

# การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Benzo (a) Pyrene ในน้ำมันบริโภค

จิตตภา สันต์ตรบ และกนกพร อธิสุข

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Benzo (a) pyrene (BaP) ในน้ำมันบริโภคซึ่ง BaP เป็น marker ของสารกลุ่ม Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ในน้ำมันบริโภค เนื่องจากองค์การอนามัยโลกกำหนดเป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์ วิธีที่พัฒนาขึ้นนำไปใช้ในการสำรวจปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภคที่จำหน่ายในประเทศ ผู้วิจัยได้ศึกษาและเลือกใช้เทคนิค liquid-liquid extraction ร่วมกับ solid phase extraction (SPE) ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ BaP ด้วย HPLC-Fluorescence detector จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) พบว่ามีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี มีความจำเพาะเจาะจง คือสาร BaP ให้พีคที่เวลา 15.3 นาที โดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น มีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคตลอดช่วงความเข้มข้น 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารมาตรฐานที่เติมกับความเข้มข้นที่ตรวจพบในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) เท่ากับ 0.9997 และ 0.9996 ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ ได้ค่า mean recovery อยู่ในช่วงเท่ากับร้อยละ 81-86 และมีความเที่ยง (precision) ทั้ง repeatability แสดงด้วยค่า %RSD อยู่ในช่วงร้อยละ 3.2-7.4 และ within-laboratory reproducibility เท่ากับร้อยละ 86 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดได้ค่า relative standard uncertainty เท่ากับ 15.6% โดยค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (Relative expanded uncertainty, U) เท่ากับ 31.2% เมื่อนำวิธีที่พัฒนา มาสำรวจปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภค ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2556 รวม 126 ตัวอย่าง พบสาร BaP 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.0 ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ในช่วงน้อยกว่า 1.0 ถึง 21.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมี 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมันเมล็ดชาน้ำมันรำข้าว น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันที่ไม่ระบุหรือไม่ทราบชนิด ตรวจพบปริมาณ BaP สูงกว่ามาตรฐานปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Maximum Limit, ML) ในน้ำมันและไขมันบริโภคที่สหภาพยุโรปกำหนดไว้ที่ปริมาณ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

Accepted for publication, 22 September 2015

## บทนำ

นอกจากกลุ่มอาหารปิ้งย่างที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารประกอบในกลุ่มโพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) แล้ว<sup>(1)</sup> อาหารซึ่งเกิดจากกระบวนการแปรรูป ชนิดอื่นก็มีความเสี่ยงเช่นเดียวกัน เช่น น้ำมันที่ใช้บริโภคหรือปรุงอาหาร ซึ่งเป็นน้ำมันพืชผ่านกรรมวิธี (refined vegetable oil) ที่ได้จากกระบวนการสกัดในระบบอุตสาหกรรม เนื่องจากกระบวนการผลิตต้องใช้ความร้อนหลาย ขั้นตอน ได้แก่ การนำเมล็ดพืชมาผ่านความร้อน แล้วบดละเอียด สกัดน้ำมันออกจากเมล็ดพืชด้วย hexane แยก กากออก นำไประเหยไล่ hexane จากนั้นเติม phosphoric acid เพื่อกำจัดยางเหนียว (gum) แล้วเติม sodium hydroxide เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระบางชนิด แล้วล้างด้วยน้ำ น้ำมันพืชที่ผ่านการล้างจะมีน้ำเจือปน จึงต้องใช้เครื่อง หมุนเหวี่ยง (centrifuge) จากนั้นนำไปต้มกลั่นเพื่อไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 220–230 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ สูญญากาศเพื่อมิให้น้ำมันไหม้จนเกิดสีเหลืองคล้ำ หลังจากต้มกลั่นแล้ว นำไปฟอกสีโดยต้มกับถ่านที่อุณหภูมิ 175 – 225 องศาเซลเซียส เติมก๊าซไนโตรเจน เพื่อป้องกันการเหม็นหืนและเติมวิตามินอีสังเคราะห์ลงไปทดแทนวิตามินอี ที่สูญเสียไปจากกระบวนการผลิต แล้วจึงนำมาบรรจุขวดออกจำหน่าย เบนโซ (เอ) ไพรีน [benzo (a) pyrene; BaP] เป็นสารประกอบในกลุ่ม PAHs และใช้เป็น marker ของการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ในอาหาร มีรายงานว่า สารนี้เกิดพิษในสัตว์ทดลองหลายระบบ เช่น ในหนู หากได้รับสารนี้ในขณะตั้งท้อง ตัวอ่อนจะมีลักษณะผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ไซส์นหลัง มีพิษต่อยีนทางพันธุกรรม (genotoxic) และก่อมะเร็ง<sup>(2)</sup> การตรวจ วิเคราะห์สารนี้ในน้ำมันบริโภคมีรายงานการศึกษาพัฒนาวิธีไว้หลายรูปแบบเทคนิคที่ใช้ส่วนใหญ่ใช้การสกัด (extract) แบบ liquid-liquid extraction ก่อน แล้วกำจัดสารรบกวนที่เหลืออีกโดยใช้ Solid Phase Extraction (SPE)<sup>(3-7)</sup> ซึ่ง packing ของ SPE มีหลายชนิด เช่น alumina-N, C8, C18, florisil, silica หรือใช้เทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC)<sup>(4)</sup> โดยผสมตัวอย่างน้ำมันบริโภคร่วมกับตัวทำละลายแล้วผ่านเข้า GPC column ซึ่งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ BaP โดยเทคนิค GC-MS<sup>(6)</sup>, GC-TOFMS<sup>(8)</sup> และ HPLC-fluorescence detector<sup>(3, 4, 7)</sup> ผู้วิจัยได้ศึกษาและเลือกเทคนิคที่เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเป็นหลัก ก่อน โดยสกัดตัวอย่างด้วย liquid-liquid extraction ร่วมกับ solid phase extraction (SPE) ซึ่งได้พัฒนาวิธี การสกัดและการเลือกใช้ SPE ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณของ BaP ทำการทดสอบ ความถูกต้องของวิธี (Method validation) โดยศึกษาช่วงวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง ความจำเพาะเจาะจง ชัดจำกัดของการตรวจพบ ชัดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ ความเที่ยง ร้อยละของการคืนกลับและการประมาณค่า ความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์ ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้สำรวจปริมาณการปนเปื้อนของ BaP ในน้ำมันพืช ผ่านกรรมวิธีที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีรายงานข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของสารดังกล่าว

## วัสดุและวิธีการ

### สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : acetonitrile, hexane และ methanol (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Burdick & Jackson Laboratories, Inc., sodium chloride (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck, sodium sulfate anhydrous (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Fisher chemical และน้ำปราศจากไอออน (deionized water, Type I) ผลิตจาก เครื่องของ Millipore

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

### การเตรียมสารละลายและสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน BaP 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐาน BaP 2.5 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ใช้เป็น stock standard solution

สารละลาย acetonitrile ที่อิมัตัวด้วย hexane (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) : เตรียมโดยเติม acetonitrile 250 มิลลิลิตรและ hexane 100 มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น สารละลาย acetonitrile (ชั้นล่าง) ใช้ในการสกัด

### เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.01 และ 1 มิลลิกรัม (Sartorius), ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi), HPLC system (Agilent 1100 Series) ประกอบด้วย quaternary pump, autosampler, คอลัมน์ PAH C18 ขนาด 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร, column oven, เครื่องตรวจวัดชนิด fluorescence, erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร, glass syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร, hand pump ประกอบด้วย syringe ขนาด 20 มิลลิลิตร และ plunger, round-bottom flask ขนาด 50, 125 และ 250 มิลลิลิตร, screw cap vial ขนาด 2 มิลลิลิตร, separatory funnel ขนาด 125 และ 500 มิลลิลิตร, sep-pak ชนิด C18 plus (Waters), syringe filter PTFE 0.20 ไมโครเมตร ขนาด 13 มิลลิเมตร

### ตัวอย่าง

ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีใช้น้ำมันมะกอกเป็น matrix blank ส่วนการสำรวจการปนเปื้อนของ BaP ในน้ำมัน ได้วิเคราะห์น้ำมันบริโภคที่ผลิตทั้งภายในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศจากปีงบประมาณ 2551 - 2556 รวม 126 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันงาผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันรำข้าว น้ำมันสลัดและน้ำมันอะโวคาโด

### วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 1.0 กรัม ใส่ใน separatory funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม hexane 15 มิลลิลิตร แก้วเบาๆ ให้รวมตัวกับตัวอย่าง สกัดด้วยสารละลาย acetonitrile ที่อิมัตัวด้วย hexane จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ 2 นาที แยกชั้น acetonitrile ใส่รวมใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร, สารละลาย sodium chloride ที่อิมัตัว 10 มิลลิลิตรและสกัดด้วย hexane 25 มิลลิลิตร เขย่านาน 2 นาที ตั้งทิ้งให้แยกชั้น ไช้ชั้นล่าง (aqueous layer) ลงใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร ใบท้ 2 แล้วสกัดด้วย hexane จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร เขย่านาน 2 นาที ไช้ชั้นล่างทิ้ง รวมชั้น hexane ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง เข้าด้วยกัน ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง โดยการแกว่งเบาๆ ไช้ชั้นน้ำทิ้ง (ชั้นล่าง) จากนั้นไช้ชั้น hexane ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร กำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous แล้วกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรองใส่ใน round-bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วเติม acetonitrile 2 มิลลิลิตร เพื่อดำเนินการกำจัดสารรบกวนที่เหลือในสารสกัดตัวอย่างด้วย sep-pak C18 plus ต่อไป

เตรียม sep-pak C18 plus โดยต่อเข้ากับ syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร ล้างด้วย acetonitrile 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผ่านสารที่สกัดได้จากตัวอย่างลงไป ใช้ flow rate ประมาณ 2 หยดต่อวินาที ใส่ใน round-bottom flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้ sep-pak แห้ง แล้วเติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ (eluent) เก็บสารละลาย

ส่วนที่ผ่านออกมา นำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เติม methanol 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน syringe filter PTFE เก็บใน screw cap vial ขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

#### สภาวะเครื่อง HPLC

Column	: PAH C18, 5 ไมโครเมตร ขนาด 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร
Mobile phase	: acetonitrile: deionized water (80:20)
Flow rate	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
Column oven	: 40 องศาเซลเซียส
Detector	: Fluorescence ที่ความยาวคลื่น Ex 264 นาโนเมตร, Em 410 นาโนเมตร
Injection volume	: 10 ไมโครลิตร

ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน BaP ความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ซ้ำ เหนือข้อมูรบค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบดังนี้

%RSD ของ retention time < 0.3

%RSD ของ peak area ≤ 2

tailing factor < 2

#### การทดสอบความถูกต้องของวิธี

##### การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

โดยการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank : สกัดสารเคมีที่ใช้ทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

matrix blank : สกัดตัวอย่างน้ำมันมะกอกตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา (3 ซ้ำ)

ฉีด method blank, matrix blank และสารละลายมาตรฐาน BaP ความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าระบบ HPLC เพื่อตรวจสอบการแยกของสาร BaP จากสารรบกวนอื่นในตัวอย่าง ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

##### การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน BaP ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient : r) ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1

ทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธี โดยเติมสารละลายมาตรฐาน BaP ในน้ำมันมะกอกที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1

##### การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐาน BaP ในน้ำมันมะกอกที่ระดับต่ำๆ วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่า LOD เท่ากับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ให้พีคที่มีความสูงเท่ากับ 3 เท่า signal to noise ratio คำนวณความเข้มข้นในตัวอย่างเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

**การทดสอบขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)**

ทดสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐาน BaP ในน้ำมันมะกอกประมาณ 2 เท่าของค่า LOD วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณ BaP ในตัวอย่าง แล้วคำนวณ %recovery ซึ่งต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 60-120 และ %RSD ซึ่งต้องไม่เกิน  $2 \text{ Predicted RSD}_r$  ตาม Horwitz's equation

**การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง (Percent recovery and precision)**

ทดสอบร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐาน BaP ในน้ำมันมะกอกที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ที่ระดับละ 10 ซ้ำ แล้ว คำนวณ %recovery และ %RSD โดยมีเกณฑ์การยอมรับ<sup>(9)</sup> ดังนี้

%recovery ช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ 60 – 120

%RSD<sub>r</sub> ≤  $2 \text{ Predicted RSD}_r$  ตาม Horwitz's equation

**การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)<sup>(10)</sup>**

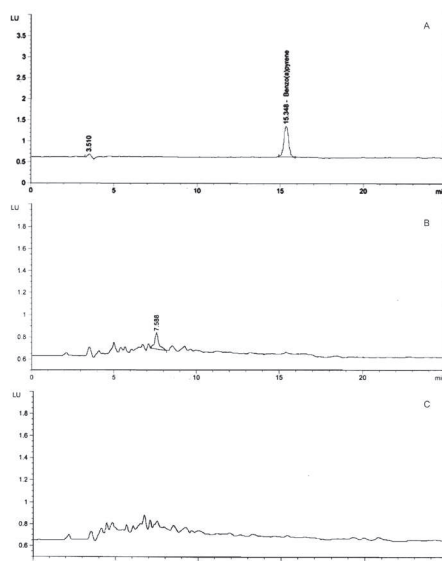
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยใช้องค์ประกอบของความไม่แน่นอนที่เกี่ยวข้อง นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ coverage factor เท่ากับ 2

**ผล****การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ**

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ซ้ำ ได้ค่า %RSD ของ retention time และ peak area เท่ากับ 0.917 และ 1.254 ตามลำดับ และค่า tailing factor เท่ากับ 1.086

**การทดสอบความจำเพาะเจาะจง**

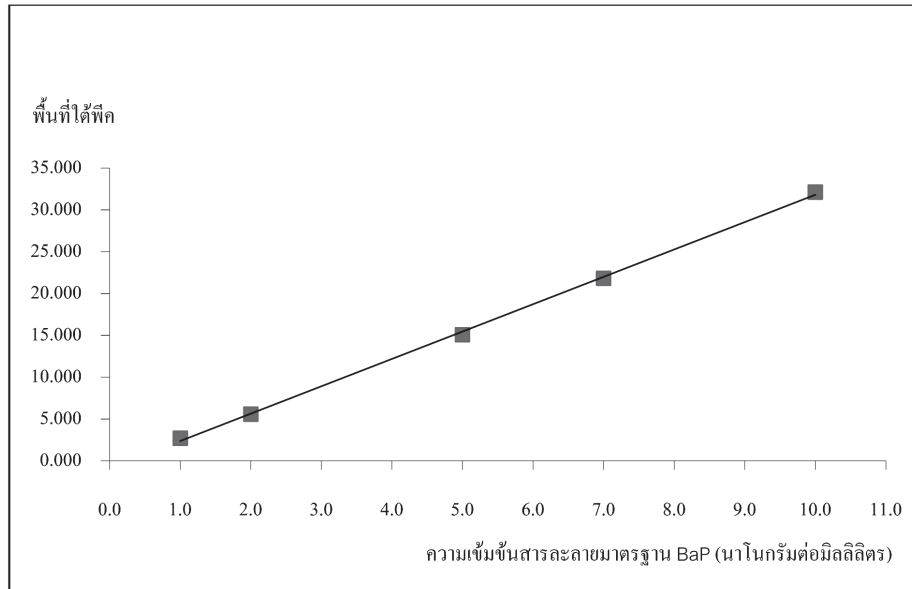
จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน, method blank และ matrix blank พบว่าไม่มี peak รบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง โดยสาร BaP ให้ค่า retention time เท่ากับ 15.3 นาที (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน BaP (A), method blank (B) และ matrix blank (C)

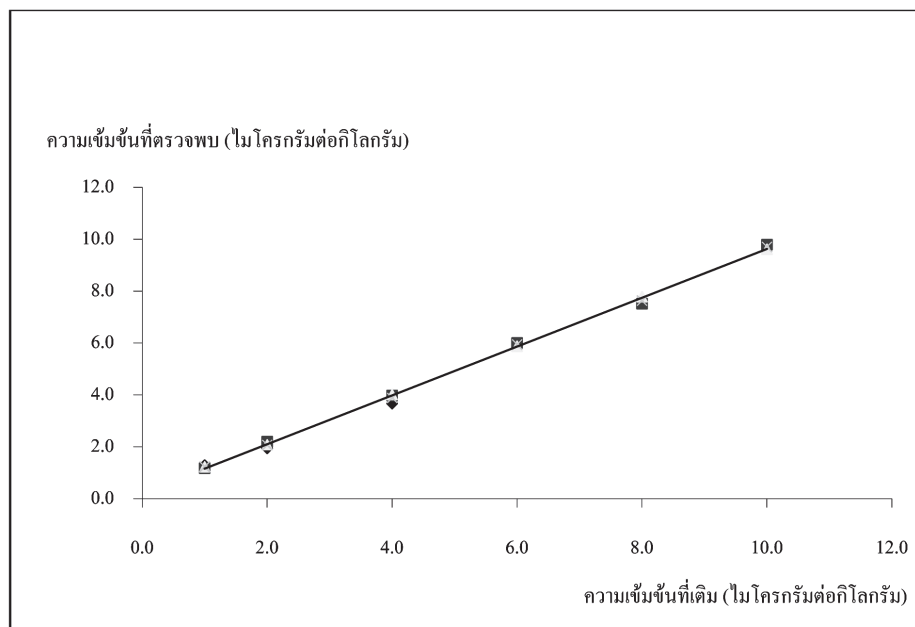
### การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน BaP กับพื้นที่ใต้พีค พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตลอดช่วงความเข้มข้น 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.9997 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน benzo (a) pyrene

จากการวิเคราะห์ปริมาณ BaP ในตัวอย่างน้ำมันมะกอกที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมระดับละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BaP ที่เติมในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.9996 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับความเข้มข้นที่ตรวจพบของ BaP ในน้ำมันมะกอก

**การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ**

ผลการทดสอบได้ค่า LOD ที่ระดับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า signal-to-noise จากการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง เท่ากับ 22.1, 27.6 และ 27.4 ตามลำดับ ส่วนค่า LOQ เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดย %recovery เฉลี่ย จากการเติมสารละลายมาตรฐาน BaP ในตัวอย่างน้ำมันมะกอก ซึ่งวิเคราะห์ 10 ซ้ำเท่ากับ 81.2% และ %RSD เท่ากับ 3.7%

**การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง**

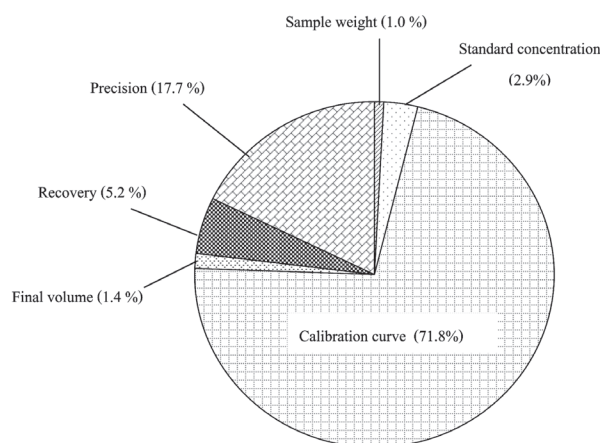
การทดสอบร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงด้วยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 80.5–85.9% และค่า %RSD<sub>r</sub> เท่ากับ 3.7, 7.4, 3.2 และ 3.2% ตามลำดับ ซึ่งไม่เกินค่า Predicted RSD<sub>r</sub> จาก Modified Horwitz's equation<sup>(9)</sup> (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับและความเที่ยงเมื่อเติมสารมาตรฐาน BaP ที่ระดับต่างๆ ในน้ำมันบริโภค (n = 10)

Spiked level (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	%Recovery (mean ± SD)	%RSD <sub>r</sub>	%Predicted RSD <sub>r</sub>
1.0	81.2 ± 3.0	3.7	29.6
2.0	85.9 ± 6.4	7.4	26.7
5.0	83.3 ± 2.7	3.2	23.4
10.0	80.5 ± 2.6	3.2	21.1

**การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด**

องค์ประกอบความไม่แน่นอนได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่างและสารมาตรฐาน ใบรับรองผลการสอบเทียบเครื่องชั่ง ใบรับรองความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานและเครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ (precision) การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (recovery) และความไม่แน่นอนของสาร BaP ในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จาก calibration curve โดยประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ (ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ได้ค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (Relative expanded uncertainty) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่าเท่ากับ 31.2% (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ BaP ในน้ำมันบริโภค

### การสำรวจปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภค

จากการสำรวจปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภคที่จำหน่ายในประเทศ ในปี พ.ศ. 2551 – 2556 จำนวน 126 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ผลิตในประเทศ 69 ตัวอย่าง และนำเข้าจากต่างประเทศ 57 ตัวอย่าง โดยนำเข้าจากประเทศกรีซ อิตาลี ญี่ปุ่น ตุรกี มาเลเซีย สิงคโปร์ สเปน และสหราชอาณาจักร พบว่า น้ำมันคาโนลา น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันสลัด และน้ำมันอะโวคาโด รวม 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.9) ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของ BaP ทุกตัวอย่าง ส่วนน้ำมันข้าวโพด น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันรำข้าวและน้ำมันที่ไม่ระบุหรือไม่ทราบชนิด ตรวจพบการปนเปื้อนจำนวน 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 27.0) ปริมาณที่ตรวจพบ น้อยกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ถึง 21.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในจำนวนนี้พบว่า น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันที่ไม่ระบุหรือไม่ทราบชนิด 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.1) ตรวจพบปริมาณ BaP สูงกว่ามาตรฐานกำหนดที่สหภาพยุโรปยอมให้มีได้ (Maximum Limit, ML) ในน้ำมันและไขมันบริโภค คือ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการสำรวจการปนเปื้อนของ BaP ในน้ำมันบริโภค (พ.ศ. 2551 – 2556)

ชนิดน้ำมันบริโภค	จำนวนตัวอย่าง		ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	วิเคราะห์	พบ	
ข้าวโพด	3	1	1.3
คาโนลา	2	0	-
งา	11	5	น้อยกว่า 1.0 - 1.1
ดอกคำฝอยและทานตะวัน	9	0	-
ถั่วเหลือง	4	2	น้อยกว่า 1.0 - 1.0
ปาล์ม	18	5	น้อยกว่า 1.0
มะกอก	31	3	น้อยกว่า 1.0 - 1.6
มะพร้าว	6	3	น้อยกว่า 1.0 - 11.0
เมล็ดชา	5	5	น้อยกว่า 1.0 - 21.6
รำข้าว	17	7	น้อยกว่า 1.0 - 3.1
สลัด	3	0	-
อะโวคาโด	1	0	-
ไม่ระบุ/ทราบชนิด	16	3	2.0 - 2.7
รวม	126	34	น้อยกว่า 1.0 - 21.6

### วิจารณ์

สารในกลุ่ม PAHs เป็นสารที่มีโครงสร้างวงเบนซินหลายวงต่อกันเป็น planar molecules เกิดจากการเผาไหม้ของสารประกอบคาร์บอนหรือกระบวนการทางอุตสาหกรรม ซึ่งมีมากกว่า 100 ชนิดนั้น องค์การสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (Environmental Protection Agency, EPA) จัดลำดับเป้าหมายตรวจวัดในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมไว้ 16 ชนิด ได้แก่ Naphthalene, Acenaphthylene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benzo(a) anthracene, Chrysene, Benzo(b) fluoranthene, Benzo(k) fluoranthene, Benzo(a) pyrene, Dibenz(a, h) anthracene, Benzo(g, h, i) perylene และ Ideno



(1, 2, 3, c-d) pyrene ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารก่อมะเร็งโดย BaP ได้รับความสนใจมากที่สุด The International Agency of Research on Cancer (IARC) ได้สรุปว่าจากหลักฐานผลการวิจัยการก่อมะเร็งของ BaP ในสัตว์หลากหลายสายพันธุ์และหลักฐานอื่นๆ ในมนุษย์ จึงจัด BaP เป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์ (Human carcinogen, Group 1)<sup>(11)</sup> การสำรวจปริมาณปนเปื้อนของสารก่อมะเร็งนี้ในอาหารจึงมีความสำคัญ ผู้วิจัยได้รายงานการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และผลการสำรวจปริมาณการปนเปื้อน BaP ในอาหารปิ้งย่าง<sup>(1)</sup> ได้แก่ ไก่ย่าง ปลาตุ๋นย่าง และหมูย่าง ซึ่งจากข้อมูลที่ได้พบว่าปริมาณ BaP ปนเปื้อนต่ำกว่าค่ากำหนดปริมาณสูงสุดของ Commission Regulation (EU) No. 208/2005<sup>(12)</sup> เพื่อให้ครอบคลุมชนิดอาหารมากขึ้น ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ในน้ำมันบริโภค ซึ่งเป็นประเภทอาหารที่มีความเสี่ยงเช่นกัน วิธีวิเคราะห์ปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภคที่พัฒนาขึ้น ได้เลือกใช้หลักการของ liquid-liquid partition ร่วมกับการใช้ SPE ชนิด C18 ซึ่งมีความเหมาะสม สำหรับแยก PAHs ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 4-6 วง โดยที่ BaP ประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง เรียงต่อกัน มีความเป็นขั้วต่ำ (low polarities) เลือกใช้ acetonitrile เป็นตัวชะ BaP ออกมา ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภค ได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.5, 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับ LOQ เท่ากับ 0.31 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่ง Commission Regulation (EU) No. 835/2011<sup>(13)</sup> กำหนดปริมาณสูงสุดของ BaP ในน้ำมัน และไขมัน (ที่มีวัตถุประสงค์สำหรับการบริโภคของมนุษย์โดยตรงหรือใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร) ไว้ที่ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้น วิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมที่สามารถรองรับการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับนี้ได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการขยายขอบข่ายการวิเคราะห์สารในกลุ่มนี้ ซึ่ง Commission Regulation (EU) No. 835/2011<sup>(13)</sup> ได้เพิ่มการกำหนดปริมาณสูงสุดเป็นผลรวมของ Benzo(a) pyrene, Benzo(a) anthracene, Benzo(b) fluoranthene และ Chrysene เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกเหนือจากที่ได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดของ Benzo(a) pyrene ไว้แล้ว

จากการนำวิธีที่พัฒนานี้มาวิเคราะห์ปริมาณ BaP ในน้ำมันบริโภคที่จำหน่ายในประเทศ รวม 126 ตัวอย่าง โดยการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ที่ใช้ reference material RM T0631 ของ FAPAS มีค่า assigned value ของ BaP เท่ากับ 0.79 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า satisfactory range เท่ากับ 0.44 – 1.14 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนานี้ตรวจพบ BaP 0.56 – 0.69 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (n = 6) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับและในการวิเคราะห์ทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่างจะทำการควบคุมภายในโดยการเติมสารมาตรฐาน BaP ที่ระดับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างน้ำมัน 1 ครั้ง พบค่าเฉลี่ย %recovery เท่ากับ 86.4 และ RSD (intermediate precision) เท่ากับ 10.3% (n=24) นอกจากนี้ได้เข้าร่วมในการทดสอบความชำนาญ FAPAS 0640 (April – June 2009) ตัวอย่างเป็นน้ำมันมะกอก assigned value เท่ากับ 1.78 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เท่ากับ 1.52 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่า z-score เท่ากับ -0.7 อยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ ซึ่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญนี้ นอกจากเติม BaP แล้วยังมีการเติมสารอีก 4 ชนิดในกลุ่มนี้ ได้แก่ Benzo(a) anthracene, Benzo(b) fluoranthene, Ideno(1,2,3,c-d) pyrene, Benzo(g, h, i) perylene ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์สารชนิดอื่นๆ ในกลุ่มนี้ที่ไม่รบกวน BaP ได้อีกด้วย

ผลการตรวจวิเคราะห์น้ำมันบริโภคบรรจุขวดที่จำหน่ายในท้องตลาดที่มีชื่อการค้าทั้งที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ ส่วนใหญ่ไม่พบหรือพบการปนเปื้อนต่ำกว่า 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น น้ำมันรำข้าว 2 ตัวอย่าง พบ 2.3 – 3.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม น้ำมันที่ไม่ระบุชนิด 2 ตัวอย่าง พบ 2.6 – 2.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนตัวอย่างที่การปนเปื้อนปริมาณสูงกว่าค่ากำหนดมาก ๆ คือ น้ำมันมะพร้าว 2 ตัวอย่าง พบ 10.3-11.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม น้ำมันเมล็ดชา 3 ตัวอย่าง พบ 3.6, 8.7 และ 21.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

ในกลุ่มสหภาพยุโรปข้อมูลจาก Rapid Alert System for Food and Feed<sup>(14)</sup> ในช่วงปี 2008 – 2013 ประเทศลิทัวเนียมีการส่งคืนน้ำมันมะพร้าวที่นำเข้าจากอินเดียโดยตรวจพบ BaP 5.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ที่ประเทศฟินแลนด์ส่งคืนน้ำมันงา ที่นำเข้ามาจากฮ่องกง ซึ่งตรวจพบ BaP 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนที่กรีซตรวจพบในน้ำมันดอกทานตะวัน 2.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมที่นำเข้ามาจากประเทศอียิปต์ นอกจากนี้ยังมีการเตือนให้เฝ้าระวังจากเบลเยียมที่ตรวจพบ 4.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมใน rapeseed oil นำเข้ามาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ และที่ประเทศสโลวาเกียตรวจพบ BaP 17.99 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในน้ำมันมะกอกที่นำเข้ามาจากอิตาลี เป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้ทำให้หน่วยราชการต้องมีการเฝ้าระวังเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค ซึ่งข้อมูลการตรวจพบในน้ำมันที่จำหน่ายในประเทศยังคงยืนยันได้ว่าน้ำมันบริโภคที่จำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่มีความปลอดภัยเพียงพอในการบริโภค ส่วนผู้บริโภคควรเลือกชนิดของน้ำมันให้เหมาะสมกับการปรุงอาหารแต่ละประเภท เพื่อให้ได้คุณค่าและความปลอดภัยต่อสุขภาพด้วยเช่นกัน

## สรุป

ผลจากการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์สรุปได้ว่ามีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาชนิดและปริมาณของสาร BaP ในน้ำมันบริโภคได้โดยมีค่า Limit of quantitation เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวแสนดี ว่องวุฒิ และนางสาวอัจฉรี อินแก้ว นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ได้ช่วยวิเคราะห์ตัวอย่างในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของ benzo(a) pyrene ในน้ำมันบริโภคครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

1. จิตผกา สันทัดรบ, ทองสุข ปายะนันท์ และกนกพร อธิสุข. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ Benzo(a) pyrene ในเนื้อสัตว์ปิ้งย่าง. ว กรมวิทย์ พ 2552; 51(3-4): 177-86.
2. U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Atlanta, Georgia: U.S. Government Printing Office; 1995.
3. Barranco A, Alonso-Salces RM, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, et al. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. J Chromatogr A 2003; 988: 33-40.
4. Martinez-Lopez S, Morales-Noe A, Pastor-Garcia A, Morales-Rubio A, de la Guardia M. Sample preparation improvement in polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oils by gel permeation chromatography and liquid chromatography with fluorescence detector. J AOAC Int 2005; 88(4): 1247-54.
5. Wu S, Yu W. Liquid-liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China. Food Chem 2012; 134: 597-601.
6. Hossain MA, Salehuddin SM. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible oil by gas chromatography coupled with mass spectroscopy. Arabian J Chem 2012; 5: 391-96.
7. Payanan T, Leepipatpiboon N, Varanusupakul P. Low-temperature cleanup with solid-phase extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by reversed phase liquid chromatography with fluorescence detection. Food Chem 2013; 141: 2720-6.



8. Drabova L, Tomaniova M, Kalachova K, Kocourek V, Hajslova J, Pulkrabova J. Application of solid phase and two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry for fast analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *Food Control* 2013; 33: 489-497.
  9. Thompson M, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst* 2000; 125: 385-6.
  10. Ellison SLR, Williams A, editors. *EURACHEM/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3<sup>rd</sup> ed. United Kingdom: EURACHEM; 2012.
  11. Benzo(a)pyrene. In: *A review of human carcinogens Part F: chemical agents and related occupation*. (IARC Monographs Evaluation Carcinogenic Risks Hunans; 100F). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2012. p. 111-144.
  12. Commission regulation (EC) No. 208/2005 of 4 February 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Official Journal of European Union* 2005; L 34/3-4.
  13. Commission regulation (EC) No. 835/2011 of 19 August 2011. Amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official Journal of European Union* 2011; L 215/7.
  14. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) [online]. [cited 2014 Jan 16]; [2 screens]. Available from: URL: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>.
-

---

# Development of Analytical Method for Benzo (a) Pyrene in Edible Oil

---

**Jitpaka Suntudrob and Kanokporn Atisook**

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

**ABSTRACT** Benzo(a) pyrene (BaP) is a marker of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) since WHO specifies as carcinogenic to human. Method of analysis for BaP content in edible oil was studied and developed. Liquid-liquid extraction and solid-phase extraction were used to purify sample and HPLC fluorescence detector was used to quantitative analysis of BaP. The result of method validation showed that the developed method is fit-for purpose. Specificity of chromatographic system was shown by retention time of BaP peak at 15.3 min without interference. There are linearity of calibration standards from 1 to 10 ng/ml and linearity of working range from 1 to 10 µg/kg were shown by Pearson's correlation coefficient (r) of 0.9997 and 0.9996, respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.5 and 1.0 µg/kg, respectively. The recovery of method was studied by spiking standard in olive oil matrix cover the working range, mean recovery was in the range of 81%-86%. Precision was shown by %RSD of repeatability was 3.2-7.4 and within-laboratory reproducibility was 86. The measurement uncertainty of the method showed by % relative standard uncertainty and relative expanded uncertainty were 15.6% and 31.2%, respectively. From 2008-2013, 126 samples of edible oil sold in Thailand were analyzed by the developed method, 34 samples (27.0%) were contaminated by BaP. The level found was ranged from less than 1.0 to 21.6 µg/kg. The results showed that 9 samples (7.1%) of tea seed oil, rice bran oil, raw coconut oil and unlabeled or unspecified oil were contaminated higher than European Commission is Maximum Limit at 2 µg/kg.

**Key words:** Benzo(a)pyrene, Edible oil, Polycyclic aromatic hydrocarbons