

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โทรเพน อัลคาลอยด์ ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry

ภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว¹ ไกรวุฒิ นวลขาว¹

บทคัดย่อ

โทรมเพนอัลคาลอยด์ (tropane alkaloids, TAs) ได้แก่ แอตโทรปีน (atropine, At) และสโคโพลามีน (scopolamine, Sc) เป็นสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิที่มีความเป็นพิษ โดยพบมากในวัชพืชของวงศ์พืชโซลานาซี (Solanaceae) โดยเฉพาะในสกุล *Datura* และ *Atropa* ซึ่งสารเหล่านี้สามารถปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารและอาหารสัตว์ที่มาจากพืชในลักษณะเดียวกันได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการที่เชื่อถือได้ มีความไว และแม่นยำ สำหรับการตรวจวัดปริมาณของ TAs ในข้าวโพดโดยใช้เทคนิค (LC-MS/MS โดยตัวอย่างข้าวโพดถูกสกัดด้วยตัวทำละลายผสม เมเทนอล:น้ำ:กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 60:39:0.4 (ปริมาตร/ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นทำการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค dSPE C18 และกรองก่อนวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS การแยกสารทำโดยใช้ gradient elution ด้วย 5 mM แอมโมเนียมฟอสเฟต และเมเทนอลที่มีกรดฟอร์มิก 0.1% วิธีนี้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทาง SANTE/11352/2021 โดยมีค่าความแม่นยำ (accuracy) โดย %recovery อยู่ในช่วง 70–120% และค่าความเที่ยง (precision) โดยพิจารณาจากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) น้อยกว่า 20% ค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) และค่าขีดจำกัดการวัดปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) โดยค่า% SSE พบว่าอยู่ที่ 17.51% สำหรับแอตโทรปีน และ 14.46% สำหรับสโคโพลามีน ส่วนการประเมินความไวและความเป็นเชิงเส้นของวิธีวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นที่คำนวณย้อนกลับมีค่าระหว่าง -0.24% ถึง 4.86% ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ TAs ในข้าวโพดได้อย่างเหมาะสม

คำสำคัญ: การพิสูจน์ความใช้ได้, โทรเพน อัลคาลอยด์, LC-MS/MS, ข้าวโพด

Method validation for tropane alkaloids determination in maize by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Panuwat Sungpethkaew¹ Kraiwut Nualkaw¹

Abstract

The tropane alkaloids (TAs) atropine (At) and scopolamine (Sc) are toxic secondary metabolites predominantly found in weeds of the Solanaceae plant family, particularly within the genera *Datura* and *Atropa*. These compounds can contaminate similar types of plant-based food and feed materials. The objective of this study was to develop and validate a reliable, sensitive, and accurate method for the determination of TAs in maize using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Maize samples were extracted using a solvent mixture of methanol:water:formic acid (60:39:0.4, v/v/v), followed by purification with C18 dispersive solid-phase extraction (dSPE) and filtration prior to LC-MS/MS analysis. Chromatographic separation was achieved using gradient elution with 5 mM ammonium formate and methanol containing 0.1% formic acid. Method performance complied with the SANTE/11352/2021 guidelines, achieving mean recovery accuracies within 70–120% and precision (relative standard deviation, %RSD) below 20%. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 5 µg/kg and 10 µg/kg, respectively. Matrix effect evaluation showed signal suppression/enhancement (SSE) values of 17.51% for atropine and 14.46% for scopolamine. Sensitivity and linearity assessments showed back-calculated concentration deviations ranging from -0.24% to 4.86%. These results indicate that the developed method is suitable for the identification and quantification of TAs in maize.

Keywords: method validation, tropane alkaloids, LC-MS/MS, maize

1. ชื่อโครงการ

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ tropane alkaloids ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry

2. ผู้ควบคุมดูแลโครงการ

นายไกรวุฒิ นวลขาว

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

3. ผู้รับผิดชอบ

นายภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

4. วัตถุประสงค์

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ tropane alkaloids ในข้าวโพด เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

5. ขอบข่าย

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ tropane alkaloids ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry ตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 V2

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิธีวิเคราะห์ tropane alkaloids ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry

7. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

7.1 เครื่องมือ

7.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ AB Sciex รุ่น QTRAP5500

7.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG 603-S และ
ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA623S-CW

7.1.3 เครื่อง Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2

7.1.4 เครื่อง Nitrogen Evaporator ยี่ห้อ Biotage

7.1.5 เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MFD

7.1.6 เครื่อง Vacuum pump ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S

7.1.7 เครื่อง shaker ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น LS500

7.1.8 Micropipette ขนาด 2 – 20 μ L

- 7.1.9 Micropipette ขนาด 10 – 100 μL
- 7.1.10 Micropipette ขนาด 100 - 1,000 μL
- 7.1.11 Micropipette ขนาด 500 - 5,000 μL

7.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

7.2.1 สารเคมี

- 7.2.1.1 สารเคมีเกรด LC-MS ได้แก่ ammonium formate solution, formic acid
- 7.2.1.2 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (CH_3CN), methanol
- 7.2.1.3 น้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า $18.2 \text{ M}\Omega^{-\text{cm}}$

7.2.2 สารมาตรฐาน

- 7.2.2.1 สารมาตรฐาน (reference standard) Atropine และ Scopolamine ความเข้มข้น $1,000 \mu\text{g/mL}$ ยี่ห้อ ChemFaces

7.3 อุปกรณ์

- 7.3.1 LC Column Kinetex EVO C18 $2.1 \times 100 \text{ mm.}$, $2.6 \mu\text{m}$. ยี่ห้อ Phenomenex
- 7.3.2 Centrifuge tube ขนาด 50 mL
- 7.3.3 Syringe พลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม
- 7.3.4 Syringe Filters ชนิด PTFE ขนาด $0.20 \mu\text{m}$
- 7.3.5 Vial HPLC พร้อมฝาและ septum
- 7.3.6 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mL
- 7.3.7 กระบอกตวงขนาด 50, 100, 1,000 mL
- 7.3.8 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ mobile phase

8. วิธีดำเนินการ

8.1 เตรียมสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรง และเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive ionization)

8.2 Precursor ion scan

ทำการสแกนหาผลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion ของสารมาตรฐาน โดยการกำหนดช่วงของค่า m/z ($Q1$) ให้ทำงานในโหมดสแกน เมื่อได้ค่า m/z ของ precursor ion ที่สนใจ แล้วจึงทำการหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของ precursor ion ได้แก่ declustering potential (DP) และ entrance potential (EP)

8.3 Product ion scan

ทำการปรับตั้ง Q1 โดยยอมให้เฉพาะ precursor ion ผ่านไปยัง Q2 (collision cell) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว จากนั้นจึงใช้ Q3 มาทำการสแกนหา product ion สำหรับสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine ที่ให้ค่าสัญญาณสูงสุด

8.4 Multiple reaction monitoring (MRM)

การตรวจวัดทำได้โดยการปรับตั้ง Q1 ให้เฉพาะ m/z ของ precursor ion ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านไป และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว จากนั้นตั้ง Q3 ให้ตรวจวัดเฉพาะ product ion ที่เกิดจากการแตกตัวจาก precursor ion ที่ต้องการ แล้วจึงทำการหาค่าพลังงานที่ใช้แตกตัวให้เหมาะสม ได้แก่ collision energy (CE) และ collision cell exit potential (CXP)

8.5 ทดสอบสภาวะสำหรับการแยกสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง (UHPLC) แบบ reverse phase ของเครื่อง LC-MS/MS

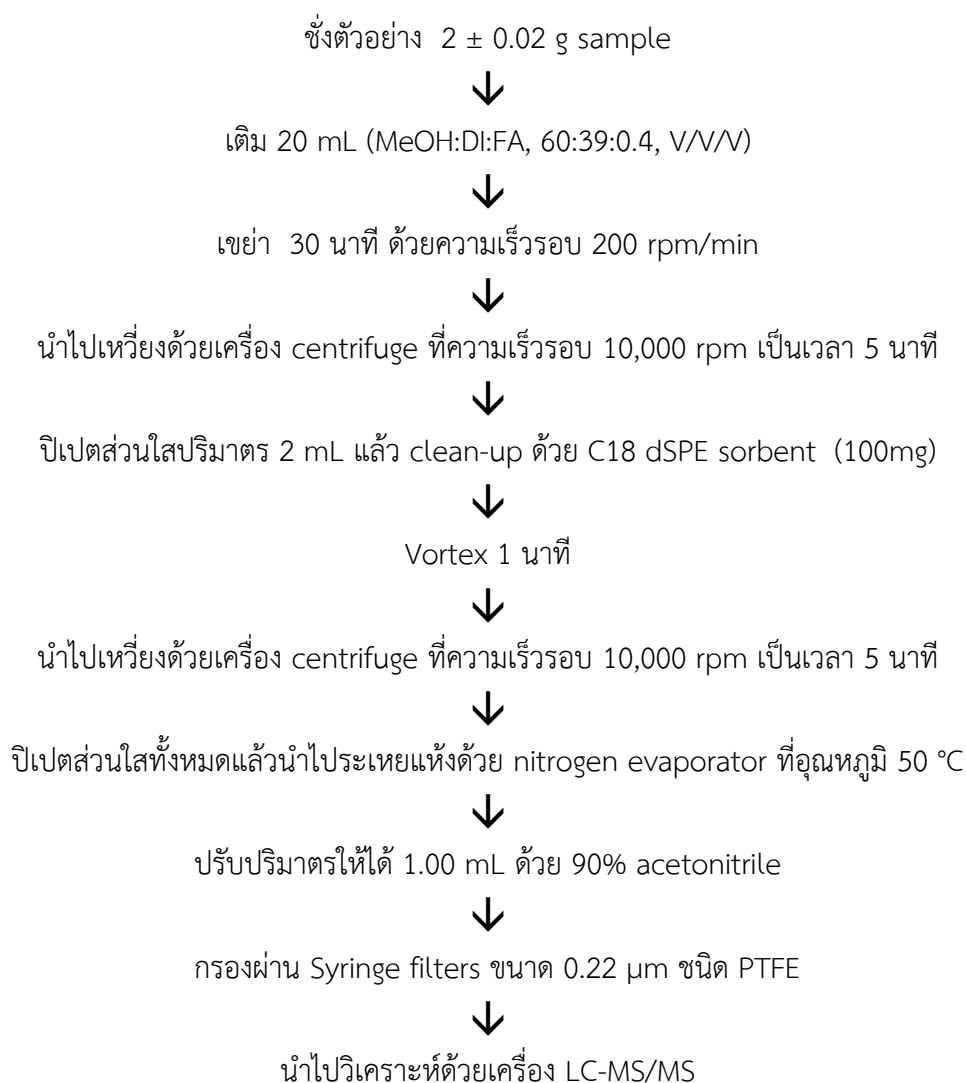
8.6 ทำการตรวจสอบ linearity and range ทำการทดสอบโดยสร้างกราฟมาตรฐานในตัวละลายอย่างน้อย 6 ระดับความเข้มข้น โดยกราฟมาตรฐานจะสร้างระหว่างแกน y คือ area ของ PAs และ แกน X คือความเข้มข้นของ PAs ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($y = mx + c$) และประเมินจากค่า %deviation of back-calculated concentration โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นจริง (C_{True}) เทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ ($C_{Measured}$) ของสารมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้นต้องผิดพลาดไม่เกิน $\pm 20\%$ ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2

$$\text{Deviation of back-calculated concentration (\%)} = (C_{Measured} - C_{True}) \times 100 / C_{True}$$

8.7 ทำการตรวจสอบโดยประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) จากค่า % signal suppression and enhancement (%SSE) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายจากการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่มีสภาวะของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ดีที่สุดซึ่งค่าการยอมรับอยู่ระหว่าง 80-120% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2

$$\%SSE = \frac{\text{slope (matrix-matched calibration curve)}}{\text{slope (standard calibration curve)}} \times 100$$

8.8 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ tropane alkaloids จากวิธีอ้างอิง (Dzuman, 2020)



8.9 การทดสอบเพื่อหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และค่าขีดการจำกัดของการตรวจวัด (LOQ) โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน tropane alkaloids ความเข้มข้นระดับที่ 1 แล้วทำตามวิธีทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S_0'$ และค่า LOQ จาก $10S_0'$ (Eurachem, 2014) โดยมีวิธีคำนวณหา S_0' ดังนี้

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

โดยที่ S_0' = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล
 n = จำนวนการทดสอบซ้ำในการทดสอบประจำวัน

8.10 การยืนยันค่า LOD (Limit of detections) โดยการเติมสารมาตรฐาน Atropine, Scopolamine ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg และ 5 µg/kg ลงใน sample blank ตามลำดับ แล้วนำไปทำตามขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 10 ซ้ำ ผลที่ได้ต้องอยู่ระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3

8.11 การยืนยันค่า LOQs (Limit of Quantifications) โดยการเติมสารมาตรฐาน Atropine, Scopolamine ที่ความเข้มข้น 20 µg/kg และ 10 µg/kg ลงใน sample blank ตามลำดับ แล้วนำไปทำตามขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 10 ซ้ำ ผลที่ได้ต้องอยู่ระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3 และได้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 70-120 % และค่า %RSD_r ≤ 20 %

9. ผลการทดลอง

9.1 จากผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับส่วนการแยกสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 1-4 และแสดงโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine ใน positive ionization mode แสดงดังรูปที่ 1-4

ตารางที่ 1 แสดง HPLC conditions

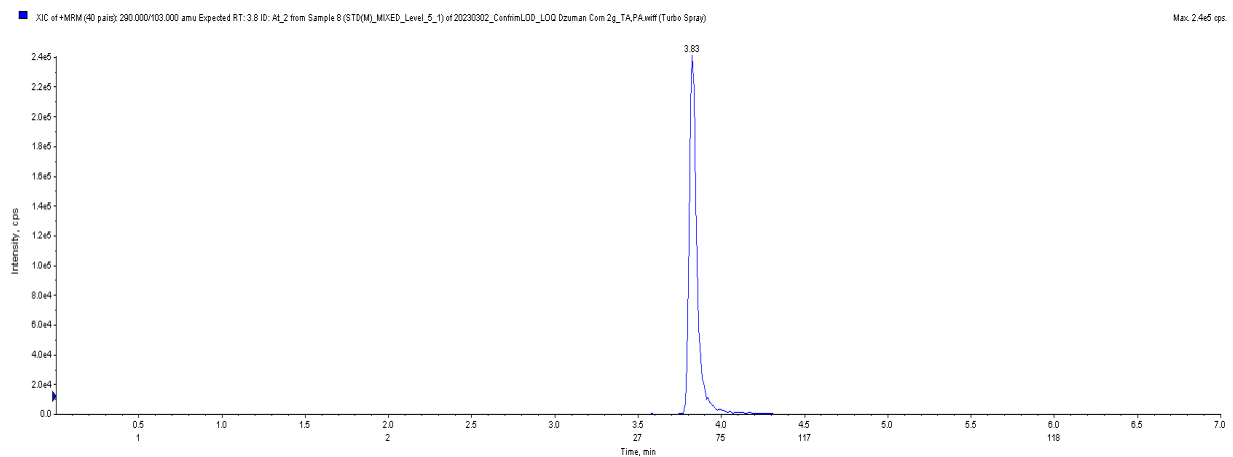
Parameters	Conditions
HPLC Column	Kinetex EVO C18 2.1×100 mm., 2.6 µm
Flow rate	0.35 mL/min
Injection volume	3 µL
Run time	21.00 min
Mobile phase A	5 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in water
Mobile phase B	5 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in methanol
Elution mode	Gradient elution

ตารางที่ 2 แสดงสถานะของ Interface parameter ของแหล่งกำเนิดไอออนแบบ ESI

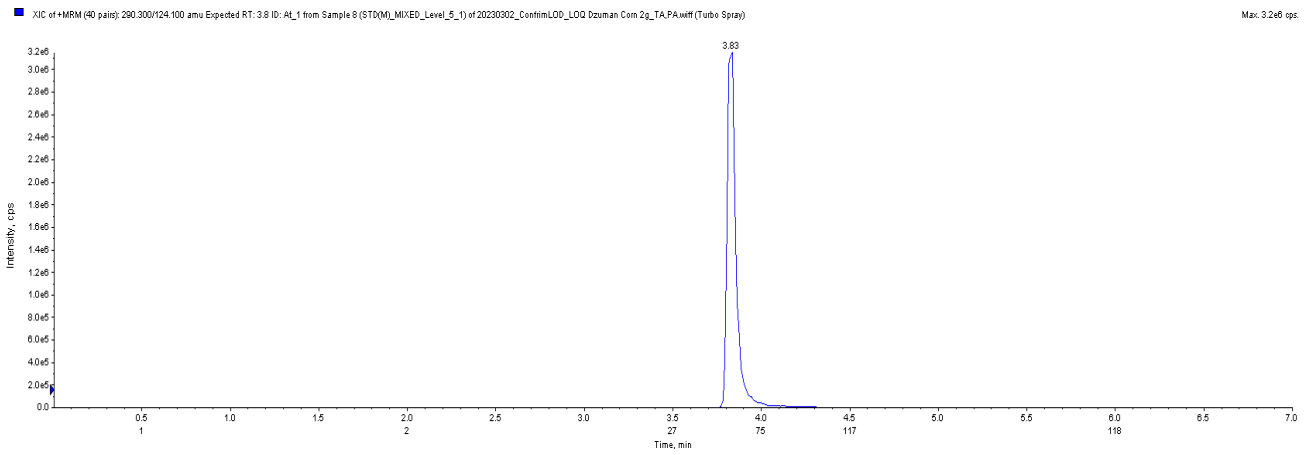
Parameters	Setting Values
Ion Source	ESI (+)
Curtain Gas (CUR)	40 psi
Collision Gas (CAD)	Medium
Ion Spray Voltage (IS)	4500 V
Temperature (TEM)	600 °C
Ion Source Gas 1 (GS1)	60 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	80 psi

ตารางที่ 3 แสดง MS/MS parameters แบบ MRM ของสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine

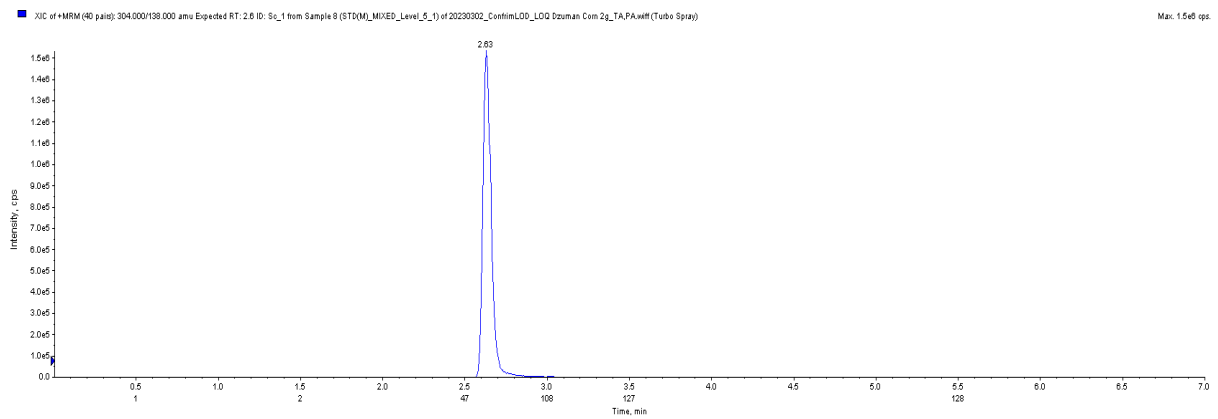
Analyte	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Atropine	3.70	290.3	124.1	66.11	10	31.01	8.28
		290.3	103.0	68.80	10	67.77	14.73
Scopolamine	2.60	304.0	138.0	66.00	10	31.00	13.52
		304.0	156.0	68.00	10	23.00	12.00



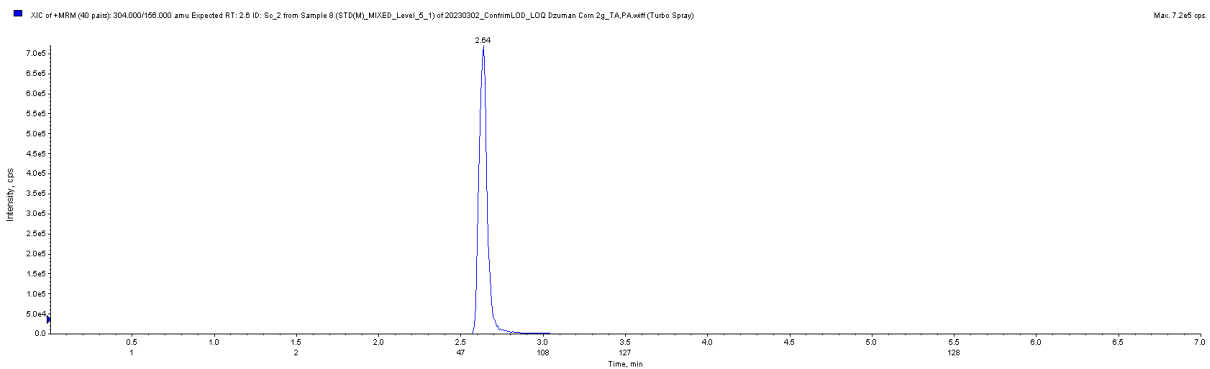
รูปที่ 1 แสดง XIC (quantitative peak) ของสารมาตรฐาน atropine ที่ความเข้มข้น 400 ng/ml



รูปที่ 2 แสดง XIC (qualitative peak) ของสารมาตรฐาน atropine ที่ความเข้มข้น 400 ng/mL

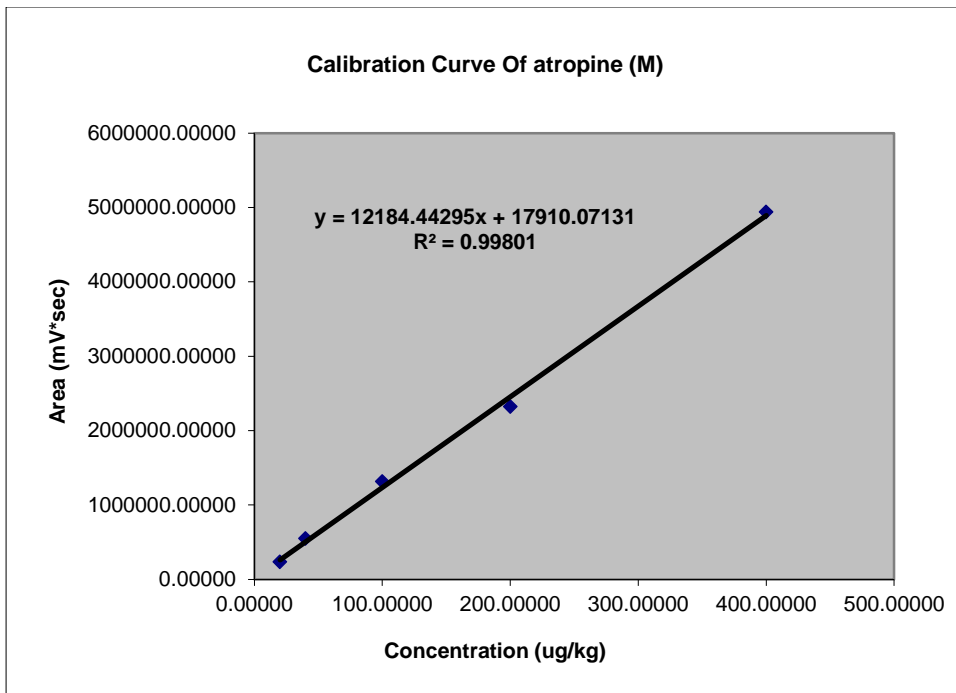


รูปที่ 3 แสดง XIC (quantitative peak) ของสารมาตรฐาน scopolamine ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL



รูปที่ 4 แสดง XIC (qualitative peak) ของสารมาตรฐาน scopolamine ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL

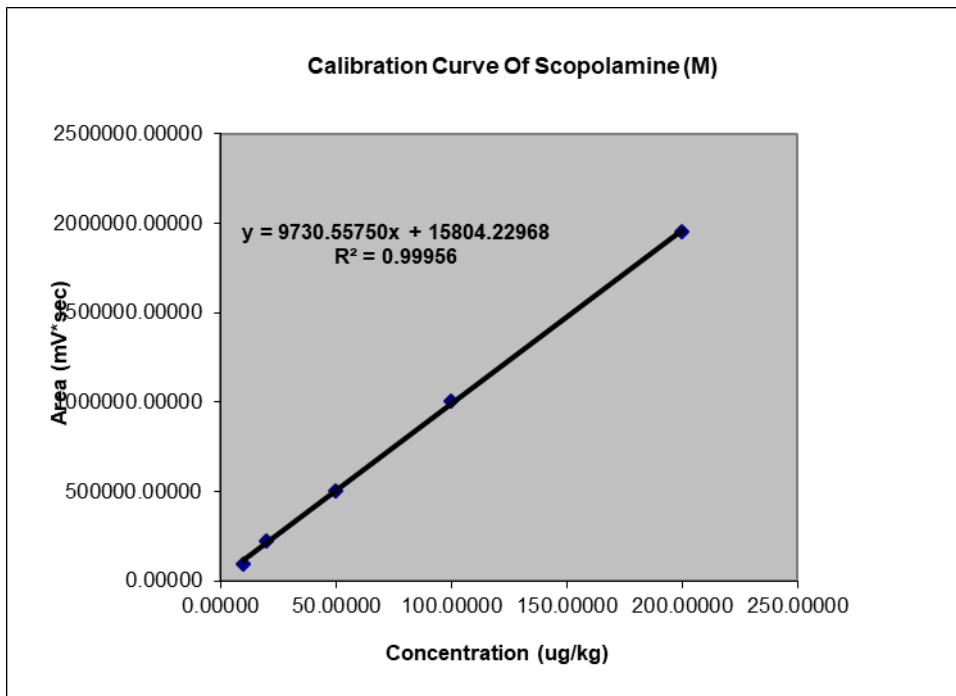
9.2 จากผลของการทดสอบ linearity and range ของสารมาตรฐาน atropine และ scopolamine และสร้างเป็นกราฟมาตรฐานที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990 พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (AOAC, 2019) ดังรูปที่ 5 และ 6 และคำนวณความเข้มข้นจริงกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ โดยพิจารณาจากความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐานต้องไม่เกิน $\pm 20\%$ ดังตารางที่ 5 และ 6 ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (SANTE/11312/2021 V2, 2022)



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน atropine

ตารางที่ 4 แสดงค่า deviation of back calculated concentration ของกราฟมาตรฐาน atropine

True concentration (ng/mL)	Calculated concentration (ng/mL)	Deviation of back calculated concentration (%)
20	19.06	4.86
40	40.10	-0.24
100	97.58	2.57
200	205.25	-2.54
400	398.02	0.49



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน scopolamine

ตารางที่ 5 แสดงค่า deviation of back calculated concentration ของกราฟมาตรฐาน scopolamine

True concentration (ng/mL)	Calculated concentration (ng/mL)	Deviation of back calculated concentration (%)
10	9.90	0.93
20	19.69	1.53
50	50.52	-1.00
100	99.96	0.04
200	199.92	0.04

9.3 จากผลการทดสอบผลกระทบบจากเมทริกซ์ โดยประเมินจากค่า %SSE ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายพบว่าสาร atropine ได้ 17.51 % และ scopolamine ได้ 14.46 % ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ 80-120% (SANTE/11312/2021 V2, 2022)

9.4 จากผลการทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Atropine และ Scopolamine คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ผลดังตารางที่ 7 – 10

ตารางที่ 6 ข้อมูลของตัวอย่าง sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Atropine ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1

No.	Conc spike (ppb)	Conc ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	S/N
1	20	16.50	536.40
2	20	16.04	452.60
3	20	12.45	580.90
4	20	15.40	551.30
5	20	15.66	500.20
6	20	16.02	432.50
7	20	14.52	449.90
8	20	13.72	391.90
9	20	10.97	470.20
10	20	12.31	473.70
Average		14.36	
SD		1.91	
n		1	
LOD=3SD		5.72	
LOQ=10SD		19.08	

ตารางที่ 7 ข้อมูลของตัวอย่าง sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Scopolamine ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1

No.	Conc spike (ppb)	Conc ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	S/N
1	10	9.27	758.20
2	10	8.64	824.70
3	10	7.72	898.00
4	10	8.65	521.60
5	10	8.41	605.10
6	10	8.44	622.80
7	10	8.46	645.80
8	10	7.19	652.40
9	10	6.92	696.10
10	10	6.61	627.40
Average		8.03	
SD		0.87	
n		1	
LOD=3SD		2.61	
LOQ=10SD		8.71	

9.5 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและค่าขีดการจำกัดของการตรวจวัดสาร Atropine และ Scopolamine โดยค่า LOD เท่ากับ $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ และค่า LOQ เท่ากับ $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ และ LOD เท่ากับ $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ และค่า LOQ เท่ากับ $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ตามลำดับ โดยแสดงค่า LOD และ LOQ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ Limit of detection (LOD) และ ค่าขีดการจำกัดของการตรวจวัด (Limit of quantitation, LOQ) สาร Atropine

No.	LOD = 10 µg/kg		LOQ = 20 µg/kg	
	S/N	Concentration (µg/kg)	%recovery	S/N
1	641.60	19.93	99.65	571.80
2	439.50	21.31	106.54	429.40
3	468.20	19.80	98.99	371.60
4	413.90	20.01	100.04	449.90
5	404.90	18.97	94.85	637.70
6	483.50	20.80	103.99	443.30
7	508.30	21.38	106.89	494.10
8	576.50	21.06	105.32	455.60
9	413.90	20.74	103.71	541.00
10	490.90	19.15	95.73	542.30
Average	484.12	20.31	101.57	493.67
SD	-	0.87	4.34	
%RSD	-	4.27	4.27	

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ Limit of detection (LOD) และ ค่าขีดการจำกัดของการตรวจวัด (Limit of quantitation, LOQ) สาร Scopolamine

No.	LOD = 5 µg/kg		LOQ = 10 µg/kg	
	S/N	Concentration (µg/kg)	%recovery	S/N
1	440.40	11.06	110.63	493.30
2	445.70	11.10	110.96	494.30
3	409.40	11.14	111.42	580.10
4	540.60	10.90	108.96	631.20
5	448.80	11.37	113.66	537.20
6	383.40	11.15	111.52	577.30
7	500.40	11.27	112.74	513.20
8	399.20	11.75	117.50	600.90
9	458.40	11.09	110.86	595.40
10	433.80	10.50	105.04	541.10
Average	446.01	11.13	111.33	556.40
SD	-	0.32	3.19	
%RSD	-	2.87	2.87	

9.6 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยงของวิธีทดสอบ (precision) สำหรับสารกลุ่ม Tropane alkaloids (Atropine, Scopolamine) พบว่าค่า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 84.09–95.58 % และ 84.74-93.06 % ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 11 และ 12 และค่าความเที่ยง แสดงจากค่า %RSD_r ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ คือ ≤ 20% พบว่าค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ (repeatability) ได้ค่า %RSD_r อยู่ระหว่าง 3.14–3.29 % และ 2.74-3.97 % ตามลำดับ และค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกันแต่นักวิเคราะห์ และต่างวันที่วิเคราะห์ (within-laboratory reproducibility) ได้ค่า %RSD_{wR} อยู่ระหว่าง 2.65–7.65 % และ 2.91-3.79 % ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 10 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของสาร Atropine

No.	20 µg/kg		100 µg/kg		400 µg/kg	
	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
1	16.99	84.93	92.97	92.97	359.91	89.98
2	17.60	87.99	100.19	100.19	341.63	85.41
3	16.38	81.92	93.85	93.85	333.64	83.41
4	16.24	81.19	93.40	93.40	333.78	83.45
5	16.88	84.42	97.49	97.49	340.40	85.10
Average	16.82	84.09	95.58	98.58	341.87	85.47
SD	0.54	2.70	3.14	3.14	10.73	2.68
%RSD	3.21	3.21	3.29	3.29	3.14	3.14

ตารางที่ 11 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของสาร Scopolamine

No.	10 µg/kg		50 µg/kg		200 µg/kg	
	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
1	8.78	87.79	44.73	89.47	177.40	88.70
2	8.88	88.81	46.94	93.88	166.89	83.45
3	8.79	87.87	46.24	92.47	159.65	79.82
4	8.62	86.15	48.40	96.81	173.22	86.61
5	9.26	92.65	46.33	92.66	170.27	85.14
Average	8.87	88.65	46.53	93.06	169.49	84.74
SD	0.24	2.43	1.33	2.65	6.72	3.36
%RSD	2.74	2.74	2.85	2.85	3.97	3.97

ตารางที่ 12 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (precision) ของสาร Atropine

Condition	No.	20 µg/kg		100 µg/kg		400 µg/kg	
		Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
Staff 1	1	16.99	84.93	92.97	92.97	359.91	89.98
	2	17.60	87.99	100.19	100.19	341.63	85.41
	3	16.38	81.92	93.85	93.85	333.64	83.41
	4	16.24	81.19	93.40	93.40	333.78	83.45
	5	16.88	84.42	97.49	97.49	340.40	85.10
Staff 2	1	14.28	71.39	81.67	81.67	331.36	82.84
	2	14.84	74.20	86.44	86.44	329.35	82.34
	3	15.09	75.47	89.14	89.14	342.30	85.57
	4	14.28	71.42	89.66	89.66	331.08	82.77
	5	14.95	74.76	93.65	93.65	337.02	84.25
Average		15.75	78.77	91.84	91.84	338.05	84.51
SD		1.20	6.03	5.34	5.34	8.96	2.24
%RSD		7.65	7.65	5.82	5.82	2.65	2.65

ตารางที่ 13 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (precision) ของสาร Scopolamine

Condition	No.	10 µg/kg		50 µg/kg		200 µg/kg	
		Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
Staff 1	1	8.78	87.79	44.73	89.47	177.40	88.70
	2	8.88	88.81	46.94	93.88	166.89	83.45
	3	8.79	87.87	46.24	92.47	159.65	79.82
	4	8.62	86.15	48.40	96.81	173.22	86.61
	5	9.26	92.65	46.33	92.66	170.27	85.14
Staff 2	1	8.21	82.10	46.10	92.20	167.52	83.76
	2	8.52	85.18	44.12	88.25	165.00	82.50
	3	8.16	81.64	42.84	85.67	168.08	84.04
	4	8.46	84.60	44.19	88.38	169.86	84.93
	5	8.51	85.06	44.37	88.75	164.58	82.29
Average		8.62	86.19	45.43	90.85	168.25	82.12
SD		0.33	3.27	1.65	3.31	4.89	2.45
%RSD		3.79	3.79	3.64	3.64	2.91	2.91

9.7 การประมาณค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 จากข้อมูล method validation โดยนำข้อมูล within-laboratory reproducibility พบว่าความไม่แน่นอนขยาย; U'(expanded) พบว่าไม่เกิน 50% (SANTE, 2021) ตามตารางที่ 14 ถึงตารางที่ 19

ตารางที่ 14 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสาร Atropine ที่ระดับความเข้มข้น 20 µg/kg

Atropine	Spike Level (20 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	20	16.99	-15.07
2	20	17.60	-12.01
3	20	16.38	-18.08
4	20	16.24	-18.81
5	20	16.88	-15.58
6	20	14.28	-28.61
7	20	14.84	-25.80
8	20	15.09	-24.53
9	20	14.28	-28.58
10	20	14.95	-25.24
N	10		
mean		15.75	-21.23
SD.Pbias (stdev) (%)		-	6.03
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		1.21	-
RSDwR (%)		7.65	-
U'(bias) (%)		-	22.07
U'precision		7.65	-
U'combine (%)		23.36	23.36
U'expanded (%)		46.72	-

ตารางที่ 15 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสาร Atropine ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/kg

Atropine	Spike Level (100 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	100	92.97	-7.03
2	100	100.19	0.19
3	100	93.85	-6.15
4	100	93.40	-6.60
5	100	97.49	-2.51
6	100	81.67	-18.33
7	100	86.44	-13.56
8	100	89.14	-10.86
9	100	89.66	-10.34
10	100	93.65	-6.35
N	10		
mean		91.85	-8.15
SD.Pbias (stdev) (%)		-	5.35
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		5.35	-
RSDwR (%)		5.82	-
U'(bias) (%)		-	9.75
U'precision		5.82	-
U'combine (%)		11.36	11.36
U'expanded (%)		22.71	-

ตารางที่ 16 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสาร Atropine ที่ระดับความเข้มข้น 400 µg/kg

Atropine	Spike Level (400 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	400	359.91	-10.02
2	400	341.63	-14.59
3	400	333.64	-16.59
4	400	333.78	-16.55
5	400	340.40	-14.90
6	400	331.36	-17.16
7	400	329.35	-17.66
8	400	342.30	-14.43
9	400	331.08	-17.23
10	400	337.02	-15.75
N	10		
mean		338.05	-15.49
SD.Pbias (stdev) (%)		-	2.24
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		8.96	-
RSDwR (%)		2.65	-
U'(bias) (%)		-	15.65
U'precision		2.65	-
U'combine (%)		15.87	15.87
U'expanded (%)		31.74	-

ตารางที่ 17 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสาร Scopolamine ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/kg

Scopolamine	Spike Level (10 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	10	8.78	-12.21
2	10	8.88	-11.19
3	10	8.79	-12.13
4	10	8.62	-13.85
5	10	9.26	-7.35
6	10	8.21	-17.90
7	10	8.52	-14.82
8	10	8.16	-18.36
9	10	8.46	-15.40
10	10	8.51	-14.94
N	10		
mean		8.62	-13.81
SD.Pbias (stdev) (%)		-	3.27
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		0.33	-
RSDwR (%)		3.79	-
U'(bias) (%)		-	14.20
U'precision		3.79	-
U'combine (%)		14.69	14.69
U'expanded (%)		29.39	-

ตารางที่ 18 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสาร Scopolamine ที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/kg

Scopolamine	Spike Level (50 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	50	44.73	-10.53
2	50	46.94	-6.12
3	50	46.24	-7.53
4	50	48.40	-3.19
5	50	46.33	-7.34
6	50	46.10	-7.80
7	50	44.12	-11.75
8	50	42.84	-14.33
9	50	44.19	-11.62
10	50	44.37	-11.25
N	10		
mean		45.43	-9.15
SD.Pbias (stdev) (%)		-	3.31
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		1.65	-
RSDwR (%)		3.64	-
U'(bias) (%)		-	9.73
U'precision		3.64	-
U'combine (%)		10.38	10.38
U'expanded (%)		20.77	-

ตารางที่ 19 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสาร Scopolamine ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/kg

Scopolamine	Spike Level (200 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	200	177.40	-11.30
2	200	166.89	-16.55
3	200	159.65	-20.18
4	200	173.22	-13.39
5	200	170.27	-14.86
6	200	167.52	-16.24
7	200	165.00	-17.50
8	200	168.08	-15.96
9	200	169.86	-15.07
10	200	164.58	-17.71
N	10		
mean		168.25	-15.88
SD.Pbias (stdev) (%)		4.89	2.45
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		4.89	-
RSDwR (%)		2.91	-
U'(bias) (%)		-	16.06
U'precision		2.91	-
U'combine (%)		16.32	16.32
U'expanded (%)		32.65	-

10. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS พบว่าสามารถใช้ค่าตามพารามิเตอร์ต่างๆ ในการตรวจวิเคราะห์ atropine และ scopolamine ได้ ส่วนการทดสอบความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่ 10-200 ng/mL และ 20-400 ng/ml โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) คือ 0.99956 และ 0.99801 และค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐานของอยู่ระหว่าง -0.24 ถึง 4.86 % สำหรับ atropine และ scopolamine ตามลำดับ

ส่วนการศึกษา matrix effect โดยประเมินจากค่า %SSE พบว่าไม่อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ %SSE อยู่ระหว่าง 80-120% โดย atropine เท่ากับ 17.51 % และ scopolamine เท่ากับ 14.46 %

สาร Atropine ค่า LOD เท่ากับ 10 µg/kg และ ค่า LOQ เท่ากับ 20 µg/kg ส่วนค่า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 94.85-106.89 % ของสาร

สาร Scopolamine ค่า LOD เท่ากับ 5 µg/kg และ ค่า LOQ เท่ากับ 10 µg/kg ส่วนค่า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 105.04-117.50 % ของสาร

ส่วนค่า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 84.09–95.58 % และ 84.74-93.06 % และค่าความเที่ยง แสดงจากค่า %RSD ซึ่งเกณฑ์การยอมรับคือ $\leq 20\%$ พบว่าค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ (repeatability) ได้ค่า %RSD_r อยู่ระหว่าง 3.14-3.29 และ 2.74-3.97 % และค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน แต่ต่างนักวิเคราะห์และต่างวันที่วิเคราะห์ (within-laboratory reproducibility) ได้ค่า %RSD_{wr} อยู่ระหว่าง 2.65-7.65 % และ 2.91-3.79 % และหัวข้อการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบสารพิษกลุ่ม Tropane alkaloid (Atropine, Scopolamine) ตามแนวทางของสหภาพยุโรป SANTE/11312/2021 พบว่าค่าความไม่แน่นอนขยาย (U(expanded)) ของสาร Atropine ที่ระดับความเข้มข้น 20, 100, 400 µg/kg เท่ากับ 46.72, 22.71, 31.74 % ตามลำดับ และสาร Scopolamine ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 200 µg/kg เท่ากับ 29.39, 20.77, 32.65 % โดยค่าความไม่แน่นอนขยายของวิธีทดสอบไม่เกิน 50%

11. เอกสารอ้างอิง

AOAC Official Methods of Analysis, (2019). Guidelines for dietary supplements and botanicals.

Appendix K, P.7.

Dzuman, Z., Jonatova, P., Zachariasova, M., Prusova, N., Brabenec, O., Novakova, A.,

Fenclova, F. and Hajšlová, J. (2020). Development of a new LC-MS method for accurate and sensitive determination of 33 pyrrolizidine and 21 tropane alkaloids in plant-based food matrices. Anal. Bioanal. Chem. 412: 7155-7167.

SANTE/11312/2021 V2. (2022). Guidance Document on Analytical Quality Control and

Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed.