

การทดสอบหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร ทอดด้วยเทคนิคเมทริกซ์ โซลิด ดิสเพอชั่นและอัลตราไฮเพอร์ฟอร์ แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

Determination of acrylamide in fried food product by matrix solid dispersion with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข¹, สมภพ ลาภวิบูลย์สุข¹
Jutathip Lapviboonsuk¹, Sompop Lapviboonsuk¹

รับบทความ: 15 กุมภาพันธ์ 2565 แก้ไขบทความ: 30 พฤษภาคม 2565 ยอมรับตีพิมพ์: 13 มิถุนายน 2565

2

บทคัดย่อ

การตรวจวัดปริมาณสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารทอด ดำเนินการโดยศึกษาความเหมาะสมของเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรีและเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเมทริกซ์ โซลิด ดิสเพอชั่น (Matrix solid dispersion) หรือเทคนิค QuEChERS ซึ่งได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตาม EU Commission regulation 2017/2158 ได้ค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยร้อยละ 100.7 95.3 และ 103.8 ที่ระดับความเข้มข้น 20 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 3.82-8.00 นอกจากนี้ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงว่าวิธีนี้มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมสำหรับการใช้หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารทอด

Abstract

The determination of acrylamide in fried food products was studied the suitability of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and also performed sample preparation technique: matrix solid dispersion or QuEChERS. The method validation was performed and fell in acceptable range as following the EU Commission regulation 2017/2158. The averages of recoveries were 100.7, 95.3 and 103.8 % at the concentration level of 20, 500 and 1,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The precision was also in the acceptable range. The relative standard deviations (RSDs) were in the range of 3.82%-8.00%. Moreover, the detection limit and quantitation limit were 5 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. These results demonstrated that the method was reliable and suitable for the measurement of acrylamide content in fried food products.

คำสำคัญ: อะคริลาไมด์ อาหารทอด ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

Keywords: Acrylamide, Fried food product, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

¹ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

* Corresponding author e-mail address: jutathip@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

สารอะคริลาไมด์ (Acrylamide) เป็นสารที่เกิดขึ้นในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง (Carbohydrate-rich food) เช่น เมล็ดธัญชาติ (Cereal grain) และ มันฝรั่ง เป็นต้น โดยสามารถเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหารที่มีความชื้นต่ำและอุณหภูมิสูง คือ อุณหภูมิสูงกว่า 120°C โดยผ่านกระบวนการผลิตที่มีความชื้นต่ำ ดังนี้ การทอด (Frying) การอบ (Baking) การคั่ว (Roasting) การปิ้ง (Toasting) การย่าง (Grilling) [1] และเนื่องด้วยสารอะคริลาไมด์ จัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลองที่มีความเสี่ยงจะทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาวิธีตรวจวัดสารอะคริลาไมด์ที่เหมาะสม เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ สารอะคริลาไมด์ จัดเป็นกลุ่มที่มีความเป็นไปได้สูงในการก่อมะเร็งในคน (กลุ่ม 2A) โดยหน่วยงานวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศ (International Agency for Research on Cancer; IARC) และในปี 2554 หน่วยงาน FAO/WHO ได้ประเมินค่า NOAEL (No observe adverse effect level) ของสารนี้ในการเกิดพิษต่อระบบประสาทเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน [2-3] เมื่อสารอะคริลาไมด์เข้าสู่ร่างกาย จะถูกเอนไซม์ในร่างกายนเปลี่ยนเป็นไกลซิโดไมด์ ซึ่งสามารถก่อความเป็นพิษต่อร่างกายได้โดยการไปจับกับดีเอ็นเอ หรือ โปรตีนในร่างกาย [4-5] อย่างไรก็ตาม ร่างกายมีกลไกในการขจัดพิษจากสารอะคริลาไมด์และสารไกลซิโดไมด์โดยใช้ สารกลูตาไธโอน ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่อยู่ในตับไปจับกับสารทั้งสองตัว แล้วขับออกทางปัสสาวะ ในแต่ละวันร่างกายสามารถขับสารอะคริลาไมด์และไกลซิโดไมด์ที่ระดับปริมาณต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมออกทางปัสสาวะได้อย่างรวดเร็ว [6] แต่เมื่อร่างกายได้รับสารอะคริลาไมด์ในปริมาณสูงเข้าไปอย่างเฉียบพลัน ร่างกายจะสะสมสารอะคริลาไมด์และส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของเซลล์เม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินในคน [7-8] และเกิดความผิดปกติโดยตรงต่อระบบประสาทส่วนหลังส่วนกลางและระบบประสาทรอบนอก [9-12]

วิทยาการสมัยใหม่ในปัจจุบันทำให้มีความรู้ความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับสารปนเปื้อนที่มาจากอาหาร ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สามารถระบุชนิดของสารที่ทำให้ก่อมะเร็งได้ เช่น สารอะคริลาไมด์ ซึ่งมีการตรวจพบสารอะคริลาไมด์ในอาหารหลายชนิด และมีกลุ่มนักวิจัยศึกษาปริมาณการปนเปื้อนสารอะคริลาไมด์ทั้งในต่างประเทศและประเทศไทย โดยสังเขป ดังนี้

- ประเทศสมาชิกในกลุ่มสหภาพยุโรปมีการตรวจพบสารอะคริลาไมด์ในปริมาณที่สูงในช่วงปี พ.ศ. 2552-2560 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 655-5,900 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารประเภทบิสกิตและมันฝรั่งทอด [13]

- พ.ศ. 2561 ผู้พิพากษาศาลนครลอสแอนเจลิส ในรัฐแคลิฟอร์เนีย ของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีคำสั่งให้ร้านกาแฟแบรนด์ดัง และผู้ผลิตกาแฟยี่ห้ออื่น ๆ ต้องติดฉลากคำเตือนเกี่ยวกับสารก่อมะเร็งที่ผลิตภัณฑ์ (สารก่อมะเร็งในที่นี้หมายถึงสารอะคริลาไมด์) [14]
- พ.ศ. 2551 ได้มีการตรวจพบปริมาณสารอะคริลาไมด์ในอาหารไทย ในตัวอย่างแกงเขียวหวาน แกงกระหรี่ แกงแดง แกงมัสมั่น และชุบปลา ที่มีการจำหน่ายในรูปอาหารกระป๋อง อาหารแช่แข็ง และอาหารถุงปรุงสำเร็จ ซึ่งปริมาณที่ตรวจพบมีค่าตั้งแต่ น้อยกว่า 60 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของอาหาร จนถึง 606 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของอาหาร [15]
- พ.ศ. 2555 สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม ได้สุ่มตัวอย่างสำรวจในคุกกี จำนวน 5 แห่ง ผลแสดงว่า ไม่พบอะคริลาไมด์ในทุกตัวอย่าง ในหน่วย ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยโดยสถาบันอาหาร ได้ดำเนินการสุ่มตัวอย่างคุกกีสำรวจอีกครั้ง จำนวน 5 ยี่ห้อ พบปริมาณอะคริลาไมด์ ตั้งแต่ ไม่พบ ถึง 156.60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และตรวจพบอะคริลาไมด์จากจำนวน 3 ใน 5 ตัวอย่าง [16]
- กลุ่มนักวิจัยได้ทำการสำรวจปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรีในปี พ.ศ. 2555 พบว่าในกลุ่มของอาหารทอด เช่น มันฉาบ ผัดกวน ขนมหั้หงส์ ก๋วยเตี๋ยวทอด ปอเปี๊ยะทอดมีปริมาณอยู่ในช่วง 150-500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบสารอะคริลาไมด์ ที่ระดับน้อยกว่า 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัมในข้าวหลาม ปาท่องโก๋ ขนุนทอด ก๋วยเตี๋ยวทอด ขนมหั้หงส์ และเครปซ็อคโกแลต แต่อาหารที่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีนสูง เช่น ปลาเส้นอบแห้ง ข้าวเกรียบกุ้ง ฮ่อยจ๊อและทอดมันปลาทราย มีการตรวจพบในปริมาณที่น้อยกว่า 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม [17]

จากข้อมูลการตรวจพบอะคริลาไมด์ในประเทศต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่า อะคริลาไมด์ เป็นภัยเงียบที่สามารถแฝงมากับอาหารชนิดต่าง ๆ ซึ่งประเทศไทยยังมีข้อจำกัดเรื่องข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์ในอาหาร [15-18] การได้มาซึ่งข้อมูลการตรวจสอบต่าง ๆ จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือในผลการทดสอบดังกล่าว โดยเทคนิคการตรวจวัดที่ได้รับความนิยมแพร่หลายคือ เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-เทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (Liquid chromatography tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) [19-23] ซึ่งมี

ประสิทธิภาพสูงในการตรวจวัดหาปริมาณในระดับต่ำได้ถึง พีพีที (ppt) และสามารถยืนยันชนิดของสารได้ด้วย การแยกตัวของสารภายในเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ นอกจากนี้ เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography; HPLC) [24-26] แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography; GC) [27-29] และแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS) [30-31] สามารถใช้หาปริมาณสารอะคริลาไมด์ได้อย่างถูกต้องได้เช่นกัน โดยเทคนิค GC จำเป็นต้องมีการทำให้เกิดสารอนุพันธ์ (Derivatization) เพื่อให้สารที่ทำการทดสอบมีสมบัติเหมาะสมต่อการตรวจวัดในสถานะแก๊ส ซึ่งการทำปฏิกิริยากับ โฟแทสเซียมโบรไมด์และโฟแทสเซียมโบรเมทสามารถที่จะผลิต 2,3-dibromopropanamide ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด จะช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC [31] รวมทั้งการสกัดตัวอย่างก็มีบทบาทสำคัญต่อความถูกต้องของผลการทดสอบในการลดการรบกวนของเมทริกซ์ตัวอย่าง เช่น เทคนิคการทำความสะอาดตัวอย่างด้วย Solid phase extraction (SPE) [26] โดยตาม EU Commission regulation 2017/2158 กำหนดให้วิธีตรวจวัดสารอะคริลาไมด์มีค่าร้อยละการคืนกลับที่ยอมรับเท่ากับ 75-110 และกำหนดให้ค่าการทำซ้ำที่ยอมรับ (Repeatability; RSD,) คือ 0.66 เท่าของ ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility; RSDR) จากการคำนวณด้วยสมการ Horwitz ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection; LOD) เท่ากับ 3 ใน 10 ของ ค่าขีดจำกัดของการหาปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ) ซึ่งมีความมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม งานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีที่เหมาะสมของการตรวจวัดปริมาณ สารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารทอด เพื่อความถูกต้อง แม่นยำของผลการทดสอบ รวมทั้งพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการทดสอบว่ามีความเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งาน

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์

สารอะคริลาไมด์ที่มีความบริสุทธิ์ ร้อยละ 99 ผลิตโดย Sigma และสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) คือ อะคริลาไมด์ไอโซโทป (2,3,3-D3) ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 98 ผลิตโดย Cambridge Isotope Laboratories, Inc. รวมทั้งอะซิโตรไนไตรล์ (Acetonitrile; ACN) และเมทานอล (Methanol; MeOH) มีชั้นคุณภาพเกรด LC ผลิตโดย Merck ส่วนเฮกเซน (hexane; C_6H_{14}) แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate; $MgSO_4$) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl) ไพรมารี เซกันดารี เอมีน (Primary secondary amine; PSA) ซิงค์ ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (Zinc sulfate heptahydrate; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) และโพแทสเซียม

เฮกซะไซยาโนเฟอเรต (II) ไตรไฮเดรต (Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate; $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) มีชั้นคุณภาพสำหรับการวิเคราะห์ (Analytical grade; AR) ผลิตโดย Merck และน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 เมกะโอห์ม-เซนติเมตร สำหรับใช้เตรียมสารละลายและเฟสเคลื่อนที่ คอลัมน์สำหรับเครื่อง LC-MS/MS เป็นของยี่ห้อ Agilent รุ่น ZORBAX SB-C18 ขนาด 3.0×250 มิลลิเมตร 5 ไมครอน พร้อมการ์ดยี่ห้อ Agilent รุ่น ZORBAX SB-C18 ขนาด 4.6×12.5 มิลลิเมตร 5 ไมครอน และตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 13 มิลลิเมตร 0.2 ไมครอน

2.2 การเตรียมสารละลาย

2.2.1 Carrez I: ชั่ง $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 15 กรัม ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2.2 Carrez II: ชั่ง $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 กรัม ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมตัวอย่างโดยอ้างอิงตามวิธี Analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food Application: agilent technologies. [32]

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม นำมาเติมสารมาตรฐานภายใน ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตรของและเขย่าด้วย เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำและอะซิโตรไนไตรล์ อย่างละ 10 มิลลิลิตร เติมหกเกลือในการสกัดแบบ QuEChERS ซึ่งได้แก่ $MgSO_4$ จำนวน 4 กรัม และ NaCl 0.5 กรัม แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที และทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 5,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วแยกชั้นเฮกเซนและปิเปตจำนวน 4 มิลลิลิตร เพื่อนำไประเหยด้วยเครื่องเป่าลมไนโตรเจนที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเติมน้ำจำนวน 2 มิลลิลิตรแล้วเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย เป็นเวลา 1 นาที และกรองด้วย PTFE ขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อตรวจวัด ปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

2.4 การตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

สภาวะการฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ดำเนินการตามวิธี Analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food application: agilent technologies. ซึ่งมีรายละเอียดโดยสังเขป ดังนี้

สภาวะโครมาโทกราฟี	เฟสเคลื่อนที่: 2.5% เมทานอล/ 97.5% ของกรดฟอร์มิก ร้อย ละ 0.1 ชนิด Isocratic elution
	อัตราการไหล: 0.20 มิลลิลิตร ต่อนาที
สภาวะแมสสเปกโตรเมตรี	อะคริลไมด์ 72.1 → 55.0 และ 72.1 → 27.0
	อะคริลไมด์ [² d ₃] (Internal standard) 75.1 → 58.2

2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

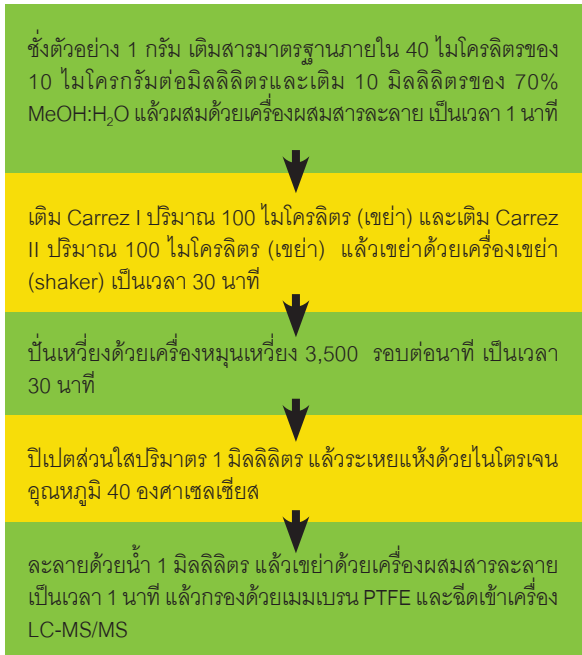
การทดสอบตัวอย่างแบบลงค์และตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือใกล้เคียงศูนย์ จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อประมาณค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ ซึ่งในที่นี้ทำการเติมที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเตรียมตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอีก 2 ระดับความเข้มข้น คือ 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อทดสอบความเข้มข้นที่ระดับกลางและสูงของช่วงการวัด แล้วคำนวณร้อยละการคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีทดสอบ นอกจากนี้ ได้ดำเนินการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 2, 5, 10, 20, 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ซ้ำ

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การศึกษาความเหมาะสมของการเตรียมตัวอย่าง

วิธีการสกัดสารอะคริลไมด์ศึกษาโดยเปรียบเทียบ 4 วิธีดังนี้ วิธีที่ 1 ใช้เทคนิคการตกตะกอนโปรตีนโดยการเติม Carrez I: K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O 15 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร และ Carrez II : ZnSO₄ · 7H₂O 30 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร และวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 ใช้การเติม MgSO₄ : NaCl ตามเทคนิค QuEChERS เพื่อลดสิ่งรบกวนในขั้นตอนการตรวจวัด แต่วิธีที่ 3 เพิ่มขั้นตอนการสกัดด้วย PSA และ MgSO₄ และใช้อัตราส่วนของ MgSO₄ : NaCl ที่แตกต่างกันซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังต่อไปนี้

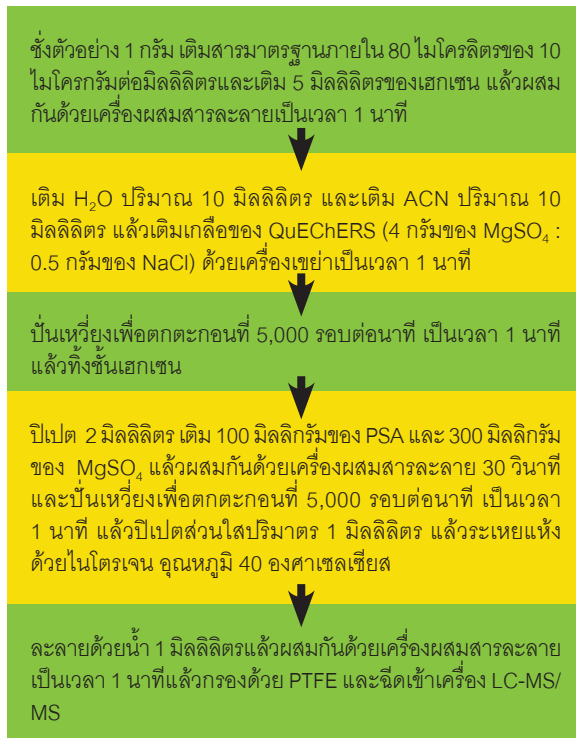
วิธีที่ 1) วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหารเล่มที่ 5 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสวิธี DMSc F1074: การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลไมด์ในอาหาร โดย LC/MS-MS หน้า 41-46 [33]



วิธีที่ 2) Quantification of acrylamide in a variety of food matrices by LC/MS/MS triple quadrupole, application note: agilent technologies. [34]



วิธีที่ 3) Analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food application: agilent technologies. [32]



วิธีที่ 4) In-house method based on analysis of acrylamide in french fries using agilent SampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food Application: agilent technologies. [32] โดยการลดขั้นตอนการสกัดด้วย PSA และ MgSO₄ ออกแล้วทำการระเหยด้วยไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสแล้วนำไปละลายน้ำและกรองด้วย PTFE เพื่อฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

ผลการทดลองการสกัดวิธีละ 6 ซ้ำ แยกเป็นการสกัดตัวอย่าง 3 ซ้ำและการสกัดตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอีก 3 ซ้ำในตัวอย่างกล้วยทอด โดยทดสอบตามวิธีมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับมีค่าอยู่ระหว่าง 100.8-106.2 % และดำเนินการทดสอบซ้ำที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอีก 3 ซ้ำในตัวอย่างเผือกทอด มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 94.8-103.8 % สำหรับวิธีที่ 2 Application note: agilent technologies. [34] การเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างกล้วยทอด พบว่า มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 93.0-100.1% และที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างเผือกทอด มีค่าอยู่ระหว่าง 85.4-109.1% และวิธีที่ 3 Food application:

agilent technologies. [32] ที่ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างกล้วยทอด มีค่าระหว่าง 92.2-98.3% และที่ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างเผือกทอด มีค่าระหว่าง 86.6-107.2% โดยวิธีที่ 4 ทำการทดสอบตามวิธีที่ 3 แต่ไม่ได้สกัดสิ่งรบกวนด้วย PSA และ MgSO₄ พบว่า ตัวอย่างกล้วยทอดมีค่าระหว่าง 84.9-95.4% ซึ่งยังมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 75-110% ดังรายละเอียดสรุปตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างจำนวน 4 วิธีด้วยเทคนิคการเติมสารละลายมาตรฐาน (Spiked sample) ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

วิธีที่ 1		วิธีที่ 2		วิธีที่ 3		วิธีที่ 4	
เผือกทอด	กล้วยทอด	เผือกทอด	กล้วยทอด	เผือกทอด	กล้วยทอด	เผือกทอด	กล้วยทอด
ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)							
21.19	37.05	36.89	39.20	34.21	38.90	37.75	
25.00	31.38	31.98	33.25	42.57	45.75	38.20	
27.72	37.96	39.29	35.42	39.57	41.45	35.82	
ค่าเฉลี่ย							
21.41	34.21	33.40	25.42	36.43	37.79	32.30	
ร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD, %) n = 3							
3.28	3.57	3.73	3.01	4.24	3.46	1.26	
ปริมาณสารอะคริลาไมด์ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)							
71.68	530.11	80.19	503.97	84.26	497.97	456.88	
74.29	553.67	86.55	490.08	87.03	516.85	503.47	
76.33	541.89	92.30	528.33	94.19	525.74	505.60	
ร้อยละการคืนกลับ (Recovery, %) n = 3							
94.83	100.79	85.38	94.69	86.59	92.19	84.90	
99.65	106.25	98.71	92.95	92.25	97.12	95.42	
103.76	103.64	109.11	100.09	107.22	98.27	95.21	

การดำเนินการทดสอบตามวิธีที่ 4 In-house method based on food application: agilent technologies [32]. เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 2 ครั้งในตัวอย่างเผือกทอดและกล้วยทอด โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมให้ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ แสดงตามตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบซ้ำตามวิธีที่ 4 In-house method based on food application: agilent technologies [32].
การทดสอบซ้ำครั้งที่ 1

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			ตัวอย่าง	ความเข้มข้นในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
เผือกทอด	34.22	34.96	34.78	เผือกทอด	509.16	492.94	504.85
ค่าเฉลี่ย	34.65			%Recovery	95.59	93.80	99.17
%RSD	1.12						
กล้วยทอด	39.65	41.57	40.11	กล้วยทอด	525.25	537.83	526.42
Average	40.44			%Recovery	101.43	106.04	103.53
%RSD	2.48						

การทดสอบซ้ำครั้งที่ 2

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				ตัวอย่าง	ความเข้มข้นในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
เผือกทอด	35.28	32.05	32.96	32.68	เผือกทอด	477.45	485.84	481.70	480.84
ค่าเฉลี่ย	33.24				%Recovery	90.41	92.17	90.05	89.63
%RSD	1.41								
กล้วยทอด	45.55	44.10	38.71	45.61	กล้วยทอด	485.33	507.61	502.65	483.97
Average	43.49				%Recovery	89.62	96.18	93.63	92.65
%RSD	3.26								

3.2 การศึกษาความเหมาะสมของเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

ศึกษาวิธีการหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่เหมาะสมด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี เทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS) เปรียบเทียบ 3 วิธีเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และแมสสเปกโตรเมตรี (MS) ดังนี้
วิธีที่ 1 วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสวิธี DMSc F1074 :
การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร โดย LC/MS-MS หน้า 41-46 [33]

เฟสเคลื่อนที่: กรดอะซิติก ร้อยละ 0.1 / เมทานอล (97:3) ชนิด Isocratic elution อัตราการไหล: 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที
วิธีที่ 2 Quantification of acrylamide in a variety of food matrices by LC/MS/MS triple quadrupole, application note: agilent technologies [34].

เฟสเคลื่อนที่: กรดอะซิติกในน้ำ ร้อยละ 0.1 / กรดอะซิติกในเมทานอล ร้อยละ 0.1 ชนิด Gradient elution แสดงดัง
ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการตั้งค่าของเฟสเคลื่อนที่ในเครื่อง LC-MS/MS

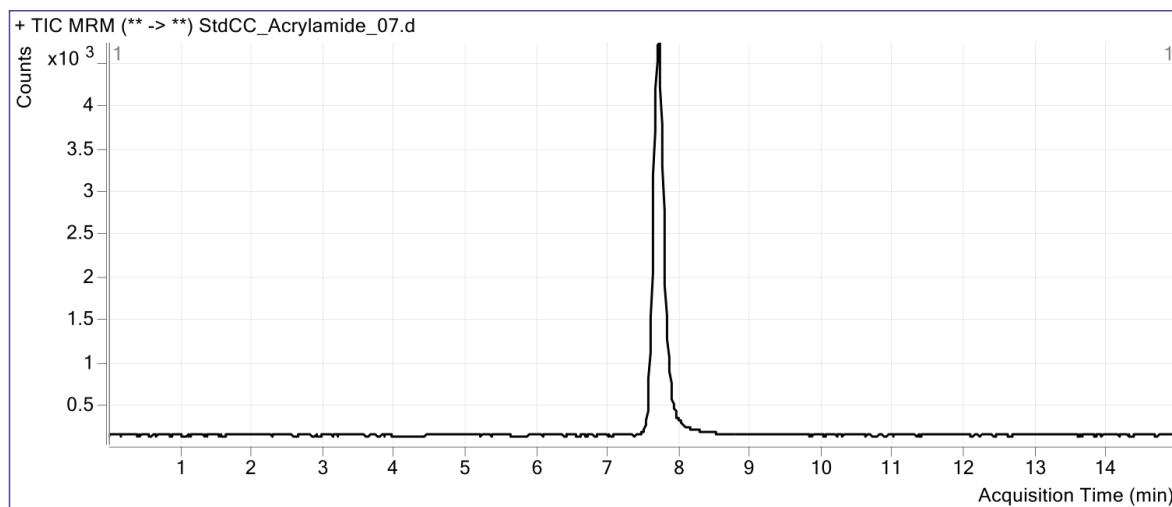
เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มล./นาที)	%A: กรดอะซิติกในน้ำ ร้อยละ 0.1	%B: กรดอะซิติกในเมทานอล ร้อยละ 0.1
0	0.25	90	10
5.5	0.25	90	10
6.0	0.25	10	90
8.0	0.25	10	90
8.1	0.25	90	10
13.0	0.25	90	10

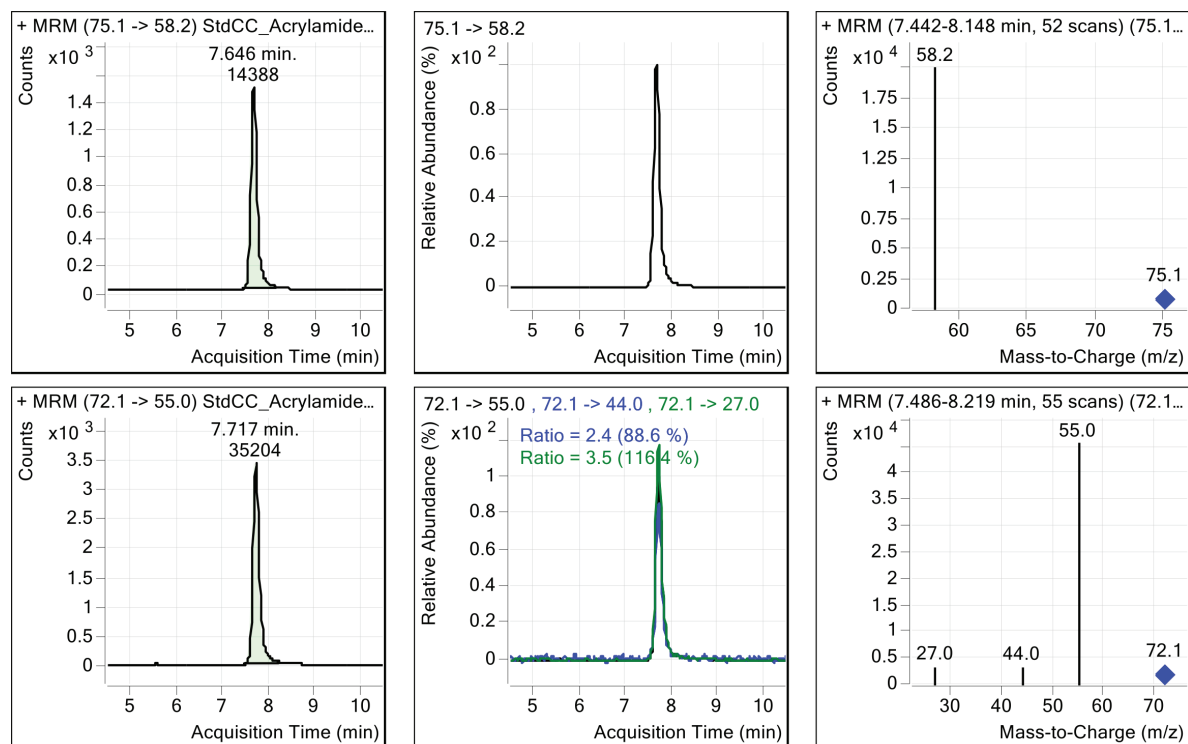
วิธีที่ 3 Analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food application: agilent technologies [32].

เฟสเคลื่อนที่: 2.5% เมทานอล / 97.5% กรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.1 ชนิด Isocratic elution

อัตราการไหล: 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที

สภาวะการทดสอบที่เหมาะสม คือ วิธีที่ 3 Analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food application: agilent technologies [32]. โดยปรับอัตราการไหลเป็น 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที โครมาโทแกรมของสารอะคริลาไมด์และสารมาตรฐานภายใน แสดงดังรูปที่ 1 โดยการเตรียมสารมาตรฐานในอะซิโตรไนไตรล์ มีผลทำให้พบพีคบริเวณใกล้เคียงกับสารมาตรฐานและคาร์เท็นชันไทม์ (Retention time; RT) ของอะคริลาไมด์ในตัวอย่าง (RT: 5.979) และสารมาตรฐาน (RT: 6.345) ซึ่งไม่ตรงกัน ดังนั้น การเตรียมกราฟมาตรฐานและตัวอย่างต้องใช้ตัวทำลายชนิดเดียวกันคือ น้ำ และเติมสารมาตรฐานภายในเพื่อใช้ยืนยันพีคของสารอะคริลาไมด์ในกรณีที่เกิดตัวอย่างเกิดการเลื่อน (Shift) ของ RT





รูปที่ 1 โครมาโทแกรมของสารอะคริลาไมด์ที่ระดับความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ โดยศึกษาความเหมาะสมตามวิธี In-house method based on food application: agilent technologies [32].

มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ดังนี้ ช่วงความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง พิจารณาจากค่าร้อยละการคืนกลับ และความเที่ยง พิจารณาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ รวมทั้งศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดในการหาปริมาณ (LOQ) โดยการศึกษาค่า LOD และ LOQ ดำเนินการโดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ดังนี้ 10 40 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยสรุปผลแสดงดังตารางที่ 4 แล้วดำเนินการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 ครั้ง ซึ่งครั้งละ 3 ซ้ำ 3 ซ้ำ และ 4 ซ้ำตามลำดับ เช่นเดียวกันกับที่ระดับ 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมแสดงดังตารางที่ 5 ดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงการประเมินค่า LOD และ LOQ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10 40 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับที่	ความเข้มข้นในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ปริมาณในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				ร้อยละค่าการคืนกลับ			
		10	40	100	200	10	40	100	200
1	34.70	48.36	80.01	134.44	268.38	85.07	113.08	99.43	115.31
2	36.75	49.52	79.82	134.53	231.54	99.18	111.97	96.52	101.13
3	35.42	49.73	75.53	141.27	251.07	103.04	102.69	103.04	109.61
เฉลี่ย	35.62	49.20	78.45	136.75	250.33	95.76	109.25	99.66	108.68
SD	1.04	0.74	2.53	3.92	18.43	9.46	5.71	3.27	7.14
%RSD	2.92	1.50	3.23	2.86	7.36	9.88	5.22	3.28	6.57

สรุปประสิทธิภาพของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ โดยดำเนินการทดสอบในตัวอย่างกล้วยทอด (Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่า Correlation coefficient, r ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.995)

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 20 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร

No.	ความเข้มข้นในตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อลิตร)			ร้อยละการคืนกลับ		
		20	500	1,000	20	500	1,000
1	37.69	56.54	444.92	1,065.06	104.58	82.62	107.42
2	37.54	56.60	484.26	1,067.61	105.94	91.63	108.80
3	34.42	56.22	505.30	1,069.97	104.37	95.29	108.02
4	39.65	59.89	525.25	1,045.70	101.24	101.43	106.63
5	41.57	54.55	537.83	1,042.99	78.34	106.04	106.16
6	40.11	60.16	526.42	990.04	102.59	103.53	99.60
7	45.55	60.67	485.33	998.61	105.45	89.62	100.78
8	44.10	59.71	507.61	997.29	101.16	96.18	99.10
9	38.71	59.59	502.65	1,004.58	101.69	93.63	102.78
10	45.61	59.28	483.97	984.40	101.97	92.65	99.06
เฉลี่ย	40.50	58.32	500.35	1,026.63	100.73	95.26	103.84
SD	3.70	2.12	27.11	34.83	8.06	6.97	3.97
%RSD	9.14	3.64	5.42	3.39	8.00	7.32	3.82
เกณฑ์	21.0						

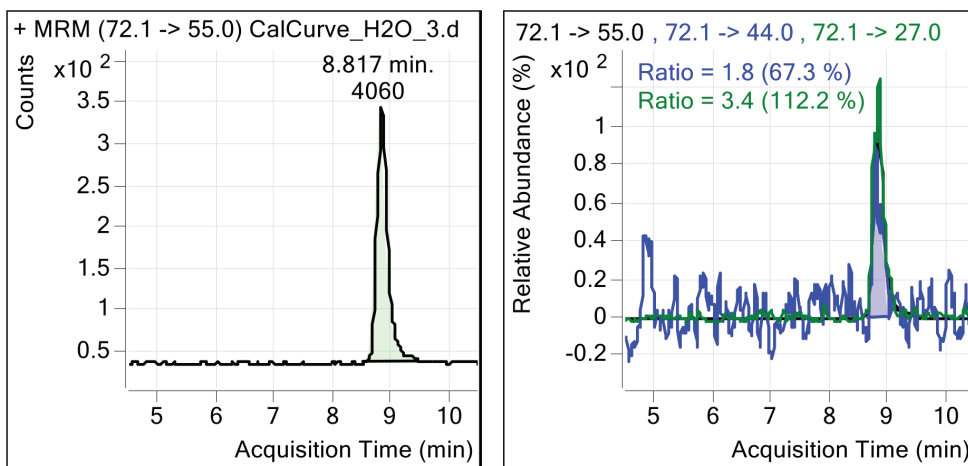
การคำนวณค่า LOD และ LOQ ดำเนินการตาม Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods-a laboratory guide to method validation and related topics [35] ดังสมการ

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

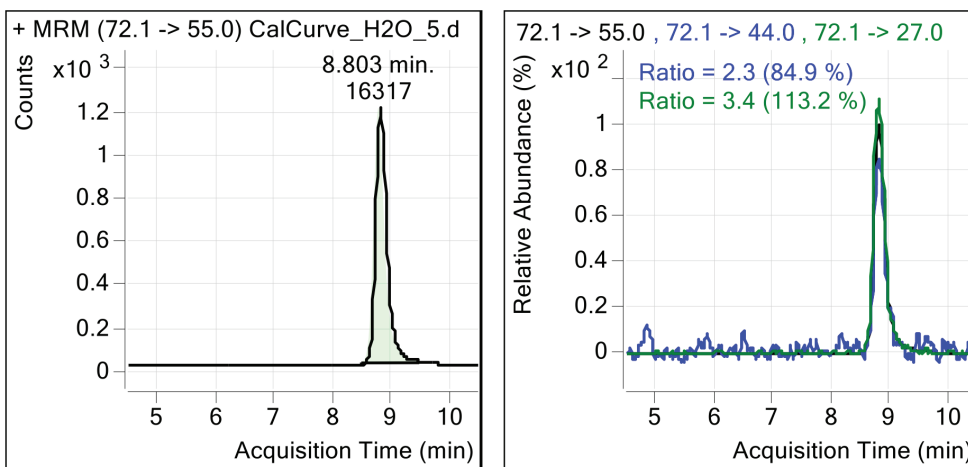
โดย S_0 คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นใกล้กับศูนย์ และ n คือ จำนวนซ้ำที่ใช้ในการทดสอบ สำหรับค่า LOD และ LOQ คำนวณจากสมการ

$$LOD = 3 \times S'_0 \text{ และ } LOQ = 10 \times S'_0$$

ดังนั้น ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) คือ 5.00 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานค่าได้ (LOQ) คือ 20.0 ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงโครมาโทแกรม ดังนี้



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารอะคริลาไมด์ที่ระดับ LOD ความเข้มข้น 5.00 ไมโครกรัมต่อลิตร




รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารอะคริลาไมด์ที่ระดับ LOQ ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.4 การทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทอด

ศึกษาความเหมาะสมของวิธีทดสอบโดยการทดสอบตัวอย่างที่มีเมทริกซ์ต่าง ๆ กัน พบว่าการเติมสารมาตรฐานและคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ 75 -110 โดยปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่มีการตรวจพบในตัวอย่างมีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสารอะคริลาไมด์ที่มีการตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหารทอดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ลำดับที่	ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณสารอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	รูปผลิตภัณฑ์
1	กล้วยทอด รสหวาน (น้ำผึ้ง+น้ำตาล)	41.4	

ลำดับที่	ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณสารอะคริลาไมด์ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	รูปผลิตภัณฑ์
2	เผือกทอด	34.6	
3	กล้วยสุกทอดสมุนไพร (เบรคแตก)	37.5	
4	เต้าหู้กรอบ รสดั้งเดิม	53.3	
5	บร็อคโคลี่กรอบ รสสาหร่าย	43.5	
6	กระเจี๊ยบกรอบ รสธรรมชาติ	31.9	
7	เมล็ดข้าวโพดหวานกรอบ รสธรรมชาติ	21.3	
8	ลูกเดี๋ยยอบกรอบ รสดั้งเดิม	22.9	
9	กล้วยหอมทองอบกรอบ	ไม่พบ	
10	กล้วยหอมทองกรอบฟู	< 20.0	
11	กล้วยเล็บมือนางอบกรอบ	ไม่พบ	

4. สรุป (Conclusion)

งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการหาปริมาณสารอะคริลาไมด์ในผลิตภัณฑ์อาหารทอด โดยได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าวิธีทดสอบ In-house method based on analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS, food application: agilent technologies. มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยให้ค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยร้อยละ 100.7 95.3 และ 103.8 ที่ระดับความเข้มข้น 20 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และความเที่ยง ซึ่งแสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.82-8.00 นอกจากนี้พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจวัด เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการหาปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ ปีงบประมาณ 2563

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Safety evaluation of certain contaminants in food. In: *WHO Food Additives Series, No. 63/FAO JECFA Monographs 8*. Geneva: WHO Press, 2011.
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Safety evaluation of certain contaminants in food. In: *WHO Food Additives Series, No. 55/FAO Food and Nutrition Paper, No. 82*. Geneva: WHO Press, 2006.
- [3] FAO/WHO (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2011. Evaluation of certain food contaminants. seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Rome, 16–25 February 2010). *WHO Technical Reports Series 959*.
- [4] TAREKE, E., P. RYDBERG, P. KARLSSON, S. ERIKSSON, and M. TÖRNQVIST. Acrylamide: a cooking carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*. 2000, **13**(6), 517-522.
- [5] SWENSSON, K., L. ABRAMSSON, W. BECKER, A. GLYNN, S. HELLEN, E. K., Y. LIND, and N. ROS. J. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Journal of the Food and Chemical Toxicology*, 2003, **41**, 1581-1586.
- [6] SÖRGE, F., M. KINZIG-SCHIPPERS, M. ILLAUER, A. SKOTT, C. LANDERSDORFER, R. WEISSENBACHER, and A. HOFMANN. Acrylamide: Increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Journal of Chemotherapy*. 2002, **48**(6), 267-274.
- [7] KLAUS, A.N. and W. SCHMAHL, Mutagenic and teratogenic effects of acrylamide in the mammalian spot tests. *Mutation Research*. 1989, **226**(3), 157-162.
- [8] BERGMARK, E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers, and nonsmokers. *Journal of Chemical Research*. 1997, **16**, 579-591.
- [9] TILSON, H.A. The neurotoxicity of acrylamide: An overview. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 1981, **3**(4), 455-461.
- [10] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). In: *Health and Environmental Effects Profile for Acrylamide*. Washington, D.C. : U.S. EPA, 1985. pp. 95.
- [11] KLAASEN, C.A.M. and J. DOULL. Casaret and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York: Macmillan, 1986.
- [12] SHANKER, R. and P.K. SETH. Toxic effects of acrylamide in a fresh water fish, *Heteropneustes fossilis*. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 1986, **37**(2), 274-280.
- [13] RASFF-the Rapid Alert System for Food and Feed [online]. Available from: <https://webgate.ec.europa.eu/>. [viewed 2018-04-16].
- [14] ศาลสหรัฐฯ สั่งรื้อกาแฟแบรนด์ดัง ติดป้ายเตือนมะเร็ง [ออนไลน์]. 30 มีนาคม 2561. เข้าถึงจาก: <https://www.posttoday.com/world/546155>. [อ้างถึงวันที่ 6 เมษายน 2561].
- [15] NA JOM, K., P. JAMNONG, and S. LERTSIRI. Investigation of acrylamide in curries made from coconut milk. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(1), 119-124.
- [16] ศูนย์วิจัยและประเมินความเสี่ยงด้านความปลอดภัยสถาบันอาหาร [ออนไลน์]. เข้าถึงจาก: <http://fic.nfi.or.th/foodsafety/>. [อ้างถึงวันที่ 6 เมษายน 2561]

- [17] KOMTHONG, P., O. SURIYAPHAN, and J. CHAROENPANICH. Determination of acrylamide in Thai conventional snacks from Nong Mon market, Chonburi using GC-MS technique. *Food Additives and Contaminants (Part B)*. 2012, **5**(1), 20-28.
- [18] จิตติมา เจริญพานิช. สารอะคริลาไมด์ที่แฝงมากับอาหารไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์มข.* 2555, **40**(4), 1059-1072.
- [19] MICRO, S., E. ROSS, and J. WILLIAMS. Determination of Acrylamide in Processed Foods using ACQUITY I-Class and Xevo TQ-S micro. *Waters*, 2020.
- [20] TÖIGYESI, Á. and V. K. SHARMA. Determination of acrylamide in gingerbread and other food samples by HILIC-MS/MS: A dilute-and-shoot method. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, **1136**, 121933 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121933>. [viewed 2019-10-20]
- [21] ZHANG, Y., Y. REN, J. JIAO, D. LI, and Y. ZHANG. Ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of asparagine, sugars, and acrylamide in Maillard reactions. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**(9), 3297–3304.
- [22] DE PAOLA, E.L., G. MONTEVECCHI, F. MASINO, D. GARBINI, M. BARBANERA, and A. ANTONELLI. Determination of acrylamide in dried fruits and edible seeds using QuEChERS extraction and LC separation with MS detection. *Food Chemistry*. 2017, **217**, 191–195.
- [23] FERNÁNDEZ, A., M.I. TALAVERANO, F. PÉREZ-NEVADO, E. BOSELLI, A.M. CORDEIRO, S. MARTILLANES, R. FOLIGNI, and D. MARTIN-VERTEDOR. Evaluation of phenolics and acrylamide and their bioavailability in high hydrostatic pressure treated and fried table olives. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2020, **44**(4), 14384.
- [24] SINGH, P., P. SINGH, and R.B. RAJA. Determination of acrylamide concentration in processed food products using normal phase high-performance liquid chromatography (HPLC). *African Journal of Biotechnology*. 2010, **9**(47), 8085–8091.
- [25] GENG, Z.M., P. WANG, and A.M. LIU. Determination of acrylamide in starch-based foods by HPLC with pre-column ultraviolet derivatization. *Journal Chromatographic Science*. 2011, **49**(10), 818–824.
- [26] LONGHUA, XU., Z. LIMIN, Q. XUGUANG, X. ZHIXIANG, and S. JIAMING. Determination of trace acrylamide in potato chip and bread crust based on SPE and HPLC. *Chromatographia*. 2012, **75**, 269–274.
- [27] SUN, S.Y., Y. FANG, and Y.M. XIA. A facile detection of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC strategy. *Food Control*. 2012, **26**(2), 220–222.
- [28] YAO, W.J. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography with nitrogen chemiluminescence detection. *Journal of Separation Science*. 2015, **38**(13), 2272–2277.
- [29] SARAJI, M. and S. JAVADIAN. Single-drop microextraction combined with gas chromatography-electron capture detection for the determination of acrylamide in food samples. *Food Chemistry*. 2019, **274**, 55–60.
- [30] KAMANKESH, M., A. NEMATOLLAHI, A. MOHAMMADI, and R. FERDOWSI. Investigation of composition, temperature, and heating time in the formation of acrylamide in snack: central composite design optimization and microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods* [online]. 2020, **14**, 44-53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01849-6>. [viewed: 2019-10-20].
- [31] KANG, C., H. MA, Y. LI, C. ZHANG, Y. HONG, and M. SHAO. Determination of acrylamide in foods by automatic accelerated solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Chromatographica* [online]. 2020, **33**(1), 64-72. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/1326/aop/article-10.1556-1326.2020.00755/article-10.1556-1326.2020.00755.xml>. [viewed: 2019-10-20].

- [32] Al-TAHER, FADWA. *Analysis of acrylamide in french fries using agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS* [online]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-5940EN.pdf> [viewed 2022-05-24].
- [33] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ DMSc F1074: การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารโดย LC/MS-MS. ในวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560. หน้า 41-46.
- [34] ZHAO, HUI. *Quantification of acrylamide in a variety of food matrices by LC/MS/MS triple quadrupole* [online]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-acrylamide-food-6470-qqq-5994-0820en-agilent.pdf>. [viewed 2022-05-24].
- [35] MAGNUSSON, B. and U. ORNEMARK (eds.). *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods-a laboratory guide to method validation and related topics*. 2nd ed., Teddington, Middlesex: Eurachem Secretary, 2014.