	40	0.50	909000	1850000	0.491	-0.018102579
20	40	0.50	910000	1800000	0.506	-0.003898375
20	40	0.50	924000	1790000	0.516	0.006747187
20	40	0.50	906000	1780000	0.509	-0.000465167
20	40	0.50	893000	1770000	0.504	-0.004934157
40	40	1.00	1820000	1790000	1.017	-0.005990624
40	40	1.00	1760000	1770000	0.994	-0.028400118
40	40	1.00	1810000	1810000	1.000	-0.0227504
40	40	1.00	1800000	1790000	1.006	-0.017163808
40	40	1.00	1780000	1780000	1.000	-0.0227504
80	40	2.00	3630000	1730000	2.098	0.048922556
80	40	2.00	3520000	1710000	2.058	0.009136193
80	40	2.00	3490000	1700000	2.053	0.003597837
80	40	2.00	3410000	1670000	2.042	-0.007427172
80	40	2.00	3340000	1640000	2.037	-0.012757974

เมื่อได้กราฟมาตรฐานแล้วเพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรงทำการพลอตค่า y-residual กับอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (รูปที่ ก.2) พบว่า y-residual กระจายรอบๆ ค่าศูนย์ แสดงว่าความสัมพันธ์ของ x และ y เป็นเส้นตรง



รูปที่ ก.2 แสดงการพลอตระหว่าง y-residual กับอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (2d_3 -อะคริลาไมด์)

ภาคผนวก ข.

การคำนวณปริมาณอะคริลาไมด์

กราฟมาตรฐานสร้างจากการพลอตความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ได้พีค สารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ (m/z 72/55) ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 2d_3 - อะคริลาไมด์ (m/z 75/58) และอัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 2d_3 - อะคริลาไมด์ นำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย (regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the method of least squares) ได้สมการดังนี้

$$R_r = slope * R_c + intercept \quad (ข.1)$$

เมื่อ R_r คือ อัตราส่วนของพื้นที่ได้พีคของสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 2d_3 - อะคริลาไมด์ (แกน y)

R_c คือ อัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 2d_3 - อะคริลาไมด์ (แกน x)

slope คือ ความชันของเส้นตรง

intercept คือ จุดตัดแกน y

ตัวอย่างที่ 1 การคำนวณปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร ทำการอินทิเกรตได้พื้นที่ได้พีคดังนี้

พื้นที่ได้พีคของสารอะคริลาไมด์ (m/z 72/55) = 77700

พื้นที่ได้พีคของ 2d_3 - อะคริลาไมด์ (m/z 75/58) = 1140000

$$\text{คำนวณหา } R_r = 77700/1140000 = 0.0682$$

สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$$R_r = 1.03 * R_c - 0.00378$$

คำนวณหา R_c

$$R_c = (0.0682+0.00378)/1.03 = 0.0699$$

จากขั้นตอนการวิเคราะห์เดิม $^{2}d_3$ - อะคริลาไมด์ในตัวอย่าง = 381 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)
 ดังนั้น ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง = $0.0699 \times 381 = 26.6$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)
 หรือ 0.0266 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm)

ตัวอย่างที่ 2 การคำนวณวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน 1 ชุดการทดลอง

สมการของกราฟมาตรฐาน $R_r = 1.04 R_c + -0.0104$ ($r = 0.9997$)

Slope = 1.04

Intercept = -0.0104

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample- Rc blank	AA (ng/g)	AA เฉลี่ย (ng/g)	%Rec
Blank (no SPE)		400		8930	1700000	0.0053	0.0151				
B 01 (no SPE)	1.0889	400	367	991000	718000	1.3802	1.3371	1.3249	486		
B 02 (no SPE)	1.0469	400	382	840000	762000	1.1024	1.0700	1.0549	403		
B 03 (no SPE)	1.0201	400	392	36100	881000	0.0410	0.0494	0.0343	13.4	14.3	
B 03 (no SPE) dup	1.0171	400	393	39400	865000	0.0455	0.0538	0.0387	15.2		
B 04 (no SPE)	1.0459	400	382	51600	767000	0.0673	0.0747	0.0596	22.8		
B 05 (no SPE)	1.0747	400	372	621000	830000	0.7482	0.7294	0.7139	266		
B 06 (no SPE)	1.0429	400	384	328000	699000	0.4692	0.4612	0.4459	171		
B 06 + std 100 ng (no SPE)	1.0168	400	393	528000	724000	0.7293	0.7112	0.6959	274		104.7

$$\text{คำนวณเปอร์เซ็นต์คืนกลับ} = \frac{(274 - 171)}{100/1.0168} * 100 = 104.7 \%$$

ภาคผนวก ก.

คำนวณขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ

ก.1 แมทริกซ์ข้าว

ก.1.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของแมทริกซ์ข้าว

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของข้าว จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11 R_c + - 0.0135 \quad (r = 0.9999)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = -0.0135$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (no SPE)		400		24100	1880000	0.0128	0.0237	0.0236		
Blank_2 (no SPE)		400		22200	1980000	0.0112	0.0223			
Blank_3 (no SPE)		400		25000	1770000	0.0141	0.0249			
rice no. 1 (no SPE)	1.1161	400	358	30900	1390000	0.0222	0.0322		0.0086	3.08
rice no. 2 (no SPE)	1.0600	400	377	32900	1430000	0.0230	0.0329		0.0093	3.51
rice no. 3 (no SPE)	1.0604	400	377	47600	1590000	0.0299	0.0391		0.0155	5.84
rice no. 4 (no SPE)	1.0579	400	378	28900	1470000	0.0197	0.0299		0.0063	2.38
rice no. 5 (no SPE)	1.1108	400	360	26200	1270000	0.0206	0.0307		0.0071	2.56
rice no. 6 (no SPE)	1.0265	400	390	20500	1410000	0.0145	0.0253		0.0017	0.66
rice no. 7 (no SPE)	1.0368	400	386	36900	1530000	0.0241	0.0339		0.0103	3.98
rice no. 8 (no SPE)	1.0938	400	366	25800	1560000	0.0165	0.0271		0.0035	1.28
rice no. 9 (no SPE)	1.0314	400	388	24600	1460000	0.0168	0.0273		0.0037	1.44
rice no.10 (no SPE)	1.0023	400	399	35600	1400000	0.0254	0.0351		0.0115	4.59
									mean	2.93
									SD	1.61
									3SD	4.83
									10SD	16.1

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 2.93 + 4.83 = 7.76 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimated LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 2.93 + 16.1 = 19.0 \text{ นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ก.1.2 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของแมทริกซ์ข้าว

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 20 นาโนกรัม ในตัวอย่างข้าว 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.03 R_c + - 0.00378 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.03$$

$$\text{Intercept} = -0.00378$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		14300	1300000	0.0110	0.0143	0.0144			
Blank_2 (no SPE)		400		14900	1380000	0.0108	0.0142				
Blank_3 (no SPE)		400		20600	1690000	0.0122	0.0155				
Blank_4 (no SPE)		400		17400	1690000	0.0103	0.0137				
rice no.1	1.0176	400	393	14700	1070000	0.0137	0.0170		0.0026	1.02	
rice no.2	1.0504	400	381	12000	1290000	0.0093	0.0127		0.0000	0.00	
rice no. 3	1.0546	400	379	14100	1200000	0.0118	0.0151		0.0007	0.27	
									mean	0.43	
rice +std 20 ng no. 1 (no SPE)	1.0473	400	382	77700	1140000	0.0682	0.0698		0.0554	21.2	108.8
rice +std 20 ng no. 2 (no SPE)	1.0525	400	380	84800	1260000	0.0673	0.0690		0.0546	20.7	106.7
rice +std 20 ng no. 3 (no SPE)	1.0285	400	389	69800	1030000	0.0678	0.0695		0.0551	21.4	107.8
rice +std 20 ng no. 4 (no SPE)	1.0145	400	394	61900	1060000	0.0584	0.0604		0.0460	18.1	89.6
rice +std 20 ng no. 5 (no SPE)	1.0042	400	398	69000	1020000	0.0676	0.0693		0.0549	21.9	107.8
rice +std 20 ng no. 6 (no SPE)	1.0280	400	389	65400	1090000	0.0600	0.0619		0.0475	18.5	92.9
rice +std 20 ng no. 7 (no SPE)	1.0419	400	384	61900	1100000	0.0563	0.0583		0.0439	16.9	85.8
rice +std 20 ng no. 8 (no SPE)	1.0195	400	392	65100	1150000	0.0566	0.0586		0.0442	17.3	86.0
									mean	19.5	98.2
									SD	2.0	10.5
									%RSD	10.3	10.7

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.) ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ก.2 แมทริกซ์ข้าวโพด

ก.2.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของแมทริกซ์ข้าวโพด

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของข้าวโพด จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16 R_c + -0.0185 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0185$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (no SPE)		400		13200	811000	0.0163	0.0300	0.0249		
Blank_2 (no SPE)		400		7470	875000	0.0085	0.0233			
Blank_3 (no SPE)		400		6080	897000	0.0068	0.0218			
Blank_4 (no SPE)		400		9530	958000	0.0099	0.0245			
corn no. 1 (no SPE)	1.0856	400	368	16300	629000	0.0259	0.0383		0.0134	4.93
corn no. 2 (no SPE)	1.0372	400	386	10800	672000	0.0161	0.0298		0.0049	1.89
corn no. 3 (no SPE)	1.0862	400	368	7350	624000	0.0118	0.0261		0.0012	0.44
corn no. 4 (no SPE)	1.0086	400	397	10800	616000	0.0175	0.0311		0.0062	2.46
corn no. 5 (no SPE)	1.0103	400	396	13700	634000	0.0216	0.0346		0.0097	3.84
corn no. 6 (no SPE)	1.0048	400	398	3870	631000	0.0061	0.0212		0.0000	0.00
corn no. 7 (no SPE)	1.0298	400	388	8940	562000	0.0159	0.0297		0.0048	1.86
corn no. 8 (no SPE)	1.0490	400	381	5790	570000	0.0102	0.0247		0.0000	0.00
corn no. 9 (no SPE)	1.0849	400	369	5860	575000	0.0102	0.0247		0.0000	0.00
corn no. 10 (no SPE)	1.0521	400	380	13600	579000	0.0235	0.0362		0.0113	4.29
									mean	1.97
									SD	1.88
									3SD	5.64
									10SD	18.8

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 1.97 + 5.64 = 7.61 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimate LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 1.97 + 18.8 = 20.8 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ก.2.2 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของแมทริกซ์ข้าวโพด

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 20 นาโนกรัม ในตัวอย่างข้าวโพด 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + -0.0185 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0185$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		13200	811000	0.0163	0.0300	0.0249			
Blank_2 (no SPE)		400		7470	875000	0.0085	0.0233				
Blank_3 (no SPE)		400		6080	897000	0.0068	0.0218				
Blank_4 (no SPE)		400		9530	958000	0.0099	0.0245				
corn no.1-10 (from LOD)									mean	1.97	
corn +std 20 ng no. 1 (no SPE)	1.0485	400	382	46100	593000	0.0777	0.0830		0.0581	22.2	106.1
corn +std 20 ng no. 2 (no SPE)	1.0422	400	384	39900	598000	0.0667	0.0735		0.0486	18.7	87.2
corn +std 20 ng no. 3 (no SPE)	1.0563	400	379	46700	595000	0.0785	0.0836		0.0587	22.2	106.8
corn +std 20 ng no. 4 (no SPE)	1.0372	400	386	41800	628000	0.0666	0.0733		0.0484	18.7	86.8
corn +std 20 ng no. 5 (no SPE)	1.0154	400	394	44700	643000	0.0695	0.0759		0.0510	20.1	92.0
corn +std 20 ng no. 6 (no SPE)	1.0101	400	396	43900	610000	0.0720	0.0780		0.0531	21.0	96.1
corn +std 20 ng no. 7 (no SPE)	1.0210	400	392	47300	599000	0.0790	0.0840		0.0591	23.2	108.4
									mean	20.9	97.6
									SD	1.8	9.4
									%RSD	8.6	9.6

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.) ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ค.3 แมทริกซ์มันฝรั่ง

ค.3.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของแมทริกซ์มันฝรั่ง

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของมันฝรั่ง คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16 R_c + - 0.0133 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0133$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (no SPE)		400		16100	1290000	0.0125	0.0222	0.0211		
Blank_2 (no SPE)		400		8950	1140000	0.0079	0.0182			
Blank_3 (no SPE)		400		29800	1680000	0.0177	0.0268			
Blank_4 (no SPE)		400		10100	1550000	0.0065	0.0171			
potato no. 1 (no SPE)	1.0822	400	370	14600	940000	0.0155	0.0249		0.0038	1.41
potato no. 2 (no SPE)	1.0026	400	399	10600	832000	0.0127	0.0224		0.0013	0.52
potato no. 3 (no SPE)	1.1001	400	364	9000	826000	0.0109	0.0209		0.0000	0.00
potato no. 4 (no SPE)	1.1052	400	362	16400	795000	0.0206	0.0292		0.0081	2.93
potato no. 5 (no SPE)	1.0560	400	379	14200	802000	0.0177	0.0267		0.0056	2.12
potato no. 6 (no SPE)	1.1093	400	361	0	681000	0.0000	0.0115		0.0000	0.00
potato no. 7 (no SPE)	1.0248	400	390	15300	738000	0.0207	0.0293		0.0082	3.20
potato no. 8 (no SPE)	1.0989	400	364	19000	746000	0.0255	0.0334		0.0123	4.48
potato no. 9 (no SPE)	1.1712	400	342	6190	723000	0.0086	0.0188		0.0000	0.00
									mean	1.63
									SD	1.65
									3SD	4.95
									10SD	16.5

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 1.63 + 4.95 = 6.58 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimate LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 1.63 + 16.5 = 18.1 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ค.3.2 ซีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของแมทริกซ์มันฝรั่ง

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 20 นาโนกรัม ในตัวอย่างมันฝรั่ง 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + -0.0133 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0133$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		16100	1290000	0.0125	0.0222	0.0212			
Blank_2		400		8950	1140000	0.0079	0.0182				
Blank_3		400		30400	1680000	0.0181	0.0271				
Blank_4		400		10100	1550000	0.0065	0.0171				
potato no.1-9 (from LOD)									mean	1.63	
potato +std 20 ng no. 1 (no SPE)	1.0327	400	387	48700	829000	0.0587	0.0621		0.0409	15.8	73.2
potato +std 20 ng no. 2 (no SPE)	1.0719	400	373	54700	879000	0.0622	0.0651		0.0439	16.4	79.2
potato +std 20 ng no. 3 (no SPE)	1.0167	400	393	53900	886000	0.0608	0.0639		0.0427	16.8	77.1
potato +std 20 ng no. 4 (no SPE)	1.0570	400	378	59300	829000	0.0715	0.0731		0.0519	19.6	95.0
potato +std 20 ng no. 5 (no SPE)	1.0574	400	378	55000	732000	0.0751	0.0762		0.0550	20.8	101.4
potato +std 20 ng no. 6 (no SPE)	1.0013	400	400	54600	778000	0.0702	0.0720		0.0508	20.3	93.5
potato +std 20 ng no. 7 (no SPE)	1.0399	400	385	53800	819000	0.0657	0.0681		0.0469	18.1	85.6
									mean	18.3	86.4
									SD	2.0	10.5
									%RSD	10.9	12.2

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.) ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ค.4 แมทริกซ์ถั่ว

ค.4.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของแมทริกซ์ถั่ว

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของถั่ว จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11 R_c + -0.023 \quad (r = 0.9996)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = -0.023$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (no SPE)		400		8570	1130000	0.0076	0.0276	0.0279		
Blank_2 (no SPE)		400		10700	1160000	0.0092	0.0290			
Blank_3 (no SPE)		400		8950	1260000	0.0071	0.0271			
peanut no. 1 (no SPE)	1.0553	400	379	44500	1780000	0.0250	0.0432		0.0153	5.80
peanut no. 2 (no SPE)	1.0313	400	388	31100	1320000	0.0236	0.0419		0.0140	5.43
peanut no. 3 (no SPE)	1.0208	400	392	7030	498000	0.0141	0.0334		0.0055	2.16
peanut no. 4 (no SPE)	1.0717	400	373	15400	591000	0.0261	0.0442		0.0163	6.08
peanut no. 5 (no SPE)	1.0680	400	375	22300	534000	0.0418	0.0583		0.0304	11.4
peanut no. 6 (no SPE)	1.0300	400	388	12400	537000	0.0231	0.0415		0.0136	5.28
peanut no. 7 (no SPE)	1.0242	400	391	15600	565000	0.0276	0.0456		0.0177	6.92
peanut no. 8 (no SPE)	1.0248	400	390	10200	555000	0.0184	0.0373		0.0094	3.67
peanut no. 9 (no SPE)	1.0812	400	370	18800	585000	0.0321	0.0497		0.0218	8.07
peanut no. 10 (no SPE)	1.0246	400	390	10100	546000	0.0185	0.0374		0.0095	3.71
									mean	5.85
									SD	2.59
									3SD	7.77
									10SD	25.9

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 5.85 + 7.77 = 13.62 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimated LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 5.85 + 25.9 = 31.8 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ก.4.2 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของแมทริกซ์ถั่ว

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์จำนวน 30 นาโนกรัม ในตัวอย่างถั่ว 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.12 R_c + - 0.0181 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.12$$

$$\text{Intercept} = -0.0181$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		8990	1340000	0.0067	0.0224			
peanut no. 1 (no SPE)	1.0260	400	390	37800	1530000	0.0247	0.0386	0.0162	6.32	
peanut no. 2 (no SPE)	1.0690	400	374	32800	1020000	0.0322	0.0453	0.0229	8.56	
peanut no. 3 (no SPE)	1.0334	400	387	28800	1100000	0.0262	0.0399	0.0175	6.77	
								mean	7.22	
peanut +std 30 ng no. 1 (no SPE)	1.0688	400	374	108000	954000	0.1132	0.1183	0.0959	35.9	102.2
peanut +std 30 ng no. 2 (no SPE)	1.0581	400	378	101000	960000	0.1052	0.1111	0.0887	33.5	92.7
peanut +std 30 ng no. 3 (no SPE)	1.0110	400	396	101000	977000	0.1034	0.1094	0.0870	34.5	91.9
peanut +std 30 ng no. 4 (no SPE)	1.0134	400	395	99300	901000	0.1102	0.1156	0.0932	36.8	99.9
peanut +std 30 ng no. 5 (no SPE)	1.0174	400	393	94900	820000	0.1157	0.1206	0.0982	38.6	106.4
peanut +std 30 ng no. 6 (no SPE)	1.0221	400	391	115000	995000	0.1156	0.1204	0.0980	38.3	105.9
peanut +std 30 ng no. 7 (no SPE)	1.0396	400	385	95100	845000	0.1125	0.1177	0.0953	36.7	102.1
peanut +std 30 ng no. 8 (no SPE)	1.0423	400	384	93500	790000	0.1184	0.1229	0.1005	38.6	109.0
								mean	36.6	101.3
								SD	1.9	6.2
								%RSD	5.2	6.1

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.) ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 30.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ค.5 เมทริกซ์ผลไม้

ค.5.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของเมทริกซ์ผลไม้

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของกล้วย คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_s = 1.11 R_c + 0.000271 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = 0.000271$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (no SPE)		400		8530	1390000	0.0061	0.0053	0.0058		
Blank_2 (no SPE)		400		8070	1330000	0.0061	0.0052			
Blank_3 (no SPE)		400		13800	1760000	0.0078	0.0068			
banana no. 1 (no SPE)	1.0378	400	385	6180	1200000	0.0052	0.0044		0.0000	0.00
banana no. 2 (no SPE)	1.0688	400	374	7820	949000	0.0082	0.0072		0.0014	0.52
banana no. 3 (no SPE)	1.0229	400	391	3000	1100000	0.0027	0.0022		0.0000	0.00
banana no. 4 (no SPE)	1.0782	400	371	7750	1240000	0.0063	0.0054		0.0000	0.00
banana no. 5 (no SPE)	1.0663	400	375	13000	1310000	0.0099	0.0087		0.0029	1.09
banana no. 6 (no SPE)	1.0473	400	382	8240	1290000	0.0064	0.0055		0.0000	0.00
banana no. 7 (no SPE)	1.0710	400	374	3840	864000	0.0044	0.0038		0.0000	0.00
banana no. 8 (no SPE)	1.0449	400	383	8400	1350000	0.0062	0.0054		0.0000	0.00
banana no. 9 (no SPE)	1.0734	400	373	4460	932000	0.0048	0.0041		0.0000	0.00
banana no. 10 (no SPE)	1.0368	400	386	5030	1010000	0.0050	0.0042		0.0000	0.00
									mean	0.16
									SD	0.37
									3SD	1.11
									10SD	3.70

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 0.16 + 1.11 = 1.27 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimated LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 0.16 + 3.70 = 3.86 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ก.5.2 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของแมทริกซ์ผลไม้

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 20 นาโนกรัม ในตัวอย่างกล้วย 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11R_c + 0.000271 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = 0.000271$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		8530	1390000	0.0061	0.0053	0.0058			
Blank_2		400		8070	1330000	0.0061	0.0052				
Blank_3		400		13800	1760000	0.0078	0.0068				
banana no.1-10 (from LOD)									mean	0.16	
banana +std 20 ng no. 1 (no SPE)	1.0838	400	369	58100	1030000	0.0564	0.0506		0.0448	16.5	88.5
banana +std 20 ng no. 2 (no SPE)	1.0632	400	376	52100	953000	0.0547	0.0490		0.0432	16.2	85.3
banana +std 20 ng no. 3 (no SPE)	1.0053	400	398	56900	1010000	0.0563	0.0505		0.0447	17.8	88.7
banana +std 20 ng no. 4 (no SPE)	1.0080	400	397	52400	1010000	0.0519	0.0465		0.0407	16.2	80.8
banana +std 20 ng no. 5 (no SPE)	1.0595	400	378	60700	975000	0.0623	0.0558		0.0500	18.9	99.3
banana +std 20 ng no. 6 (no SPE)	1.0319	400	388	59000	1070000	0.0551	0.0494		0.0436	16.9	86.4
banana +std 20 ng no. 7 (no SPE)	1.0045	400	398	59400	993000	0.0598	0.0536		0.0478	19.0	94.6
banana +std 20 ng no. 8 (no SPE)	1.0247	400	390	58100	1010000	0.0575	0.0516		0.0458	17.9	90.9
banana +std 20 ng no. 9 (no SPE)	1.0506	400	381	49300	1020000	0.0483	0.0433		0.0375	14.3	74.3
banana +std 20 ng no. 10 (no SPE)	1.0555	400	379	55300	987000	0.0560	0.0502		0.0444	16.8	87.8
									mean	17.0	87.7
									SD	1.4	6.9
									%RSD	8.2	7.9

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ค.6 แมทริกซ์ขนมปัง

ค.6.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของแมทริกซ์ขนมปัง

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของขนมปัง จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.12 R_c + - 0.00181 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.12$$

$$\text{Intercept} = -0.00181$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (no SPE)		400		8990	1340000	0.0067	0.0222		
bread no. 1 (no SPE)	1.0800	400	370	13800	814000	0.0170	0.0313	0.0091	3.37
bread no. 2 (no SPE)	1.0460	400	382	9590	809000	0.0119	0.0267	0.0045	1.72
bread no. 3 (no SPE)	1.0323	400	388	6600	820000	0.0080	0.0233	0.0011	0.43
bread no. 4 (no SPE)	1.0722	400	373	9580	813000	0.0118	0.0267	0.0045	1.68
bread no. 5 (no SPE)	1.0331	400	387	10300	831000	0.0124	0.0272	0.0050	1.94
bread no. 6 (no SPE)	1.0080	400	397	11100	991000	0.0112	0.0262	0.0040	1.59
bread no. 7 (no SPE)	1.0649	400	376	17100	847000	0.0202	0.0342	0.0120	4.51
bread no. 8 (no SPE)	1.0507	400	381	10100	817000	0.0124	0.0272	0.0050	1.91
bread no. 9 (no SPE)	1.0385	400	385	12800	763000	0.0168	0.0311	0.0089	3.43
bread no. 10 (no SPE)	1.0719	400	373	11100	791000	0.0140	0.0287	0.0065	2.42
								mean	2.30
								SD	1.17
								3SD	3.51
								10SD	11.7

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 2.30 + 3.51 = 5.81 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimated LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 2.30 + 11.7 = 14.0 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ก.6.2 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของแมทริกซ์ขนมปัง

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 20 นาโนกรัม ในตัวอย่างขนมปัง 1 กรัม จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.02R_c + 0.0134 \quad (r = 0.9993)$$

$$\text{Slope} = 1.02$$

$$\text{Intercept} = 0.0134$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rcเฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		18900	1500000	0.0126	0.0000	0.0000			
Blank_2 (no SPE)		400		16400	1570000	0.0104	0.0000				
Blank_3 (no SPE)		400		8500	1940000	0.0044	0.0000				
Blank_4 (no SPE)		400		11100	1520000	0.0073	0.0000				
bread no. 1 (no SPE)	1.0189	400	393	23200	1720000	0.0135	0.0001		0.0001	0.04	
bread no. 2 (no SPE)	1.0057	400	398	19500	988000	0.0197	0.0062		0.0062	2.47	
bread no. 3 (no SPE)	1.0671	400	375	10800	1020000	0.0106	0.0000		0.0000	0.00	
bread no. 4 (no SPE)	1.0016	400	399	12300	924000	0.0133	0.0000		0.0000	0.00	
									mean	0.63	
bread +std 20 ng no. 1 (no SPE)	1.0366	400	386	76800	1180000	0.0651	0.0507		0.0507	19.6	98.3
bread +std 20 ng no. 2 (no SPE)	1.0433	400	383	48100	844000	0.0570	0.0427		0.0427	16.4	82.3
bread +std 20 ng no. 3 (no SPE)	1.0261	400	390	55900	884000	0.0632	0.0489		0.0489	19.1	94.8
bread +std 20 ng no. 4 (no SPE)	1.0094	400	396	46700	862000	0.0542	0.0400		0.0400	15.8	76.6
bread +std 20 ng no. 5 (no SPE)	1.0402	400	385	50000	850000	0.0588	0.0445		0.0445	17.1	85.7
bread +std 20 ng no. 6 (no SPE)	1.0323	400	388	55800	911000	0.0613	0.0469		0.0469	18.2	90.7
bread +std 20 ng no. 7 (no SPE)	1.0715	400	373	49100	851000	0.0577	0.0434		0.0434	16.2	83.4
bread +std 20 ng no. 8 (no SPE)	1.0846	400	369	49700	844000	0.0589	0.0446		0.0446	16.5	86.1
bread +std 20 ng no. 9 (no SPE)	1.0778	400	371	49700	858000	0.0579	0.0437		0.0437	16.2	83.9
									mean	17.2	86.9
									SD	1.4	6.7
									%RSD	8.1	7.7

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.) ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ค.7 แมทริกซ์กาแฟ

ค.7.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) ของแมทริกซ์กาแฟ

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ใน sample blank ของเมล็ดกาแฟ กำหนดปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.01 R_c + 0.0165 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.01$$

$$\text{Intercept} = 0.0165$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1 (SPE_MCX)		400		2920	731000	0.0040	0.0000	0.0000		
Blank_2 (SPE_MCX)		400		5180	728000	0.0071	0.0000			
Blank_3 (SPE_MCX)		400		4960	404000	0.0123	0.0000			
coffee no. 1 (SPE_MCX)	1.0085	400	397	14900	651000	0.0229	0.0063		0.0063	2.50
coffee no. 2 (SPE_MCX)	1.0081	400	397	16600	651000	0.0255	0.0089		0.0089	3.53
coffee no. 3 (SPE_MCX)	1.0049	400	398	11600	547000	0.0212	0.0047		0.0047	1.87
coffee no. 4 (SPE_MCX)	1.0000	400	400	5190	539000	0.0096	0.0000		0.0000	0.00
coffee no. 5 (SPE_MCX)	1.0086	400	397	14600	543000	0.0269	0.0103		0.0103	4.09
coffee no. 6 (SPE_MCX)	1.0042	400	398	6840	522000	0.0131	0.0000		0.0000	0.00
coffee no. 7 (SPE_MCX)	1.0022	400	399	6920	521000	0.0133	0.0000		0.0000	0.00
									mean	1.71
									SD	1.75
									3SD	5.25
									10SD	17.5

สรุป

$$\text{LOD} = \text{mean} + 3\text{SD}$$

$$= 1.71 + 5.25 = 6.96 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

$$\text{estimated LOQ} = \text{mean} + 10\text{SD}$$

$$= 1.71 + 17.5 = 19.2 \text{ นาโนกรัมต่อกรัม หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)}$$

ก.7.2 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของเมทริกซ์กาแฟ

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 20 นาโนกรัม ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟบด 1 กรัม จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.01R_c + 0.0165 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.01$$

$$\text{Intercept} = 0.0165$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		2920	731000	0.0040	0.0000	0.0000			
Blank_2		400		5180	728000	0.0071	0.0000				
Blank_3		400		4960	404000	0.0123	0.0000				
coffee no.1-7 (from LOD)									mean	1.71	
coffee +std 20 ng no. 1 (SPE_MCX)	1.0027	400	399	33800	573000	0.0590	0.0421		0.0421	16.8	75.7
coffee +std 20 ng no. 2 (SPE_MCX)	1.0070	400	397	37800	550000	0.0687	0.0517		0.0517	20.5	94.6
coffee +std 20 ng no. 3 (SPE_MCX)	1.0002	400	400	17600	290000	0.0607	0.0438		0.0438	17.5	79.0
coffee +std 20 ng no. 4 (SPE_MCX)	1.0093	400	396	39900	654000	0.0610	0.0441		0.0441	17.5	79.7
coffee +std 20 ng no. 5 (SPE_MCX)	1.0006	400	400	40500	677000	0.0598	0.0429		0.0429	17.2	77.5
coffee +std 20 ng no. 6 (SPE_MCX)	1.0006	400	400	46400	648000	0.0716	0.0546		0.0546	21.8	100.5
coffee +std 20 ng no. 7 (SPE_MCX)	1.0099	400	396	44400	680000	0.0653	0.0483		0.0483	19.1	87.8
									mean	18.6	85.0
									SD	1.9	9.5
									%RSD	10.2	11.2

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.) ดังนั้น LOQ อยู่ที่ระดับ 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมหรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

ภาคผนวก ง.

คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ของแต่ละเมทริกซ์ที่
ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ง.1 เมทริกซ์ข้าว

ง.1.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของเมทริกซ์ข้าวที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เดิมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์
จำนวน 400 นาโนกรัม ในตัวอย่างข้าว 1 กรัม ปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ
เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.03 R_c + - 0.00378 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.03, \quad \text{Intercept} = -0.00378$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample – Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		14300	1300000	0.0110	0.0143	0.0144			
Blank_2 (no SPE)		400		14900	1380000	0.0108	0.0142				
Blank_3 (no SPE)		400		20600	1690000	0.0122	0.0155				
Blank_4 (no SPE)		400		17400	1690000	0.0103	0.0137				
rice no.1 (no_SPE)	1.0176	400	393	14700	1070000	0.0137	0.0170		0.0026	1.02	
rice no.2 (no_SPE)	1.0504	400	381	12000	1290000	0.0093	0.0127		0.0000	0.00	
rice no. 3 (no_SPE)	1.0546	400	379	14100	1200000	0.0118	0.0151		0.0007	0.27	
									mean	0.43	
rice +std 400 ng no. 1	1.0136	400	395	970000	938000	1.0341	1.0077		0.9933	392	99.2
rice +std 400 ng no. 2	1.0317	400	388	981000	959000	1.0229	0.9968		0.9824	381	98.2
rice +std 400 ng no. 3	1.0196	400	392	854000	844000	1.0118	0.9860		0.9716	381	97.0
rice +std 400 ng no. 4	1.0009	400	400	878000	841000	1.0440	1.0173		1.0029	401	100.2
rice +std 400 ng no. 5	1.0225	400	391	911000	904000	1.0077	0.9821		0.9677	378	96.5
rice +std 400 ng no. 6	1.0416	400	384	1140000	1150000	0.9913	0.9661		0.9517	366	95.2
rice +std 400 ng no. 7	1.0476	400	382	1160000	1210000	0.9587	0.9344		0.9200	351	91.8
rice +std 400 ng no. 8	1.0304	400	388	1010000	1010000	1.0000	0.9745		0.9601	373	96.0
rice +std 400 ng no. 9	1.0120	400	395	1050000	1040000	1.0096	0.9839		0.9695	383	96.8
rice +std 400 ng no. 10	1.0118	400	395	1010000	1020000	0.9902	0.9650		0.9506	375	94.7
									mean	378	96.6
									SD	14	2.4
									%RSD	3.7	2.5

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.)

ง.1.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของเมทริกซ์ข้าวที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างข้าว 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.03 R_c + - 0.00378 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.03$$

$$\text{Intercept} = -0.00378$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		14300	1300000	0.0110	0.0143	0.0144			
Blank_2 (no SPE)		400		14900	1380000	0.0108	0.0142				
Blank_3 (no SPE)		400		20600	1690000	0.0122	0.0155				
Blank_4 (no SPE)		400		17400	1690000	0.0103	0.0137				
rice no.1 (no_SPE)	1.0176	400	393	14700	1070000	0.0137	0.0170		0.0026	1.02	
rice no.2 (no_SPE)	1.0504	400	381	12000	1290000	0.0093	0.0127		0.0000	0.00	
rice no. 3 (no_SPE)	1.0546	400	379	14100	1200000	0.0118	0.0151		0.0007	0.27	
									mean	0.43	
rice +std 800 ng no. 1	1.0001	400	400	2360000	1170000	2.0171	1.9620		1.9476	779	97.3
rice +std 800 ng no. 2	1.0555	400	379	2390000	1220000	1.9590	1.9056		1.8912	717	94.5
rice +std 800 ng no. 3	1.0102	400	396	1900000	956000	1.9874	1.9332		1.9188	760	95.9
rice +std 800 ng no. 4	1.0081	400	397	1800000	894000	2.0134	1.9584		1.9440	772	97.2
rice +std 800 ng no. 5	1.0219	400	391	1960000	980000	2.0000	1.9454		1.9310	755	96.4
rice +std 800 ng no. 6	1.0537	400	380	2210000	1060000	2.0849	2.0279		2.0135	765	100.7
rice +std 800 ng no. 7	1.0101	400	396	2390000	1180000	2.0254	1.9701		1.9557	774	97.7
rice +std 800 ng no. 8	1.0210	400	392	1700000	840000	2.0238	1.9685		1.9541	766	97.7
rice +std 800 ng no. 9	1.0669	400	375	1890000	921000	2.0521	1.9960		1.9816	743	99.0
rice +std 800 ng no. 10	1.0262	400	390	1720000	827000	2.0798	2.0229		2.0085	783	100.4
									mean	761	97.7
									SD	20	1.9
									%RSD	2.6	1.9

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.2 แมทริกซ์ข้าวโพด

ง.2.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์ข้าวโพดที่ระดับความเข้มข้น 400

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์จำนวน 400 นาโนกรัม ในตัวอย่างข้าวโพด 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + -0.0185 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16, \quad \text{Intercept} = -0.0185$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		13200	811000	0.0163	0.0300	0.0249			
Blank_2 (no SPE)		400		7470	875000	0.0085	0.0233				
Blank_3 (no SPE)		400		6080	897000	0.0068	0.0218				
Blank_4 (no SPE)		400		9530	958000	0.0099	0.0245				
corn no.1-10 (from LOD)									mean	1.97	
corn +std 400 ng no. 1 (no SPE)	1.0043	400	398	757000	653000	1.1593	1.0153		0.9904	394	98.4
corn +std 400 ng no. 2 (no SPE)	1.0148	400	394	661000	583000	1.1338	0.9934		0.9685	382	96.4
corn +std 400 ng no. 3 (no SPE)	1.0106	400	396	714000	644000	1.1087	0.9717		0.9468	375	94.2
corn +std 400 ng no. 4 (no SPE)	1.0186	400	393	729000	647000	1.1267	0.9873		0.9624	378	95.8
corn +std 400 ng no. 5 (no SPE)	1.0118	400	395	717000	638000	1.1238	0.9848		0.9599	379	95.4
corn +std 400 ng no. 6 (no SPE)	1.0160	400	394	754000	691000	1.0912	0.9566		0.9317	367	92.7
corn +std 400 ng no. 7 (no SPE)	1.0158	400	394	735000	669000	1.0987	0.9631		0.9382	370	93.5
corn +std 400 ng no. 8 (no SPE)	1.0527	400	380	719000	647000	1.1113	0.9740		0.9491	361	94.5
corn +std 400 ng no. 9 (no SPE)	1.0617	400	377	771000	642000	1.2009	1.0512		1.0263	387	102.2
corn +std 400 ng no. 10 (no SPE)	1.0557	400	379	742000	661000	1.1225	0.9837		0.9588	363	95.3
									mean	376	95.8
									SD	11	2.7
									%RSD	2.9	2.8

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.2.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์ข้าวโพดที่ระดับความเข้มข้น 800

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เดิมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างข้าวโพด 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + -0.0185 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0185$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rcเฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		13200	811000	0.0163	0.0300	0.0249			
Blank_2 (no SPE)		400		7470	875000	0.0085	0.0233				
Blank_3 (no SPE)		400		6080	897000	0.0068	0.0218				
Blank_4 (no SPE)		400		9530	958000	0.0099	0.0245				
corn no.1-10 (from LOD)									mean	1.97	
corn +std 800 ng no. 1 (no SPE)	1.0551	400	379	1440000	639000	2.2535	1.9586		1.9337	733	96.4
corn +std 800 ng no. 2 (no SPE)	1.0713	400	373	1320000	570000	2.3158	2.0123		1.9874	741	99.0
corn +std 800 ng no. 3 (no SPE)	1.0183	400	393	1530000	671000	2.2802	1.9816		1.9567	769	97.6
corn +std 800 ng no. 4 (no SPE)	1.0865	400	368	1390000	610000	2.2787	1.9803		1.9554	720	97.5
corn +std 800 ng no. 5 (no SPE)	1.0101	400	396	1520000	632000	2.4051	2.0893		2.0644	818	103.0
corn +std 800 ng no. 6 (no SPE)	1.0607	400	377	1510000	674000	2.2404	1.9473		1.9224	725	95.9
corn +std 800 ng no. 7 (no SPE)	1.0818	400	370	1490000	665000	2.2406	1.9475		1.9226	711	95.9
corn +std 800 ng no. 8 (no SPE)	1.0379	400	385	1500000	660000	2.2727	1.9752		1.9503	751	97.2
corn +std 800 ng no. 9 (no SPE)	1.0758	400	372	1470000	658000	2.2340	1.9418		1.9169	713	95.6
corn +std 800 ng no. 10 (no SPE)	1.0498	400	381	1490000	679000	2.1944	1.9077		1.8828	717	93.8
									mean	740	97.2
									SD	33	2.5
									%RSD	4.5	2.6

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.3 แมทริกซ์มันฝรั่ง

ง.3.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์มันฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น 400

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เดิมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์จำนวน 400 นาโนกรัม ในตัวอย่างมันฝรั่ง 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + - 0.0133 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16, \quad \text{Intercept} = -0.0133$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		16100	1290000	0.0125	0.0222	0.0212			
Blank_2		400		8950	1140000	0.0079	0.0182				
Blank_3		400		30400	1680000	0.0181	0.0271				
Blank_4		400		10100	1550000	0.0065	0.0171				
potato no.1-9 (from LOD)									mean	1.63	
potato +std 400 ng no. 1 (no SPE)	1.0547	400	379	818000	737000	1.1099	0.9683		0.9471	359	94.2
potato +std 400 ng no. 2 (no SPE)	1.0497	400	381	698000	660000	1.0576	0.9232		0.9020	344	89.8
potato +std 400 ng no. 3 (no SPE)	1.0337	400	387	711000	638000	1.1144	0.9722		0.9510	368	94.7
potato +std 400 ng no. 4 (no SPE)	1.0403	400	384	701000	618000	1.1343	0.9893		0.9681	372	96.3
potato +std 400 ng no. 5 (no SPE)	1.0521	400	380	670000	607000	1.1038	0.9630		0.9418	358	93.7
potato +std 400 ng no. 6 (no SPE)	1.0588	400	378	807000	719000	1.1224	0.9790		0.9578	362	95.4
potato +std 400 ng no. 7 (no SPE)	1.0625	400	376	767000	690000	1.1116	0.9697		0.9485	357	94.4
potato +std 400 ng no. 8 (no SPE)	1.0799	400	370	725000	637000	1.1381	0.9926		0.9714	359	96.5
potato +std 400 ng no. 9 (no SPE)	1.0136	400	395	763000	651000	1.1720	1.0218		1.0006	395	99.7
potato +std 400 ng no. 10 (no SPE)	1.0074	400	397	734000	608000	1.2072	1.0522		1.0310	409	102.6
									mean	368	95.7
									SD	20	3.5
									%RSD	5.4	3.7

สรุป เปอร์เซนต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.3.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์มันฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น 800

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างมันฝรั่ง 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + - 0.0133 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0133$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		16100	1290000	0.0125	0.0222	0.0212			
Blank_2		400		8950	1140000	0.0079	0.0182				
Blank_3		400		30400	1680000	0.0181	0.0271				
Blank_4		400		10100	1550000	0.0065	0.0171				
potato no.1-9 (from LOD)									mean	1.63	
potato +std 800 ng no. 1 (no SPE)	1.0416	400	384	1780000	781000	2.2791	1.9762		1.9550	751	97.6
potato +std 800 ng no. 2 (no SPE)	1.0664	400	375	1430000	625000	2.2880	1.9839		1.9627	736	97.9
potato +std 800 ng no. 3 (no SPE)	1.0347	400	387	1470000	640000	2.2969	1.9915		1.9703	763	98.5
potato +std 800 ng no. 4 (no SPE)	1.0559	400	379	1470000	648000	2.2685	1.9671		1.9459	738	97.2
potato +std 800 ng no. 5 (no SPE)	1.0193	400	392	1320000	602000	2.1927	1.9017		1.8805	737	93.7
potato +std 800 ng no. 6 (no SPE)	1.0603	400	377	1610000	702000	2.2934	1.9886		1.9674	742	98.1
potato +std 800 ng no. 7 (no SPE)	1.0694	400	374	1450000	640000	2.2656	1.9646		1.9434	727	97.0
potato +std 800 ng no. 8 (no SPE)	1.0177	400	393	1490000	658000	2.2644	1.9636		1.9424	763	96.9
potato +std 800 ng no. 9 (no SPE)	1.0049	400	398	1360000	598000	2.2742	1.9720		1.9508	776	97.3
potato +std 800 ng no. 10 (no SPE)	1.0174	400	393	1430000	649000	2.2034	1.9109		1.8897	743	94.3
									mean	748	96.8
									SD	15	1.6
									%RSD	2.0	1.7

สรุป เปอร์เซนต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.4 แมทริกซ์ถั่ว

ง.4.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์ถั่ว ที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์จำนวน 400 นาโนกรัม ในตัวอย่างถั่ว 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11 R_c + - 0.023 \quad (r = 0.9996)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = -0.023$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		8570	1130000	0.0076	0.0276	0.0279		
Blank_2 (no SPE)		400		10700	1160000	0.0092	0.0290			
Blank_3 (no SPE)		400		8950	1260000	0.0071	0.0271			
peanut no. 1-10 (from LOD)								mean	5.85	
peanut +std 400 ng no. 1 (no SPE)	1.0555	400	379	754000	763000	0.9882	0.9110	0.8831	335	86.9
peanut +std 400 ng no. 2 (no SPE)	1.0456	400	383	1120000	914000	1.2254	1.1247	1.0968	420	108.3
peanut +std 400 ng no. 3 (no SPE)	1.0482	400	382	600000	620000	0.9677	0.8926	0.8647	330	84.9
peanut +std 400 ng no. 4 (no SPE)	1.0467	400	382	647000	605000	1.0694	0.9842	0.9563	365	94.0
peanut +std 400 ng no. 5 (no SPE)	1.0544	400	379	966000	805000	1.2000	1.1018	1.0739	407	105.7
peanut +std 400 ng no. 6 (no SPE)	1.0450	400	383	914000	811000	1.1270	1.0360	1.0081	386	99.3
peanut +std 400 ng no. 7 (no SPE)	1.0436	400	383	663000	616000	1.0763	0.9904	0.9625	369	94.7
peanut +std 400 ng no. 8 (no SPE)	1.0430	400	384	995000	797000	1.2484	1.1454	1.1175	429	110.3
peanut +std 400 ng no. 9 (no SPE)	1.0495	400	381	1140000	995000	1.1457	1.0529	1.0250	391	101.1
peanut +std 400 ng no. 10 (no SPE)	1.0619	400	377	1110000	977000	1.1361	1.0443	1.0164	383	100.1
								mean	382	98.5
								SD	33	8.5
								%RSD	8.6	8.6

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.4.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์ถั่ว ที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์
จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างถั่ว 1 กรัม จำนวนปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์คืน
กลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11 R_c + -0.023 \quad (r = 0.9996)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = -0.023$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		8570	1130000	0.0076	0.0276	0.0279		
Blank_2 (no SPE)		400		10700	1160000	0.0092	0.0290			
Blank_3 (no SPE)		400		8950	1260000	0.0071	0.0271			
peanut no. 1-10 (from LOD)								mean	5.85	
peanut +std 800 ng no. 1 (no SPE)	1.0677	400	375	1610000	781000	2.0615	1.8779	1.8500	694	91.8
peanut +std 800 ng no. 2 (no SPE)	1.0567	400	379	2430000	1050000	2.3143	2.1057	2.0778	788	103.3
peanut +std 800 ng no. 3 (no SPE)	1.0481	400	382	2260000	976000	2.3156	2.1068	2.0789	794	103.3
peanut +std 800 ng no. 4 (no SPE)	1.0532	400	380	2140000	870000	2.4598	2.2367	2.2088	839	109.7
peanut +std 800 ng no. 5 (no SPE)	1.0402	400	385	1440000	641000	2.2465	2.0446	2.0167	776	100.1
peanut +std 800 ng no. 6 (no SPE)	1.0570	400	378	1840000	800000	2.3000	2.0928	2.0649	781	102.4
peanut +std 800 ng no. 7 (no SPE)	1.0440	400	383	2360000	977000	2.4156	2.1969	2.1690	831	107.7
peanut +std 800 ng no. 8 (no SPE)	1.0416	400	384	2080000	894000	2.3266	2.1168	2.0889	802	103.7
peanut +std 800 ng no. 9 (no SPE)	1.0582	400	378	1830000	772000	2.3705	2.1563	2.1284	805	105.7
peanut +std 800 ng no. 10 (no SPE)	1.0406	400	384	1490000	653000	2.2818	2.0764	2.0485	787	101.6
								mean	790	102.9
								SD	39	4.8
								%RSD	4.9	4.7

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.5 เมทริกซ์ผลไม้

ง.5.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของเมทริกซ์ผลไม้ ที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 400 นาโนกรัม ในตัวอย่างกล้วย 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11 R_c + 0.000271 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.1$$

$$\text{Intercept} = 0.000271$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec	
Blank_1 (no SPE)		400		8530	1390000	0.0061	0.0053	0.0058			
Blank_2 (no SPE)		400		8070	1330000	0.0061	0.0052				
Blank_3 (no SPE)		400		13800	1760000	0.0078	0.0068				
banana no. 1-10 (from LOD)								mean	0.16		
banana +std 400 ng no. 1 (no SPE)	1.0483	400	382	1100000	982000	1.1202	1.0089	1.0031	383	100.3	
banana +std 400 ng no. 2 (no SPE)	1.0821	400	370	1320000	1130000	1.1681	1.0521	1.0463	387	104.6	
banana +std 400 ng no. 3 (no SPE)	1.0156	400	394	1490000	1250000	1.1920	1.0736	1.0678	421	106.9	
banana +std 400 ng no. 4 (no SPE)	1.0982	400	364	1410000	1180000	1.1949	1.0763	1.0705	390	107.0	
banana +std 400 ng no. 5 (no SPE)	1.0589	400	378	1450000	1210000	1.1983	1.0793	1.0735	406	107.4	
banana +std 400 ng no. 6 (no SPE)	1.0734	400	373	1080000	986000	1.0953	0.9865	0.9807	366	98.2	
banana +std 400 ng no. 7 (no SPE)	1.0623	400	377	1220000	1090000	1.1193	1.0081	1.0023	378	100.3	
banana +std 400 ng no. 8 (no SPE)	1.0181	400	393	1260000	1120000	1.1250	1.0133	1.0075	396	100.8	
banana +std 400 ng no. 9 (no SPE)	1.0609	400	377	1200000	1110000	1.0811	0.9737	0.9679	365	96.8	
banana +std 400 ng no. 10 (no SPE)	1.0265	400	390	1300000	1140000	1.1404	1.0271	1.0213	398	102.1	
									mean	389	102.4
									SD	17	3.8
									%RSD	4.5	3.7

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.5.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของเมทริกซ์ผลไม้ ที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างกล้วย 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11 R_c + 0.000271 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = 0.000271$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		8530	1390000	0.0061	0.0053	0.0058		
Blank_2 (no SPE)		400		8070	1330000	0.0061	0.0052			
Blank_3 (no SPE)		400		13800	1760000	0.0078	0.0068			
banana no. 1-10 (from LOD)								mean	0.16	
banana +std 800 ng no. 1 (no SPE)	1.0457	400	383	2110000	966000	2.1843	1.9676	1.9618	751	98.1
banana +std 800 ng no. 2 (no SPE)	1.0043	400	398	2870000	1210000	2.3719	2.1366	2.1308	848	106.4
banana +std 800 ng no. 3 (no SPE)	1.0153	400	394	2750000	1210000	2.2727	2.0473	2.0415	804	102.0
banana +std 800 ng no. 4 (no SPE)	1.0890	400	367	2630000	1150000	2.2870	2.0601	2.0543	754	102.6
banana +std 800 ng no. 5 (no SPE)	1.0848	400	369	2670000	1130000	2.3628	2.1284	2.1226	783	106.2
banana +std 800 ng no. 6 (no SPE)	1.0339	400	387	2190000	1010000	2.1683	1.9532	1.9474	754	97.4
banana +std 800 ng no. 7 (no SPE)	1.0456	400	383	2350000	1040000	2.2596	2.0354	2.0296	777	101.5
banana +std 800 ng no. 8 (no SPE)	1.0127	400	395	2330000	1040000	2.2404	2.0181	2.0123	795	100.6
banana +std 800 ng no. 9 (no SPE)	1.0649	400	376	2420000	1050000	2.3048	2.0761	2.0703	778	103.5
banana +std 800 ng no. 10 (no SPE)	1.0739	400	372	2320000	1030000	2.2524	2.0290	2.0232	753	101.1
								mean	780	101.9
								SD	30	3.0
								%RSD	3.8	2.9

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.6 แมทริกซ์ขนมปัง

ง.6.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์ขนมปัง ที่ระดับความเข้มข้น 400

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 400 นาโนกรัมในตัวอย่างขนมปัง 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปรอร์เซ็นต์ คืบกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.02 R_c + 0.0134 \quad (r = 0.9993)$$

$$\text{Slope} = 1.02$$

$$\text{Intercept} = 0.0134$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		18900	1500000	0.0126	0.0000	0.0000			
Blank_2 (no SPE)		400		16400	1570000	0.0104	0.0000				
Blank_3 (no SPE)		400		8500	1940000	0.0044	0.0000				
Blank_4 (no SPE)		400		11100	1520000	0.0073	0.0000				
bread no.1 (no_SPE)	1.0189	400	393	23200	1720000	0.0135	0.0001		0.0001	0.04	
bread no.2 (no_SPE)	1.0057	400	398	19500	988000	0.0197	0.0062		0.0062	2.47	
bread no.3 (no_SPE)	1.0671	400	375	10800	1020000	0.0106	0.0000		0.0000	0.00	
bread no. 4 (no_SPE)	1.0016	400	399	12300	924000	0.0133	0.0000		0.0000	0.00	
									mean	0.63	
bread +std 400 ng no. 1	1.0658	400	375	1090000	1030000	1.0583	1.0244		1.0244	384	102.1
bread +std 400 ng no. 2	1.0555	400	379	850000	810000	1.0494	1.0157		1.0157	385	101.4
bread +std 400 ng no. 3	1.0175	400	393	900000	866000	1.0393	1.0057		1.0057	395	100.3
bread +std 400 ng no. 4	1.0243	400	391	954000	884000	1.0792	1.0449		1.0449	409	104.6
bread +std 400 ng no. 5	1.0400	400	385	874000	847000	1.0319	0.9985		0.9985	384	99.7
bread +std 400 ng no. 6	1.0316	400	388	1150000	1040000	1.1058	1.0710		1.0710	416	107.1
bread +std 400 ng no. 7	1.0191	400	392	885000	851000	1.0400	1.0064		1.0064	395	100.5
bread +std 400 ng no. 8	1.0489	400	381	800000	793000	1.0088	0.9759		0.9759	372	97.4
bread +std 400 ng no. 9	1.0167	400	393	900000	848000	1.0613	1.0274		1.0274	404	102.5
bread +std 400 ng no. 10	1.0330	400	387	906000	873000	1.0378	1.0043		1.0043	389	100.3
									mean	393	101.6
									SD	13	2.7
									%RSD	3.3	2.7

สรุป เปรอร์เซ็นต์คืบกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.)

จ.6.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์ขนมปัง ที่ระดับความเข้มข้น 800

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างขนมปัง 1 กรัม กำหนดปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์ คืบกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.02 R_c + 0.0134 \quad (r = 0.9993)$$

$$\text{Slope} = 1.02$$

$$\text{Intercept} = 0.0134$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1 (no SPE)		400		18900	1500000	0.0126	0.0000	0.0000			
Blank_2 (no SPE)		400		16400	1570000	0.0104	0.0000				
Blank_3 (no SPE)		400		8500	1940000	0.0044	0.0000				
Blank_4 (no SPE)		400		11100	1520000	0.0073	0.0000				
bread no.1 (no_SPE)	1.0189	400	393	23200	1720000	0.0135	0.0001		0.0001	0.04	
bread no.2 (no_SPE)	1.0057	400	398	19500	988000	0.0197	0.0062		0.0062	2.47	
bread no.3 (no_SPE)	1.0671	400	375	10800	1020000	0.0106	0.0000		0.0000	0.00	
bread no.4 (no_SPE)	1.0016	400	399	12300	924000	0.0133	0.0000		0.0000	0.00	
									mean	0.63	
bread +std 800 ng no. 1	1.0738	400	373	2080000	980000	2.1224	2.0677		2.0677	771	103.4
bread +std 800 ng no. 2	1.0336	400	387	1690000	792000	2.1338	2.0789		2.0789	805	103.9
bread +std 800 ng no. 3	1.0546	400	379	1720000	835000	2.0599	2.0064		2.0064	760	100.1
bread +std 800 ng no. 4	1.0105	400	396	1810000	824000	2.1966	2.1404		2.1404	848	107.0
bread +std 800 ng no. 5	1.0029	400	399	1860000	846000	2.1986	2.1423		2.1423	855	107.1
bread +std 800 ng no. 6	1.0386	400	385	2080000	995000	2.0905	2.0363		2.0363	784	101.7
bread +std 800 ng no. 7	1.0307	400	388	1590000	760000	2.0921	2.0379		2.0379	791	101.8
bread +std 800 ng no. 8	1.0742	400	372	1730000	815000	2.1227	2.0679		2.0679	769	103.2
bread +std 800 ng no. 9	1.0583	400	378	1690000	779000	2.1694	2.1138		2.1138	799	105.6
bread +std 800 ng no. 10	1.0096	400	396	1630000	775000	2.1032	2.0488		2.0488	811	102.3
									mean	799	103.6
									SD	32	2.3
									%RSD	4.0	2.2

สรุป เปอร์เซ็นต์คืบกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.)

ง.7 แมทริกซ์กาแฟ

ง.7.1 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของแมทริกซ์กาแฟ ที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เดิมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 400 นาโนกรัมในตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่ว 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.01R_c + 0.0165 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.01$$

$$\text{Intercept} = 0.0165$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		2920	731000	0.0040	0.0000	0.0000			
Blank_2		400		5180	728000	0.0071	0.0000				
Blank_3		400		4960	404000	0.0123	0.0000				
coffee no.1-7 (from LOD)									mean	1.71	
coffee +std 400 ng no. 1 (SPE_MCX)	1.0019	400	399	769000	702000	1.0954	1.0683		1.0683	426	106.3
coffee +std 400 ng no. 2 (SPE_MCX)	1.0076	400	397	672000	625000	1.0752	1.0482		1.0482	416	104.4
coffee +std 400 ng no. 3 (SPE_MCX)	1.0071	400	397	698000	648000	1.0772	1.0502		1.0502	417	104.6
coffee +std 400 ng no. 4 (SPE_MCX)	1.0086	400	397	636000	593000	1.0725	1.0456		1.0456	415	104.2
coffee +std 400 ng no. 5 (SPE_MCX)	1.0071	400	397	610000	550000	1.1091	1.0818		1.0818	430	107.8
coffee +std 400 ng no. 6 (SPE_MCX)	1.0086	400	397	567000	537000	1.0559	1.0291		1.0291	409	102.7
coffee +std 400 ng no. 7 (SPE_MCX)	1.0067	400	397	528000	508000	1.0394	1.0127		1.0127	402	100.7
									mean	416	104.4
									SD	10	2.3
									%RSD	2.4	2.2

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ง.7.2 วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ของเมทริกซ์กาแฟ ที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ จำนวน 800 นาโนกรัม ในตัวอย่างเมล็ดกาแฟค 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ เปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.01R_c + 0.0165 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.01$$

$$\text{Intercept} = 0.0165$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)	%Rec
Blank_1		400		2920	731000	0.0040	0.0000	0.0000			
Blank_2		400		5180	728000	0.0071	0.0000				
Blank_3		400		4960	404000	0.0123	0.0000				
coffee no.1-7 (from LOD)									mean	1.71	
coffee +std 800 ng no. 1 (SPE_MCX)	1.0004	400	400	1050000	490000	2.1429	2.1053		2.1053	842	105.1
coffee +std 800 ng no. 2 (SPE_MCX)	1.0072	400	397	1070000	484000	2.2107	2.1725		2.1725	862	108.3
coffee +std 800 ng no. 3 (SPE_MCX)	1.0067	400	397	800000	375000	2.1333	2.0959		2.0959	832	104.5
coffee +std 800 ng no. 4 (SPE_MCX)	1.0066	400	397	791000	358000	2.2095	2.1713		2.1713	862	108.2
coffee +std 800 ng no. 5 (SPE_MCX)	1.0061	400	398	808000	368000	2.1957	2.1576		2.1576	859	107.8
coffee +std 800 ng no. 6 (SPE_MCX)	1.0083	400	397	790000	370000	2.1351	2.0977		2.0977	833	104.8
coffee +std 800 ng no. 7 (SPE_MCX)	1.0105	400	396	824000	388000	2.1237	2.0863		2.0863	826	104.1
									mean	845	106.1
									SD	16	1.9
									%RSD	1.9	1.8

สรุป เปอร์เซ็นต์คืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ภาคผนวก จ.

คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ใน SRM2387 peanut butter

จ.1 SRM2387 penut butter (วันที่ 1)

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.11R_c + -0.023 \quad (r = 0.9996)$$

$$\text{Slope} = 1.11$$

$$\text{Intercept} = -0.023$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1		400		8570	1130000	0.0076	0.0276	0.0279		
Blank_2		400		10700	1160000	0.0092	0.0290			
Blank_3		400		8950	1260000	0.0071	0.0271			
SRM2387 penut butter no. 1 (no_SPE)	1.0339	400	387	228000	844000	0.2701	0.2641		0.2362	91.4
SRM2387 penut butter no. 2 (no_SPE)	1.0441	400	383	158000	663000	0.2383	0.2354		0.2075	79.5
SRM2387 penut butter no. 3 (no_SPE)	1.0033	400	399	144000	613000	0.2349	0.2324		0.2045	81.6
SRM2387 penut butter no. 4 (no_SPE)	1.0104	400	396	147000	606000	0.2426	0.2393		0.2114	83.7
SRM2387 penut butter no. 5 (no_SPE)	1.0143	400	394	172000	717000	0.2399	0.2368		0.2089	82.3
SRM2387 penut butter no. 6 (no_SPE)	1.0225	400	391	183000	727000	0.2517	0.2475		0.2196	85.9
SRM2387 penut butter no. 7 (no_SPE)	1.0103	400	396	168000	711000	0.2363	0.2336		0.2057	81.5
									mean	83.7
									SD	3.9
									%RSD	4.7

สรุป ปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ยอยู่ในช่วงใบรับรองระบุ (87 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก จ.)

จ.2 SRM 2387 peanut butter (วันที่ 2)

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter 1 กรัม คำนวณ ปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.16R_c + -0.0185 \quad (r = 0.9998)$$

$$\text{Slope} = 1.16$$

$$\text{Intercept} = -0.0185$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1		400		13200	811000	0.0163	0.0300	0.0249		
Blank_2		400		7470	875000	0.0085	0.0233			
Blank_3		400		6080	897000	0.0068	0.0218			
Blank_4		400		9530	958000	0.0099	0.0245			
SRM2387 peanut butter no. 1 (no_SPE)	1.0198	400	392	147000	542000	0.2712	0.2498		0.2249	88.2
SRM2387 peanut butter no. 2 (no_SPE)	1.0648	400	376	159000	529000	0.3006	0.2751		0.2502	94.1
SRM2387 peanut butter no. 3 (no_SPE)	1.0730	400	373	150000	513000	0.2924	0.2680		0.2431	90.7
									mean	91.0
									SD	3.0
									%RSD	3.3

สรุป ปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ยอยู่ในช่วงใบรับรองระบุ (87 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

จ.3 SRM 2387 penut butter (วันที่ 3)

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter 1 กรัม คำนวณปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.03R_c + -0.00378 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.03$$

$$\text{Intercept} = -0.00378$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1		400		14300	1300000	0.0110	0.0143	0.0144		
Blank_2		400		14900	1380000	0.0108	0.0142			
Blank_3		400		20600	1690000	0.0122	0.0155			
Blank_4		400		17400	1690000	0.0103	0.0137			
SRM2387 penut butter no. 1 (no_SPE)	1.0398	400	385	279000	1100000	0.2536	0.2499		0.2355	90.7
SRM2387 penut butter no. 2 (no_SPE)	1.0592	400	378	214000	818000	0.2616	0.2577		0.2433	92.0
SRM2387 penut butter no. 3 (no_SPE)	1.0389	400	385	208000	800000	0.2600	0.2561		0.2417	93.1
									mean	91.9
									SD	1.2
									%RSD	1.3

สรุป ปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ยอยู่ในช่วงใบรับรองระบุ (87 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

จ.4 SRM 2387 penut butter (วันที่ 4) ใช้ SPE Oasis MCX

วิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter 1 กรัม กำหนดปริมาณอะคริลาไมด์ที่ตรวจพบ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{สมการของกราฟมาตรฐาน } R_r = 1.03R_c + -0.00378 \quad (r = 0.9997)$$

$$\text{Slope} = 1.03$$

$$\text{Intercept} = -0.00378$$

Sample	Wt (g)	IS (ng)	IS (ng/g)	Peak area m/z 72/55	Peak area m/z 75/58	Rr	Rc	Rc เฉลี่ย	Rc sample - Rc blank	AA (ng/g)
Blank_1		400		6560	906000	0.0072	0.0170	0.0171		
Blank_2		400		6650	858000	0.0078	0.0175			
Blank_3		400		9450	1310000	0.0072	0.0169			
SRM2387 penut butter no. 1 (SPE_MCX)	1.0818	400	370	316000	1160000	0.2724	0.2719		0.2548	94.3
SRM2387 penut butter no. 2 (SPE_MCX)	1.1548	400	346	271000	969000	0.2797	0.2789		0.2618	90.6
SRM2387 penut butter no. 3 (SPE_MCX)	1.1690	400	342	249000	846000	0.2943	0.2930		0.2759	94.4
									mean	93.1
									SD	2.2
									%RSD	2.4

สรุป ปริมาณอะคริลาไมด์เฉลี่ยอยู่ในช่วงใบรับรองระบุ (87 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ภาคผนวก ฉ.)

ภาคผนวก ฉ.

เกณฑ์การยอมรับความเที่ยงและความแม่นยำ

ฉ.1 เกณฑ์การยอมรับความเที่ยง (precision) [56]

ความเที่ยงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด ความเที่ยงจะบอกถึงความคลาดเคลื่อนสุ่ม (random error) ที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปการแสดงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 2 แบบ คือ การทวนซ้ำได้ (repeatability) หรือการทำซ้ำได้ (reproducibility)

การทวนซ้ำได้ เป็นตัวบอกความแปรปรวนที่จะเกิดขึ้นเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำๆ กันหลายครั้งในสภาวะเดียวกัน แสดงค่าในรูปของ RSD_r

การทำซ้ำได้ เป็นตัวบอกความแปรปรวนเมื่อมีการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกันแต่ต่างสภาวะ เช่น เวลาต่างกัน แสดงค่าในรูปของ RSD_R

โดยทั่วไปการระบุความเที่ยงจะแสดงด้วย %RSD แต่เนื่องจากความเที่ยงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร การประเมินการยอมรับโดยการเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation และ HORRAT (Horwitz ratio)

Horwitz equation

$$\text{สำหรับการทวนซ้ำได้} \quad \%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{ฉ.1})$$

$$\text{สำหรับการทำซ้ำได้} \quad \%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{ฉ.2})$$

โดย C คือ concentration ratio (ไม่มีหน่วย) เช่น

ปริมาณสารในตัวอย่างเป็น 1 ppm จะมีค่า $C = 10^{-6}$

ปริมาณสารในตัวอย่างเป็น 1 ppb จะมีค่า $C = 10^{-9}$

ตารางที่ ๑.1 แสดงค่า expected %RSD_r (การทวนซ้ำได้) และ RSD_R (การทำซ้ำได้) ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารที่สนใจ	C	Expected %RSD _r	Expected %RSD _R
100 %	1	1.3	2.0
10%	0.1	1.8	2.8
1%	0.01	2.6	4.0
0.1%	0.001	3.7	5.7
100 ppm	0.0001	5.2	8.0
10 ppm	0.00001	7.4	11.3
1 ppm	0.000001	10.5	16.0
100 ppb	0.0000001	14.9	22.6
10 ppb	0.00000001	21.1	32.0
1 ppb	0.000000001	29.8	45.3

HORRAT หรือ Horwitz ratio คือ อัตราส่วนระหว่างค่า RSD ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (RSD_{obs}) กับค่า RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation (RSD_{expected}) ใช้ประเมินการยอมรับความเที่ยงได้ เกณฑ์การยอมรับ น้อยกว่า 2.0

$$\text{HORRAT} = \frac{RSD_{obs}}{RSD_{expected}} \quad (\text{๑.3})$$

ผลที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ในเมทริกซ์ต่างๆ นำมาประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จากการทวนซ้ำ (repeatability) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดสอบ (%RSD_r) และที่ได้จากการคำนวณจาก Horwitz's equation ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สมการ ๑.1 ได้ expected %RSD_r และนำมาคำนวณ HORRAT จากสมการ ๑.3 ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ ๑.2 พบว่าทุกเมทริกซ์และความเข้มข้น มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยง

ตารางที่ ๓.2 แสดงผลการคำนวณ HORRAT ของแต่ละระดับความเข้มข้นในชนิดตัวอย่างต่างๆ

ชนิดตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	C (concentration ratio)	Expected %RSD _r	RSD _r (%)	HORRAT
ข้าว	20	0.000000020	19.0	10.3	0.54
	400	0.000000400	12.1	3.7	0.31
	800	0.000000800	10.9	2.6	0.24
ข้าวโพด	20	0.000000020	19.0	8.6	0.45
	400	0.000000400	12.1	2.9	0.24
	800	0.000000800	10.9	4.5	0.41
มันฝรั่ง	20	0.000000020	19.0	10.9	0.57
	400	0.000000400	12.1	5.4	0.45
	800	0.000000800	10.9	2.0	0.18
ถั่ว	30	0.00000003	17.9	5.2	0.29
	400	0.000000400	12.1	8.6	0.71
	800	0.000000800	10.9	4.9	0.45
ผลไม้	20	0.000000020	19.0	8.2	0.43
	400	0.000000400	12.1	4.5	0.37
	800	0.000000800	10.9	3.8	0.35
ขนมปัง	20	0.000000020	19.0	8.1	0.43
	400	0.000000400	12.1	3.3	0.27
	800	0.000000800	10.9	4.0	0.37
เมล็ดกาแฟ	20	0.000000020	19.0	10.2	0.54
	400	0.000000400	12.1	2.4	0.20
	800	0.000000800	10.9	1.9	0.17

การศึกษาค่าความเที่ยง 2 รูปแบบ คือ การทวนซ้ำได้ และการทำซ้ำได้ เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter ภายในวันเดียว และระหว่างวัน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดลอง % RSD_r (ภายในวันเดียว) และ % RSD_r (ระหว่างวัน) และที่ได้จากการคำนวณจาก Horwitz's equation ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สมการ ๓.1 และ ๓.2 ตามลำดับ ได้ expected %RSD_r และ expected %RSD_r และนำมาคำนวณ HORRAT จากสมการ ๓.3 ผลการคำนวณแสดงในตารางที่ ๓.2 พบว่าการวิเคราะห์ภายในวันเดียวและระหว่างวัน มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงในการทวนซ้ำได้ (repeatability) และการทำซ้ำได้ (reproducibility)

ตารางที่ ๓.3 แสดงผลการคำนวณ HORRAT ของการวิเคราะห์ตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter ภายในวันเดียว (intra-day) และ ระหว่างวัน (inter-day)

ชนิดตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	C (concentration ratio)	Expected %RSD _r	Expected %RSD _R	RSD _r (%)	RSD _R (%)	HORRAT
Intra-day วันที่ 1	87.0	0.000000087	15.2	-	4.7	-	0.31
Intra-day วันที่ 2	87.0	0.000000087	15.2	-	3.3	-	0.22
Intra-day วันที่ 3	87.0	0.000000087	15.2	-	1.3	-	0.09
Intra-day วันที่ 4	87.0	0.000000087	15.2	-	2.4	-	0.16
Inter-day วันที่ 1-4	87.0	0.000000087	-	23.1	-	5.9	0.26

๓.2 เกณฑ์การยอมรับความแม่นยำ (accuracy) [56]

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงในรูปเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) ซึ่งเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์คืนกลับ ได้มีแนวทางกำหนดจาก The AOAC Manual for the Peer Verified Methods Program (1993) ดังแสดงตาราง

ตารางที่ ๓.4 เกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ระดับความเข้มข้น	% recovery
100 %	98-102
> 10 %	98-102
> 1 %	97-103
> 0.1 %	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

ภาคผนวก ข.

การประเมินความถูกต้องและช่วงของความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ย

ข.1 การประเมินความถูกต้อง (Trueness) [56]

Trueness คือคุณสมบัติที่บ่งบอกว่า ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยแค่ไหน ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงเรียกว่า ความเบี่ยงเบน (bias) การประเมิน trueness ของวิธีวิเคราะห์จึงทำได้โดยการเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง โดยใช้สถิติที่เหมาะสม

การประเมิน trueness โดยเปรียบเทียบกับค่าจริงของ SRM โดยใช้สถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยคำนวณค่า t จาก

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{(SD/\sqrt{n})} \quad (\text{ข.1})$$

t เป็นอัตราส่วนระหว่าง bias ($= \bar{x} - \mu$) ซึ่งแสดงถึงความคลาดเคลื่อนแบบ systematic error กับ standard error $\left(\frac{SD}{\sqrt{n}}\right)$

μ คือ ค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ n ครั้ง และ SD

เปรียบเทียบ ค่า t ที่ได้จากการคำนวณ กับค่า critical (t_c) จากตาราง ค่านี้ขึ้นอยู่กับ confidence level และค่า degree of freedom (df) ถ้า ค่า t น้อยกว่า t_c แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง ค่าจากการทดลองกับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง SRM 2387 peanut butter ซึ่งระบุค่า reference concentration value ของสารอะคริลาไมด์ เท่ากับ 87.0 ± 7.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำการตรวจวิเคราะห์ตามขั้นตอนจำนวน 7 ซ้ำ แสดงผลดังตาราง

ตารางที่ ข.1 แสดงปริมาณอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง SRM2387 peanut butter

ลำดับ	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
1	91.4
2	79.5
3	81.6
4	83.7
5	82.3
6	85.9
7	81.5
ค่าเฉลี่ย	83.7
SD	3.9

$$\text{การคำนวณค่า } t = \frac{|83.7 - 87.0|}{(3.9/\sqrt{7})} = 2.2$$

ค่า t_c จากตารางที่ ข.2 โดยเลือก $df = n - 1 = 6$ และที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ได้ค่า t_c เท่ากับ 2.45 จากการคำนวณโดยไม่ต้องคำนึงถึงเครื่องหมาย เมื่อเปรียบเทียบกับค่า t_c พบว่า $t < t_c$ แสดงว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลังตรวจสอบความถูกต้องนั้นไม่แตกต่างจากค่าที่ใบรับรองระบุ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แสดงว่า trueness ของวิธีนี้ยอมรับได้

ข.2 การหาช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval) ของค่าเฉลี่ย [56]

การวิเคราะห์วัตถุตัวอย่างซ้ำๆกันหลายครั้งทำให้เราทราบค่า \bar{x} ซึ่งเป็นค่าประมาณของ μ

$$CI = \bar{x} \pm \frac{t * SD}{\sqrt{n}} \quad (\text{ข.2})$$

จากตารางที่ ข.1 ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ เท่ากับ 83.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม SD เท่ากับ 3.9 และ n เท่ากับ 7 ซ้ำ ซึ่ง t ได้จากตารางที่ ข.2 โดยเลือกที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ df เท่ากับ 6 ได้ค่า t_c เท่ากับ 2.45

$$\text{ดังนั้น } CI = 83.7 \pm \frac{2.45 * 3.9}{\sqrt{7}} = 83.7 \pm 3.6 \text{ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม}$$

ตารางที่ ข.2 The t-distribution (two-tailed)

Degree of freedom	Confidence level			
	90%	95%	98%	99%
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.80	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
α	1.64	1.96	2.33	2.58

ภาคผนวก ข.

การศึกษาการสูญเสียอะคริลาไมด์เมื่อเป่าแห้ง

ข.1 กรณีที่ไม่ใช้ ²D₃- อะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

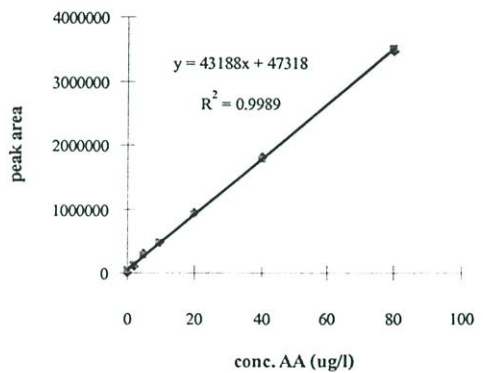
ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารละลายตัวอย่างเดิมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในสารละลายผสม เมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตรให้มีเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร (ไม่มีอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) เตรียมจำนวน 3 ซ้ำ (No. 1-3) นำสารละลายที่เตรียมจำนวน 0.7 มิลลิลิตร ลงในขวด derivatize เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนหรือให้เหลือน้อยกว่า 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำจำนวน 0.7 มิลลิลิตร ปิดฝา ปั่นด้วยเครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลองประมาณ 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่าน syring filter ชนิดไนลอนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS

ผลการศึกษา

สร้างกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารที่สนใจ (m/z 72/55) กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโดยใช้สมการถดถอย (regression line) โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the method of least squares) ได้สมการ $y = 43188x + 47318$ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.9989

ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ (µg/l)	พื้นที่ใต้พีคของอะคริลาไมด์ (m/z 72/55)
0	0
2	93800
5	311000
10	470000
20	947000
40	1820000
80	3470000



ผลการวิเคราะห์

	พื้นที่ใต้พีคของอะคริลาไมด์ (m/z 72/55)	ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ จากกราฟมาตรฐาน (µg/l)
สารละลายตัวอย่าง No.1	1350000	30.2
สารละลายตัวอย่าง No. 2	1340000	29.9
สารละลายตัวอย่าง No. 3	1240000	27.6
	เฉลี่ย	29.2
	% recovery	73.0

ซ.2 กรณีที่ใช้ 2d_3 -อะคริลาไมด์เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

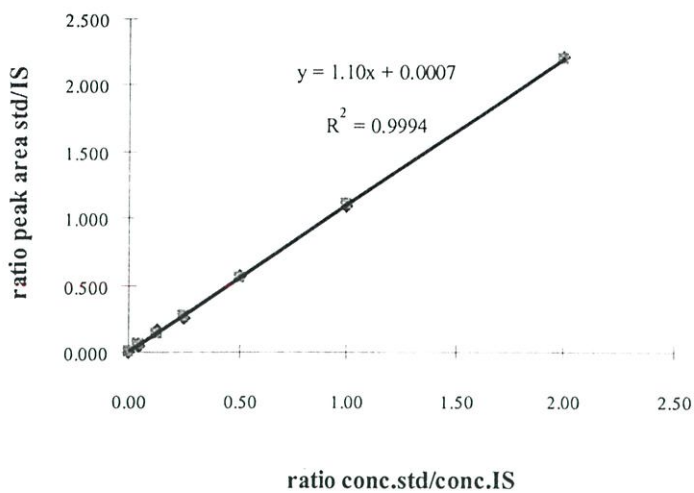
ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารละลายตัวอย่างเดิมสารละลายมาตรฐานอะคริลาไมด์ในสารละลายผสมเมทานอลในน้ำ 70 % โดยปริมาตรให้มีเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 2d_3 -อะคริลาไมด์ เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อลิตร เตรียมจำนวน 3 ซ้ำ (No.I-III) นำสารละลายที่เตรียมจำนวน 0.7 มิลลิลิตร ลงในขวด derivatize เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนหรือให้เหลือน้อยกว่า 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำจำนวน 0.7 มิลลิลิตร ปิดฝา ปั่นด้วยเครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลองประมาณ 1 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่าน syringe filter ชนิดในลอนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-ESI-MS/MS

ผลการศึกษา

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ได้พีคของสารละลายอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (แกน y) และอัตราส่วนของความเข้มข้นสารละลายอะคริลาไมด์ต่ออินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (แกน x) ได้สมการ $y = 1.10x + 0.0007$ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.9994

ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ($\mu\text{g/l}$)	ความเข้มข้นของ 2d_3 -อะคริลาไมด์ (IS) ($\mu\text{g/l}$)	อัตราส่วนของความเข้มข้น	พื้นที่ได้พีคของอะคริลาไมด์ (m/z 72/55)	พื้นที่ได้พีคของ 2d_3 -อะคริลาไมด์ (IS) (m/z 75/58)	อัตราส่วนของพื้นที่ได้พีค
0	40	0.00	0	2160000	0.000
2	40	0.05	93800	2010000	0.047
5	40	0.12	311000	1840000	0.169
10	40	0.25	470000	1900000	0.247
20	40	0.50	947000	1670000	0.567
40	40	1.00	1820000	1660000	1.096
80	40	2.00	3470000	1570000	2.210



ผลการวิเคราะห์

	ความเข้มข้นของ ² d ₃ -อะคริลาไมด์ (µg/l)	พื้นที่ใต้พีคของ อะคริลาไมด์ (m/z 72/55)	พื้นที่ใต้พีคของ ² d ₃ -อะคริลาไมด์ (m/z 75/58)	อัตราส่วนของ พื้นที่ใต้พีค	ความเข้มข้นที่ คำนวณได้ (µg/l)
สารละลายตัวอย่าง No. I	40	1310000	1170000	1.120	40.7
สารละลายตัวอย่าง No. II	40	1340000	1240000	1.081	39.3
สารละลายตัวอย่าง No. III	40	1320000	1200000	1.100	40.0
				เฉลี่ย	40
				% recovery	100

ภาคผนวก ฉ.

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร

ฉ.1 ขนมอบกรอบหรือขนมอบกรอบบรรจุของ

ตารางที่ ฉ.1 ปริมาณอะคริลาไมด์ในขนมอบกรอบหรือขนมอบกรอบบรรจุของ โดยแบ่งเป็นประเภทต่างๆตามวัตถุดิบ

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				
	ข้าวและ แป้งจากข้าว	ข้าวโพดและ แป้งข้าวโพด	มันฝรั่ง แป้งมันฝรั่ง	มันชนิดอื่นๆ	ถั่วและ เมล็ดพืช
	26.3	31.8	604	363	141
	88.3	488	897	60.9	48.4
	276	202	1,336	78.3	28.3
	439	น้อยกว่า 20.0	2,016	85.7	ไม่พบ
	57.0	95.8	3,466		น้อยกว่า 30.0
	20.1	22.7	701		น้อยกว่า 30.0
	761	ไม่พบ	528		น้อยกว่า 30.0
	59.2	63.6	2,676		45.1
	ไม่พบ	57.7	1,398		131
	น้อยกว่า 20.0	43.2			49.0
	81.4	25.5			60.0
	75	47.1			ไม่พบ
	296	108			43.0
	23.4	200			
		95.0			
		57.2			
		41.5			
จำนวนตัวอย่าง	14	17	9	4	13
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ไม่พบ	ไม่พบ	528	60.9	ไม่พบ
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	761	488	3,466	363	141
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	67.1	57.2	1,336	82	43.0

ฉ.2 ขนมหรีอของว่างไทย

ตารางที่ ฉ.2 ปริมาณอะคริลาไมด์ในขนมหรีอของว่างไทยโดยแบ่งเป็นประเภทต่างๆตามวัตถุดิบ

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
	ข้าวและแป้งจากข้าว	มัน เผือก	ถั่ว
	44.0	70.7	53.7
	259	136	น้อยกว่า 30.0
	น้อยกว่า 20.0	457	น้อยกว่า 30.0
	น้อยกว่า 20.0	24.8	53.9
	น้อยกว่า 20.0	50.6	33.8
	58.9	34.9	34.7
	30.6	496	56.0
	137	56.2	น้อยกว่า 30.0
	139		
	240		
	น้อยกว่า 20.0		
	21.9		
	41		
	65.3		
	207		
	27.3		
	29.3		
	286		
	347		
	219		
	40.5		
	น้อยกว่า 20.0		
	น้อยกว่า 20.0		
	น้อยกว่า 20.0		
	24.2		
	37.8		
	น้อยกว่า 20.0		
	98.7		
	117		
	49.4		
	272		
	166		
จำนวนตัวอย่าง	32	8	8
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	น้อยกว่า 20.0	24.8	น้อยกว่า 30.0
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	347	496	56
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	42.5	63.4	34.2

ฉ.3 ขนมปัง บิสกิต แครกเกอร์ คุกกี้และเวเฟอร์

ตารางที่ ฉ.3 ปริมาณอะคริลาไมด์ในขนมปัง บิสกิต แครกเกอร์ คุกกี้และเวเฟอร์

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	486
	403
	น้อยกว่า 20.0
	22.8
	266
	171
	240
	39.3
	ไม่พบ
	23.7
	45.2
	97.2
	123
	น้อยกว่า 20.0
	ไม่พบ
	น้อยกว่า 20.0
	ไม่พบ
	24.0
	111
	55.6
	234
	น้อยกว่า 20.0
	134
	303
จำนวนตัวอย่าง	24
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ไม่พบ
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	486
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	50.4

ณ.4 เฟรนฟรายด์

ตารางที่ ณ.4 ปริมาณอะคริลาไมด์ในเฟรนฟรายด์

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	220
	482
จำนวนตัวอย่าง	2
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	220
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	482
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	351

ณ.5 ัญพืชอาหารเช้า

ตารางที่ ณ.5 ปริมาณอะคริลาไมด์ในัญพืชอาหารเช้า

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	28.6
	44.6
	154
จำนวนตัวอย่าง	3
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	28.6
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	154
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	44.6

ณ.6 บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป

ตารางที่ ณ.6 ปริมาณอะคริลาไมด์ในบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	136
	166
	203
	190
	137
	103
จำนวนตัวอย่าง	6
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	103
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	203
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	152

ฉ.7 ผักและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

ตารางที่ ฉ.7 ปริมาณอะคริลาไมด์ในผักและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	152
	34.0
	60.4
	น้อยกว่า 20.0
	628
	ไม่พบ
	32.8
	ไม่พบ
	ไม่พบ
	315
	น้อยกว่า 20.0
	ไม่พบ
	น้อยกว่า 20.0
	ไม่พบ
	35.7
	ไม่พบ
	ไม่พบ
จำนวนตัวอย่าง	18
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ไม่พบ
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	628
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	น้อยกว่า 20.0

ฉ.8 กาแฟสำเร็จรูป

ตารางที่ ฉ.8 ปริมาณอะคริลาไมด์ในกาแฟสำเร็จรูป

	ปริมาณอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	37.2
	409
	404
จำนวนตัวอย่าง	3
ค่าต่ำสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	37.2
ค่าสูงสุด ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	409
ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	404

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพนาวลัย กิ่งกลางคอน
วัน เดือน ปีเกิด 8 ตุลาคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดนครราชสีมา
ที่อยู่ 64/100 ซอยข้างซอยสถาบันบำราศนราดูร ถ. ดิวานนท์ ต.ตลาดขวัญ
อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000 โทร 0-2951-1466
ประวัติการศึกษา 2538 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประสบการณ์การทำงาน
พ.ศ. 2538 -2540 ตำแหน่งนักเคมี บริษัทเอช.เค. ฟาร์มาชูติคัล จำกัด
พ.ศ. 2540 –ปัจจุบัน รัฐบาล ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 6ว
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ผลงานวิจัย

1. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “สถานการณ์สารบอแรกซ์ในอาหาร” วารสารเวชศาสตร์สิ่งแวดล้อม ปีที่ 1 (ก.ค-ธ.ค) พ.ศ. 2542
2. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “การพัฒนารูปแบบชุดทดสอบกรดแเรออิสระในน้ำส้มสายชู” การประชุมวิชาการงานคุ้มครองผู้บริโภคด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2542
3. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “โครงการผลิตซอสปรุงรสเพื่อลดสาร 3-MCPD” การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์แห่งชาติ พ.ศ. 2544
4. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “การสำรวจวิจัยปริมาณสาร 3-MCPD ในผลิตภัณฑ์ปรุงรสในประเทศไทย” การประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 13 พ.ศ.2545
5. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “การศึกษาปริมาณโลหะเป็นพิษที่คนไทยบริโภคจริงต่อวัน ปี พ.ศ. 2542- 2544” วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 47 ฉบับที่ 4 พ.ศ. 2548
6. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “สถานการณ์การปนเปื้อนสาร 3-MCPD ในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ผลิตในประเทศไทย” วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2549