การพัฒนาการตรวจวิธีวิเคราะห์สารไพร์โรลิซิดีน อัลคาลอยด์ ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ชัชวาลย์ โรจนทรัพย์ วิชุนันท์ ลีวรรณ์ สราวุธ ชูกระชั้น

บทคัดย่อ

สารกลุ่มไพรโรลิซิดีน อัลคาลอยด์ จัดเป็นสารพิษจากธรรมชาติที่พบได้บ่อยที่สุดชนิดหนึ่ง ซึ่งพืชสร้างขึ้นเพื่อใช้เป็นกลไกการป้องกันตัวเองทางเคมีจากสัตว์กินพืช เนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มนี้ในพื้นที่เกษตรกรรม จึงส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ ยังพบปัญหาการปนเปื้อนสารกลุ่มไพรโรลิซิดีน อัลคาลอยด์ ในน้ำผึ้ง เนื่องจากผึ้งเข้าเก็บน้ำหวานและเกสรจากดอกของพืชดังกล่าว ซึ่งก่อให้เกิดความเสี่ยงและอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไพร์โรลิซิดีน อัลคาลอยด์ จำนวน 21 ชนิดด้วยเทคนิค LC-MS/MS ในน้ำผึ้ง ผลการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 10–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) มีค่ามากกว่า 0.999 ทุกชนิดสาร ความแม่นประเมินผลด้วย %recovery อยู่ในช่วง 70.06–112.96% ความเที่ยงแบบการทวนซ้ำประประเมินผลด้วย $\%RSD_r$ อยู่ในช่วง 2.39–19.25% และความเที่ยงแบบการทำซ้ำประเมินผลด้วย $\%RSD_{wR}$ อยู่ในช่วง 3.95-19.62% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกชนิดสาร แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะ แม่นยำ น่าเชื่อถือ เหมาะสมสำหรับ ใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี, ไพร์โรลิซิดีน อัลคาลอยด์, น้ำผึ้ง, LC-MS/MS

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000; โทรศัพท์ 0-2967-9727

Development of an analytical method for pyrrolizidine alkaloids in honey using LC-MS/MS

Chatchawan Rodjanasap Vichunan Leewan Sarawut Chukrachan

ABSTRACT

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are among the most common naturally occurring toxic compounds produced by plants as a chemical defense mechanism against herbivores. The growth of PA-producing plants in agricultural areas may increase the risk of contamination along the human and animal food chains. Honey contamination with PAs may occur when honeybees collect nectar and pollen from PA-producing plants, potentially posing a health risk to consumers. This study aimed to develop and validate a method for the determination of 21 pyrrolizidine alkaloids in honey using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). The method validation showed that the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 5 and 10 µg/kg, respectively. The analytical range was 10–100 µg/kg, with coefficients of determination (r^2) greater than 0.999 for all analytes. Accuracy, expressed as percentage recovery, ranged from 70.06–112.96%. Precision, expressed as relative standard deviation under repeatability conditions (%RSD_r), ranged from 2.39–19.25%, while intermediate precision (%RSD_{wR}) ranged from 3.95–19.62%. All validation parameters met the established acceptance criteria. These results demonstrate that the developed LC–MS/MS method is specific, accurate, precise, and reliable, and is suitable for the routine determination of pyrrolizidine alkaloids in honey samples.

Keywords: method development and validation, pyrrolizidine alkaloids, honey, LC-MS/MS

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Ouality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development, Tivanont Road, Bangkadi Subdistrict, Muang District, Pathum Thani Province, 12000; Tel. 0 2967 9727

บทนำ

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) เป็นหนึ่งในกลุ่มสารพิษจากธรรมชาติที่พบได้บ่อยที่สุด ถูกผลิตขึ้นโดยพืชหลากหลายชนิดเพื่อเป็นกลไกการป้องกันตัวเองทางเคมีจากสัตว์ที่กินพืช พืชที่ผลิต PAs มักจะเติบโตในระบบการผลิตทางการเกษตร ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของอาหารมนุษย์และสัตว์ ผึ้งมักจะหาอาหารจากดอกไม้ของพืชที่ผลิต PAs ซึ่งนำไปสู่การปนเปื้อน PAs ในน้ำผึ้ง (Kowalczyk and Kwiatek, 2017) PAs ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตโดยพืช แต่ก็ผลิตโดยเชื้อราและแบคทีเรียด้วยเช่นกัน สาร PAs ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากความเป็นพิษ รวมถึงการพบในพืชหลายชนิดที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์มีการพบสาร PAs มากกว่า 660 ชนิด ซึ่งพบในพืชมากกว่า 6,000 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นพืช *Senecio spp.* และ *Eupatorium spp*. (Asteraceae วงศ์ทานตะวัน) *Echium spp*. (Boraginaceae วงศ์หญ้างวงช้าง) และ *Crotalaria spp*.(Fabaceae วงศ์ถั่ว) ปริมาณสาร PAs จะมากน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช สถานที่เก็บ เวลาการเก็บเกี่ยว และสภาพภูมิอากาศ โดยทั่วไปจะพบในปริมาณมากในดอกไม้และเมล็ด และพบในปริมาณน้อยในใบ เกสรตัวผู้และราก (Roncada *et al.,* 2023)

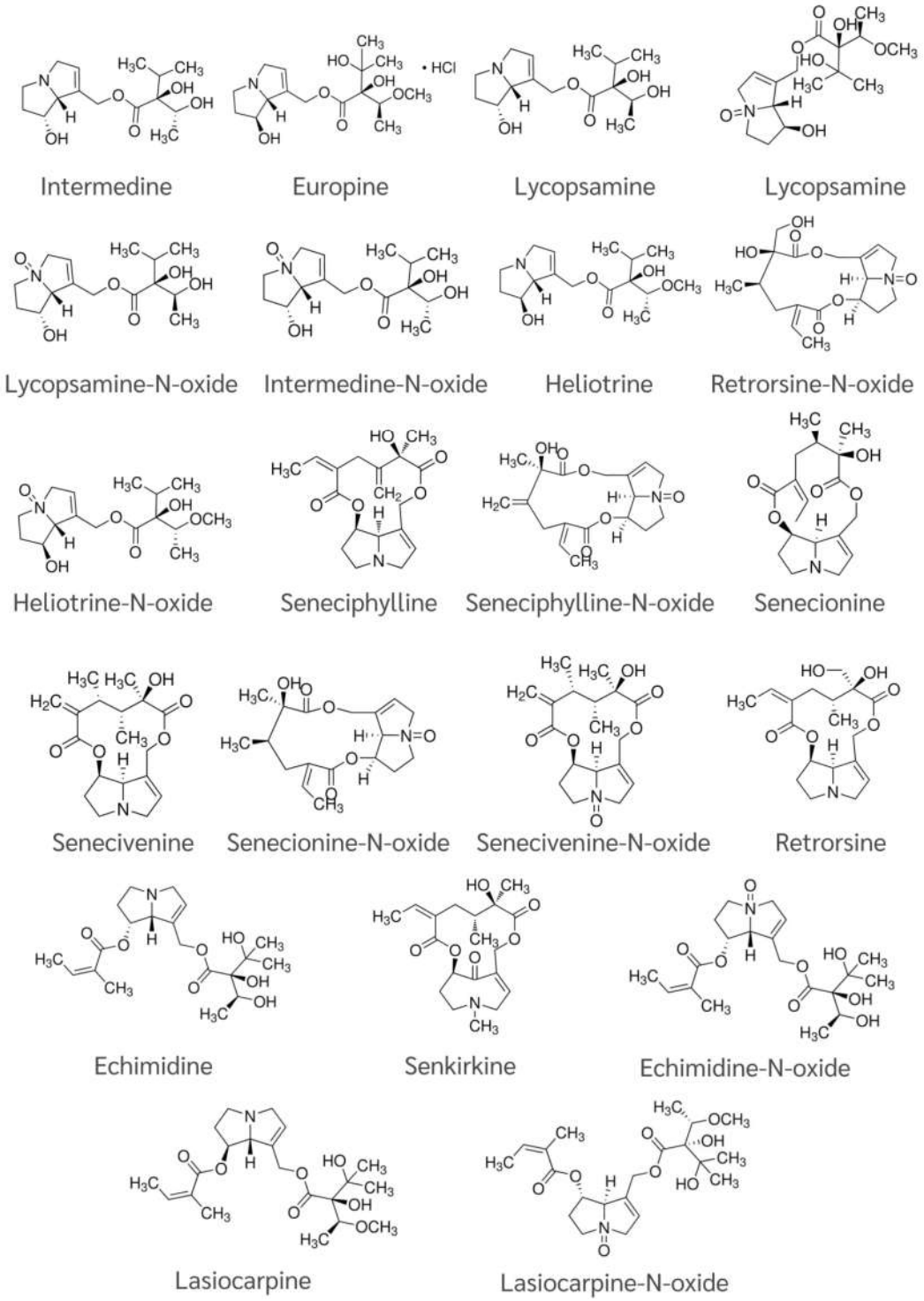
การจำแนกประเภทของ PAs มีระบบการจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่อ้างอิงจากการจับกันของ necine base กับ necic acid มี 5 ประเภท ได้แก่ 1.senecionine พบมากในพืชสกุล *Senecio* และ *Eupatorium* (วงศ์ Asteraceae) ถือเป็นกลุ่มที่พบได้บ่อยที่สุดกลุ่มหนึ่งในธรรมชาติ 2.lycopsamine พบเป็นหลักในพืชวงศ์ Boraginaceae และ Apocynaceae 3.triangularine ผลิตโดยพืชหลายชนิดในสกุล *Senecio* และพืชบางชนิดในวงศ์ Boraginaceae 4.monocrotaline พบมากในพืชสกุล *Crotalaria* (วงศ์ Fabaceae) และพืชบางชนิดในวงศ์ Boraginaceae และ 5.phalaenopsine เป็นกลุ่มเฉพาะที่พบได้ในพืชวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) และกลุ่มที่อ้างอิงตามโครงสร้างทางเคมีของ necine base มีอยู่ 4 ประเภท ได้แก่ 1.retronecine 2.heliotridine 3.otonecine และ 4.platynecine กลุ่มนี้มีโครงสร้างสำคัญคือ มีพันธะคู่ระหว่างตำแหน่งที่ 1 และ 2 (1,2-double bond) จึงถือว่ามีความเป็นพิษมาก ส่วนระบบการจำแนก PAs ตามแหล่งพืชที่พบสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มชนิด Loline ซึ่งพบในพืช *Lolium cuneatum* และสกุล *Adenocarpus* ในวงศ์ Fabaceae และ กลุ่มเบ็ดเตล็ด (miscellaneous) ซึ่งส่วนใหญ่พบในพืชสกุล *Crotalaria* วงศ์ Fabaceae ทั้งนี้ สาร PAs ที่เป็นที่รู้จักและมีการรายงานอย่างแพร่หลายคือชนิด Senecionine และ Lycopsamine (Alvarado-Avila *et al*., 2022)

ความเป็นพิษของ PAs ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของ PAs แต่ละชนิด กระบวนการเผาผลาญ (metabolism) และความแปรผันของแต่ละบุคคล PAs ที่มีความเป็นพิษต้องมีลักษณะโครงสร้างเฉพาะ คือ ต้องมีพันธะคู่ระหว่างตำแหน่งที่ 1 และ 2 และมีการสร้างพันธะกับ หมู่ ester ที่ตำแหน่ง C-7 หรือ C-9 หรือทั้งสองตำแหน่งบน necine base สาร PAs ถือเป็นสารตั้งต้นของสารพิษ (pro-toxins) ที่ยังไม่แสดงพิษทันทีแต่จะถูกกระตุ้นผ่านกระบวนการเผาผลาญในตับโดยเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P-450 monooxygenase จะเปลี่ยน PAs ในรูปตติยภูมิ (tertiary alkaloids) ให้กลายเป็น pyrrolic metabolites ซึ่งเป็นสารที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาสูงและเป็นพิษต่อเซลล์ ในทางกลับกันแม้จะบริโภค PAs ในรูปแบบที่ยังไม่มีพิษสาร PAs เหล่านี้สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็น alkaloids ตติยภูมิ ซึ่งเป็นรูปแบบที่ก่อให้เกิดพิษได้ในทางเดินอาหาร จากนั้นจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและเข้าสู่กระบวนการกระตุ้นพิษที่ตับในที่สุด PAs ยังขัดขวางการส่งสัญญาณประสาทโดยส่งผลกระทบโดยตรงต่อ

ตัวรับสัญญาณ (neuroreceptors), ช่องไอออน (ion channels) และยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายสารสื่อประสาท รวมถึงตัวส่งสัญญาณสำรอง (secondary messengers) นอกจากนี้ PAs ยังมีความสามารถในการแทรกตัวเข้าสู่โครงสร้าง DNA (DNA intercalation) ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนหยุดชะงัก และกระตุ้นกลไกการตายของเซลล์ (apoptosis) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ทำให้การจัดการพลังงานในระดับเซลล์ผิดปกติ (Alvarado-Avila *et al.,* 2022)

PAs เป็นพิษต่อตับในสัตว์และมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและมีผลกระทบเรื้อรัง การได้รับ PAs ในระดับต่ำสะสมเป็นเวลานานสามารถทำให้เกิดโรคตับแข็งและมะเร็งได้ เนื่องจากการกระตุ้นการเผาผลาญทำให้เกิด pyrrolic forms ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อมะเร็ง The International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้ประเมิน PAs หลายชนิดอยู่ในกลุ่ม 2B (อาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์) เช่น lasiocarpine, monocrotaline และ riddelliine และอยู่ในกลุ่ม 3 (ไม่สามารถจัดประเภทได้ว่าก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้หรือไม่) เช่น hydroxysenkirkine, isatidine, jacobine, retrorsine, seneciphylline, senkirkine และ symphytine ด้วยเหตุนี้ European Food Safety Authority (EFSA) จึงได้พิจารณาประเด็นเรื่องสาร PAs ในอาหารโดยมีเป้าหมายเพื่อกำหนดระดับความเสี่ยงต่อสุขภาพของประชาชน (Roncada *et al.,* 2023) โดยมนุษย์สามารถรับ PAs เข้าไปผ่านทางการบริโภคผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อน เช่น ธัญพืชที่ปนเปื้อนพืชที่ผลิต PAs หรือผลผลิตทางการเกษตรที่มีวัชพืชที่ผลิต PAs ผลิตภัณฑ์สมุนไพร ชา น้ำผึ้ง ละอองเกสรและอาหารอื่นๆ เช่น นมหรือไข่ (Kowalczyk and Kwiatek, 2017) ยังสามารถพบ PAs ได้ในน้ำและดินอีกด้วย (Roncada *et al.,* 2023)

คณะกรรมาธิการยุโรป (EC) ได้ออกกฎระเบียบ (EU) 2020/2040 เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2020 เพื่อแก้ไขเพิ่มเติมกฎระเบียบเดิม (EC) No 1881/2006 โดยมีการกำหนดระดับสูงสุด (Maximum Levels: MLs) ของสาร PAs ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ชา คาโมไมล์ และสมุนไพรสำหรับชงดื่ม กลุ่มผลิตภัณฑ์จากผึ้ง เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนผสมของเกสรดอกไม้ สารสกัดจากเกสร และผลิตภัณฑ์จากเกสรดอกไม้ และกลุ่มเครื่องเทศและสมุนไพรทั้งแบบสด แช่แข็งและแบบแห้ง เช่น เลิฟเวจ (lovage) ออริกาโน (oregano) โบราจ (borage), มาจอแรม (marjoram) และเมล็ดยี่หร่า (Commission Regulation (EU) 2020/2040) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดเกณฑ์ระดับสูงสุดของ PAs ในน้ำผึ้ง เกสรผึ้ง และผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม บางประเทศในยุโรปได้เริ่มกำหนดระดับที่ยอมรับได้สำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรและสารสกัด ซึ่งถูกนำมาปรับใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงในการค้าขายน้ำผึ้ง ประเทศเยอรมนีได้กำหนดขีดจำกัดปริมาณ PAs ในยาสมุนไพรไว้ที่ไม่เกิน 1 µg ต่อวัน สำหรับการใช้ยาติดต่อกันไม่เกิน 6 สัปดาห์ และลดลงเหลือไม่เกิน 0.1 µg ต่อวัน หากมีการใช้งานเกินระยะเวลาดังกล่าว ในปี 2017 Bundesinstitut fur Risikobewertung (BfR) ประเทศเยอรมนีและ Committee on Toxicity (COT) สหราชอาณาจักรได้แนะนำค่าปริมาณการบริโภคสาร PAs ที่ไม่ควรเกิน 0.007 µg/kg น้ำหนักตัวต่อวัน (เทียบเท่ากับ 0.49 µg ต่อวัน สำหรับผู้ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 70 kg) เพื่อลดความเสี่ยงจากการสะสมสารพิษ ต่อมาคณะกรรมการ CONTAM (EFSA) ได้มีการกำหนดค่าไว้ที่ 237 µg/kg น้ำหนักตัวต่อวัน เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งจากการได้รับสาร PAs (Sixto *et al.,* 2022)



ภาพที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างของสารกลุ่ม PAs

จากความเป็นพิษของสาร PAs ต่อมนุษย์และสัตว์ดังกล่าว สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์จึงได้ดำเนินการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร PAs ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยการศึกษาในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง มีความความน่าเชื่อถือ มีความแม่นยำ มีความจำเพาะ มีความไวสูงในการตรวจวัดหาชนิดและปริมาณ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐาน รองรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างของสารดังกล่าวในตัวอย่างน้ำผึ้ง เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์หลัก

เครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSQ quantis, เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 g สำหรับชั่งตัวอย่าง, เครื่องผสมสาร (vortex mixer), เครื่อง ultrasonic bath, เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่อง automatic nitrogen concentrator, ชุด SPE vacuum manifold, micropipette ขนาด 5-20, 10-100, 100-1,000 และ 500-5,000 µL, Column HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 ขนาด 2.1×150 mm 3 µm (C18)

2. สารเคมี สารมาตรฐาน และอื่นๆ

สารเคมี AR grade ได้แก่ sulfuric acid, methanol, ethyl acetate, ammonium hydroxide, triethylamine ammonium formate และ formic acid HPLC grade ได้แก่ acetonitrile

สารมาตรฐาน (standards) PAs จำนวน 21 ชนิด ประกอบด้วย Echimidine, Echimidine-N-oxide Europine, Europine-N-oxide, Heliotrine, Heliotrine-N-oxide, Intermedine, Intermedine-N-oxide, Lasiocarpine, Lasiocarpine-N-oxide Lycopsamine, Lycopsamine-N-oxide, Retrorsine, Retrorsine-N-oxide, Senecionine, Senecionine-N-oxide, Seneciphylline Seneciphylline-N-oxide, Senecivemine, Senecivemine-N-oxide และ Senkirkine ยี่ห้อ LGC product no. VGHHCL04-100 ความเข้มข้นชนิดละ 1,000±5 µg/mL ละลายในน้ำ

อื่นๆ ได้แก่ SPE MCX 6 mL 150 mg น้ำขจัดไอออน (deionized, DI)

วิธีการทดลอง

1. สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์

1.1 สภาวะของเครื่อง MS/MS

เครื่อง Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) ชนิด Triple Quadrupole Analyzers ใช้เทคนิค electrospray ionization positive mode (ESI^+) โหมดการตรวจวิเคราะห์เป็น Selected Reaction Monitoring (SRM) โดยมีสภาวะ ดังนี้ spray voltage 3,500 volts, sheath gas 45 Arb, auxiliary gas 10 Arb, Ion transfer tube temperature 400 ^{0}C และ vaporizer temperature 250 ^{0}C โดยมีค่าพารามิเตอร์ mass spectrometer ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 SRM parameter ของการวิเคราะห์สาร PAs จำนวน 21 ชนิด

No.	Compound name	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	CE (V)	RF lens (V)	Qualifier (m/z)	CE (V)	RF lens (V)
1	Intermedine	300>94	25	25	300>138	20	25
2	Europine	330>138	20	14	330>156	30	14
3	Lycopsamine	300>94	25	25	300>156	27	25
4	Europine-N-oxide	346>172	30	20	346>111	46	20
5	Lycopsamine-N-oxide	316>172	26	25	316>138	20	25

ตารางที่ 1 (ต่อ) MRM parameter ของการวิเคราะห์สาร PAs จำนวน 21 ชนิด

No.	Compound name	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	CE (V)	RF lens (V)	Qualifier (m/z)	CE (V)	RF lens (V)
6	Intermedine-N-oxide	316>172	26	25	316>94	40	25
7	Heliotrine	314>138	20	20	314>156	26	20
8	Retrorsine-N-oxide	368>94	47	28	368>120	34	28
9	Heliotrine-N-oxide	330>172	26	20	330>111	42	20
10	Seneciphylline	334>120	26	23	334>94	34	23
11	Seneciphylline-N-oxide	350>94	42	20	350>120	32	20
12	Senecionine	336>120	28	28	336>94	32	28
13	Senecivenine	336>120	28	28	336>81	40	28
14	Senecionine-N-oxide	352>94	45	25	352>118	30	25
15	Senecivenine-N-oxide	352>94	45	25	352>120	38	25
16	Retrorsine	352>120	26	23	352>138	29	23
17	Echimidine	398>120	25	20	398>83	28	20
18	Senkirkine	366>168	28	22	366>122	32	22
19	Echimidine-N-oxide	414>254	30	30	414>83	46	30
20	Lasiocarpine	412>120	30	20	412>336	17	20
21	Lasiocarpine-N-oxide	428>254	27	30	428>136	29	30

1.2 สภาวะของเครื่อง LC

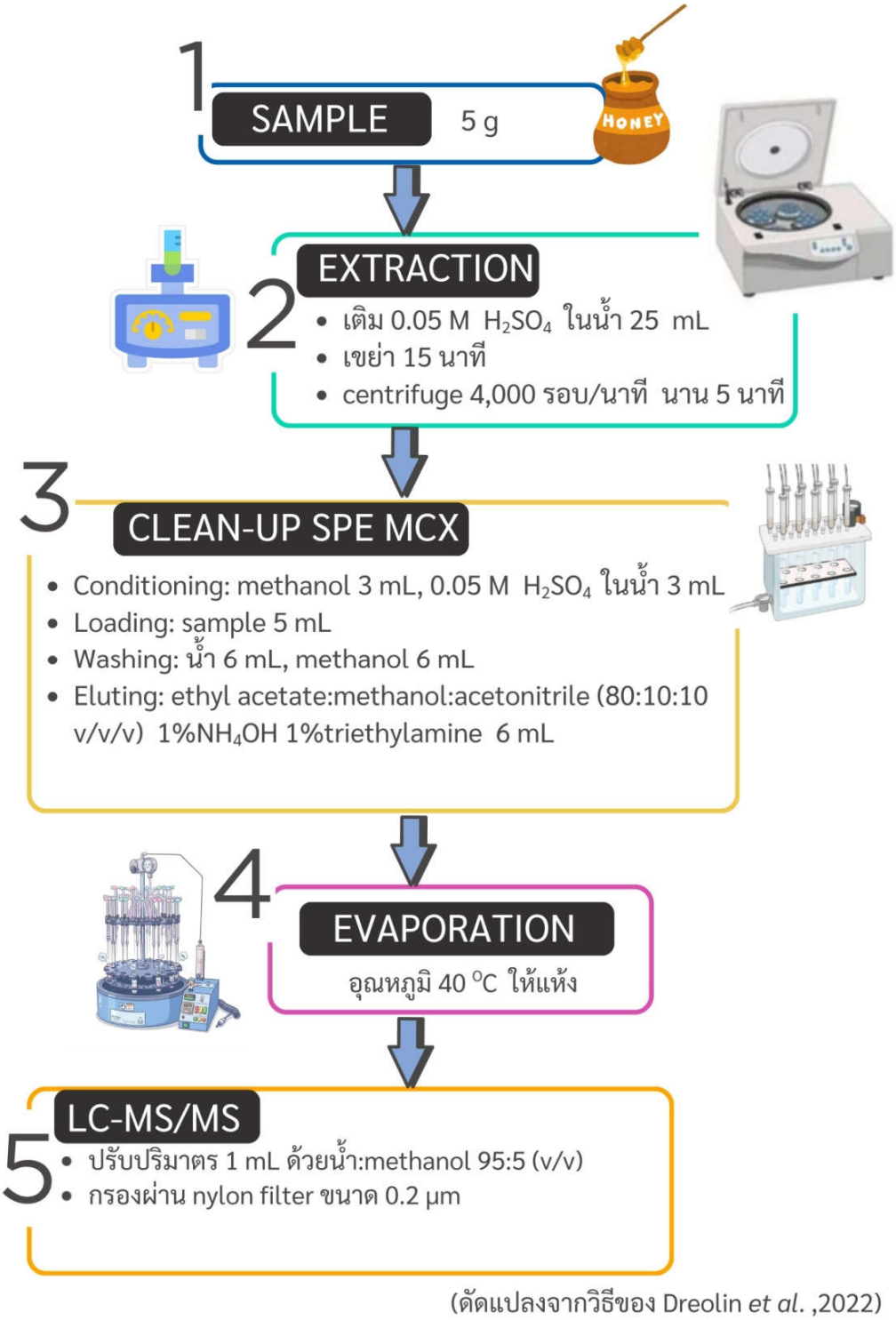
ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่ม PAs โดยใช้ Column HPLC inertsil ODS-3 ขนาด 2.1×150 mm, 3 µm ใช้ mobile phase เป็น 5 mM ammonium formate 0.1%formic ในน้ำ (A) และ 0.1% formic ใน acetonitrile (B) รายละเอียดสภาวะการทดสอบตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 HPLC condition สำหรับวิเคราะห์สารกลุ่ม PAs

Parameters	**Conditions**
HPLC column	Inertsil ODS-3 2.1×150 mm, 3 µm
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	10 µL
Column oven	35 °C
Elution mode	gradient elution
	Initial 0-0.5 min 5% B, 0.5-14 min 5% ⟶ 30% B 14-15
	min 30% ⟶ 95% B, 15-17 min 95% B
	17-17.5 min 95% ⟶ 5% B, 17.5-20 min 5% B
Run time	20 min

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การศึกษาขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง (extraction) และการการทำให้บริสุทธิ์ (clean-up) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dreolin et al. (2022) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน PAs ความเข้มข้น 50 µg/kg วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) เกณฑ์การยอมรับ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120 % (EURL-MP, 2026)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม PAs

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

3.1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve) และผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) เตรียมสารมาตรฐาน PAs จำนวน 21 ชนิดแบบ standard in solvent calibration (SSC) ในตัวทำละลายน้ำ:methanol (5:95 v/v) กับ matrix matched standard calibration (MMC) ในสารสกัดตัวอย่างน้ำผึ้งตามวิธีวิเคราะห์ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 30, 50, 70 และ 100 ng/mL วิเคราะห์ความเข้มข้นอย่างละ 3 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาสร้าง calibration curve ระหว่าง concentration (แกน x) กับ peak area (แกน y) มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination; r^2) เกณฑ์การยอมรับค่า $r^2 \geq 0.990$ (U.S. Food and Drug Administration [FDA], 2021) จากนั้น นำค่า slope ของ SSC และ MMC มาคำนวณค่า %ME (Ma *et al.,* 2025) เกณฑ์การยอมรับ %ME อยู่ในช่วง 80–120%

$$\%ME = \frac{Slope_{matrix}}{Slope_{solvent}} \times 100\% \qquad \text{สมการที่ 1}$$

3.2 ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ทดสอบ method blank, sample blank และ spiked sample ในน้ำผึ้ง ที่เติมสารมาตรฐาน PAs จำนวน 21 ชนิด ความเข้มข้น 50 µg/kg วิเคราะห์ 3 ซ้ำ พิจารณา method blank และ sample blank ต้องไม่พบสัญญาณพีคที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ตรงกับสารที่สนใจ ส่วน spiked sample ต้องมีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับสารที่สนใจ ค่า RT แตกต่างจากสารมาตรฐานไม่เกิน ±0.1 นาที และ ion ratio ต้องไม่เกิน 30% (EURL-MP, 2026)

3.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) กำหนดให้ค่า LOD และ LOQ สาร PAs จำนวน 21 ชนิดมีค่าเท่ากับ 5 µg/kg และ 10 µg/kg ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ โดยค่า LOD ต้องมีค่า signal/noise ≥3 (International Council for Harmonisation [ICH], 2023) ค่า LOQ ต้องวิเคราะห์ได้ %recovery อยู่ในช่วง 70–120% และ $\%RSD_r$ ≤20% (EURL-MP, 2026)

3.4 ความแม่นและความเที่ยง (accuracy and precision) ทดสอบความแม่นและความเที่ยงในสภาวะการทวนซ้ำ (repeatability) โดยทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน PAs จำนวน 21 ชนิด 3 ระดับความเข้มข้น 10(LOQ), 50 และ 100 µg/kg วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ คำนวณ %recovery และ $\%RSD_r$ ทดสอบความแม่นในสภาวะการทำซ้ำ (within laboratory reproducibility) โดยวิเคราะห์วิเคราะห์ตัวอย่างอีก 1 ชุด ในระดับความเข้มข้นเดียวกันโดยนักวิเคราะห์ต่างคนและต่างวันกัน วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ คำนวณ $\%RSD_{wR}$ เกณฑ์การยอมรับ %recovery อยู่ในช่วง 70–120%, $\%RSD_r$ และ $\%RSD_{wR}$ ≤20% (EURL-MP, 2026)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีการสกัดและการ clean-up ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน PAs จำนวน 21 ชนิด แต่ละชนิดความเข้มข้น 50 µg/kg วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์ได้ค่า %MR อยู่ในช่วง 71.63%(Echimidine)–99.72%(Intermedine-N-oxide) และได้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.30%(Lasiocarpine)–14.63% (Retrorsine-N-oxide) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกชนิดสาร ตามตารางที่ 3 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้เป็นวิเคราะห์สาร PAs จำนวน 21 ชนิด ในตัวอย่างน้ำผึ้งได้

ตารางที่ 3 %MR, %RSD ของ spiked sample สาร PAs ความเข้มข้น 50 µg/kg

Compounds	Conc.	%MR	$\%RSD_r$
Intermedine	45.58	91.17	6.50
Europine	38.13	76.26	6.96
Lycopsamine	45.65	91.30	5.64
Europine-N-oxide	38.25	76.50	8.93
Lycopsamine-N-oxide	49.79	99.58	3.53
Intermedine-N-oxide	49.86	99.72	2.08
Heliotrine	38.22	76.44	4.24
Retrorsine-N-oxide	39.04	78.09	14.63
Heliotrine-N-oxide	40.11	80.23	5.31
Seneciphylline	44.00	88.00	6.03
Seneciphylline-N-oxide	42.28	84.55	3.23
Senecionine	42.95	85.90	7.83
Senecivernine	42.45	84.90	6.89
Senecionine-N-oxide	40.19	80.37	3.49
Senecivernine-N-oxide	40.86	81.72	6.65
Retrorsine	40.12	80.24	5.85
Echimidine	35.82	71.63	2.88
Senkirkine	40.33	80.67	3.32
Echimidine-N-oxide	35.84	71.68	5.60
Lasiocarpine	35.93	71.87	1.30
Lasiocarpine-N-oxide	36.11	72.23	3.54

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1. ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและผลกระทบจากเมทริกซ์

กราฟมาตรฐานของ SSC และ MMC มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5–100 ng/mL มีค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.9962–0.9994 และ 0.9967–0.9999 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกชนิดสาร ตามตารางที่ 4 เมื่อนำค่า slope ของ SSC และ MMC มาคำนวณเพื่อตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ พบว่าสาร PAs ทั้ง 21 ชนิด มี %ME อยู่ในช่วง 87.54%–112.62% ตามตารางที่ 4 โดยสาร PAs ส่วนใหญ่มีค่า %ME ที่ต่ำกว่า 100% มีจำนวน 15 สาร โดยสารที่มี %ME ต่ำที่สุดที่คือ Lycopsamine(87.54%) และมีสาร PAs จำนวน 6 ชนิด มีค่า %ME สูงกว่า 100% โดยสารที่มี %ME สูงที่สุด คือ Echimidine(112.62%) โดยค่า %ME ที่ต่ำกว่า 100% บ่งชี้ถึงการกดสัญญาณโดยเมทริกซ์ (matrix suppression) ค่าที่สูงกว่า 100% บ่งชี้ถึงการเสริมสัญญาณโดยเมทริกซ์ (matrix enhancement) และค่าที่ใกล้เคียง 100% แสดงว่าผลของเมทริกซ์มีน้อยจนไม่มีนัยสำคัญ (Ma *et al.,* 2025)

ในระหว่างขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ควรมีการตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ในเทคนิค LC-MS/MS เพื่อประเมินระดับความรุนแรงของผลกระทบดังกล่าว ในกรณีที่พบผลกระทบจากเมทริกซ์ในระดับที่สูง มีการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของสัญญาณมากกว่า 50% แนะนำให้พยายามลดผลกระทบดังกล่าว เช่น โดยการเจือจางตัวอย่างหรือการใช้ขั้นตอนการ clean up ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ไม่มีการกำหนดเกณฑ์เฉพาะสำหรับผลกระทบจากเมทริกซ์ เนื่องจากผลกระทบจากเมทริกซ์ถือว่ารวมอยู่ภายใต้เกณฑ์การยอมรับด้าน recovery แล้ว (EURL-MP, 2026)

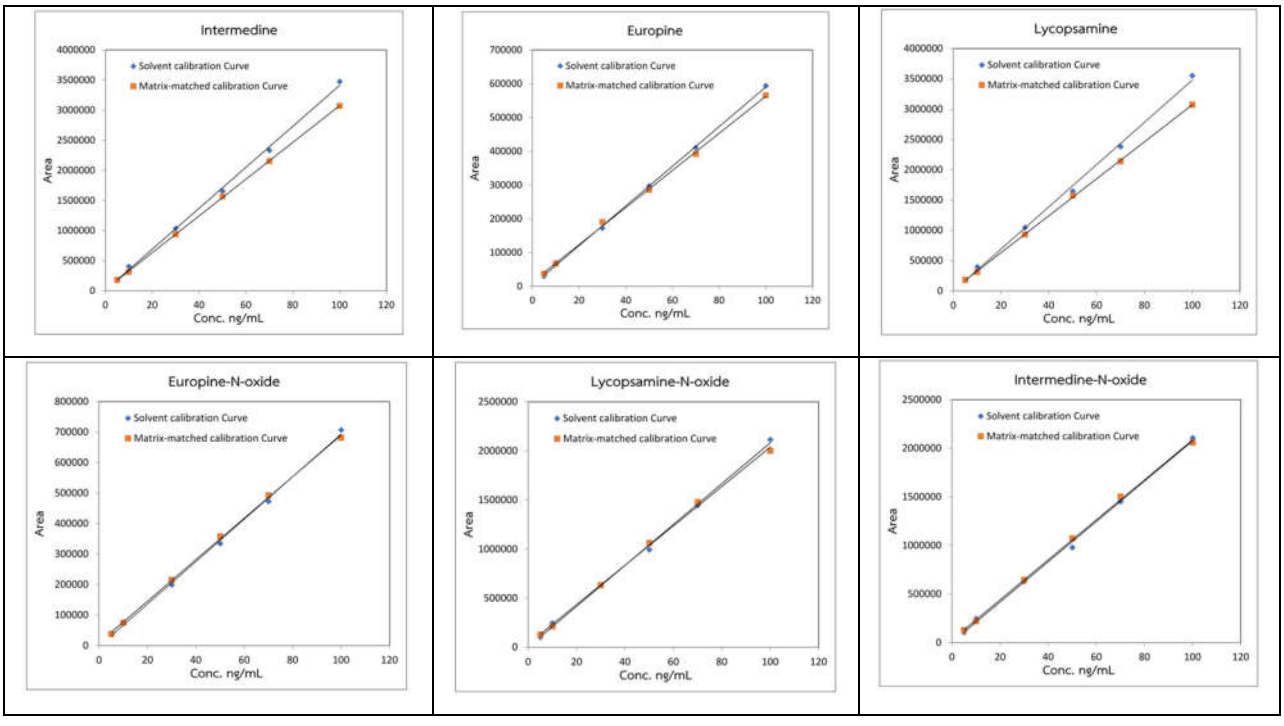
ในการตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ เนื่องจากสาร PAs จำนวน 21 ชนิด เมทริกซ์ส่งผลกระทบต่ำถึงปานกลาง ตามเกณฑ์มาตรฐานการทดสอบวิธีวิเคราะห์ ค่า %ME ที่ยอมรับได้ทั่วไปจะอยู่ในช่วง 80–120% สาร PAs ทั้ง 21 ชนิด มีค่า %ME อยู่ในช่วง 87.54–112.62% หรือเบี่ยงเบนจาก 100% ไม่เกิน ±20% ประกอบกับ recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ 70-120% ในหัวข้อการพัฒนาวิธีการสกัดและการ clean-up ตัวอย่าง ตามตารางที่ 3 จึงใช้วิธี SSC ในการวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร PAs ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ตารางที่ 4 ค่า r^2 ของ SSC , MMC และ %ME ของสารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด

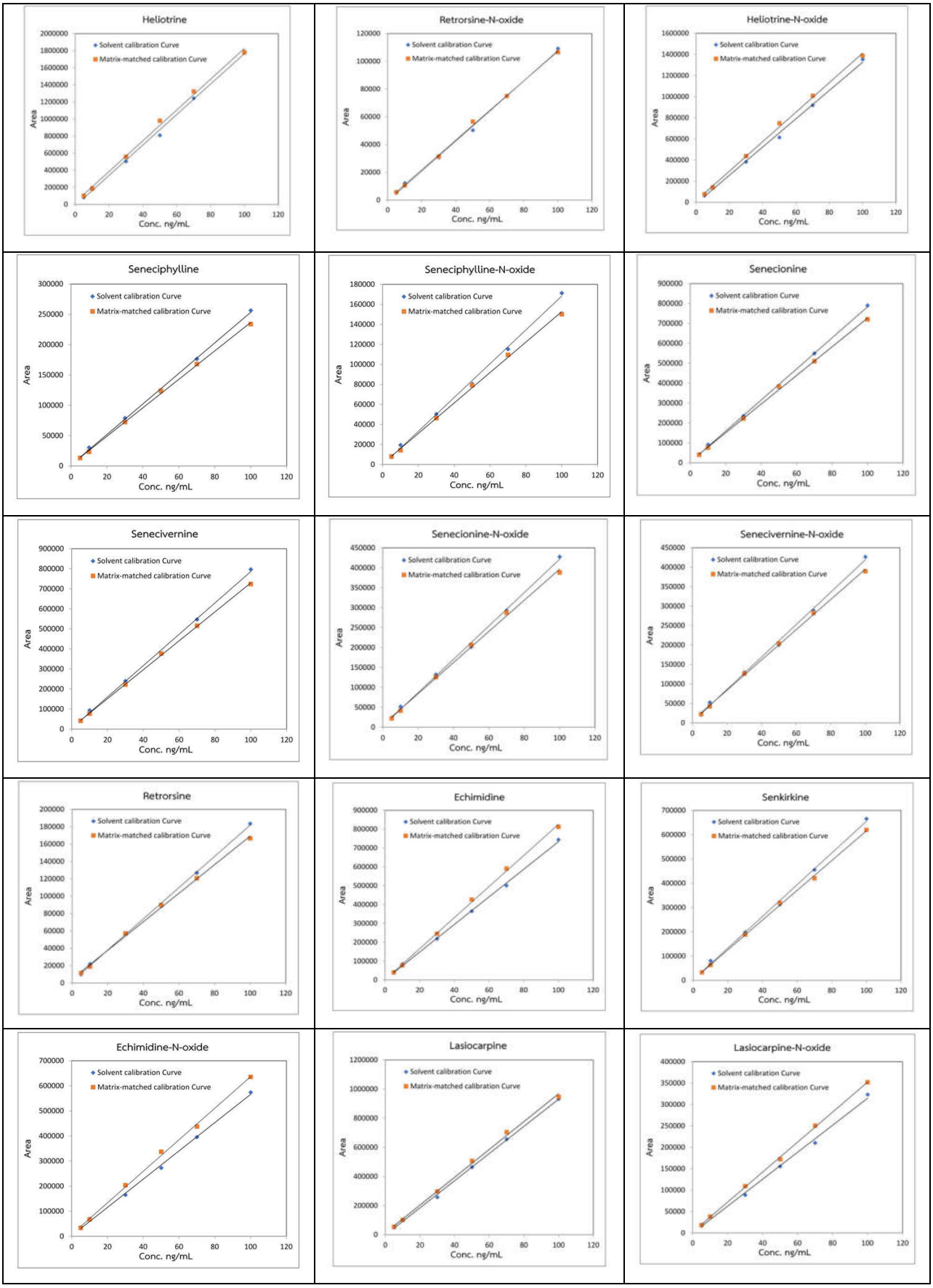
Compounds	SSC (r^2)	MMC (r^2)	%ME
Intermedine	0.9983	0.9999	89.67
Europine	0.9994	0.9990	93.50
Lycopsamine	0.9976	0.9998	87.54
Europine-N-oxide	0.9982	0.9993	97.86
Lycopsamine-N-oxide	0.9983	0.9984	96.41
Intermedine-N-oxide	0.9979	0.9992	99.29
Heliotrine	0.9970	0.9967	101.03
Retrorsine-N-oxide	0.9976	0.9987	98.71

ตารางที่ 4 (ต่อ) ค่า r^2 ของ SSC , MMC และ %ME ของสารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด

Compounds	SSC (r^2)	MMC (r^2)	%ME
Heliotrine-N-oxide	0.9973	0.9982	104.35
Seneciphylline	0.9987	0.9990	93.17
Seneciphylline-N-oxide	0.9981	0.9986	90.07
Senecionine	0.9992	0.9991	92.03
Senecivenine	0.9985	0.9996	92.26
Senecionine-N-oxide	0.9981	0.9981	93.27
Senecivenine-N-oxide	0.9977	0.9992	93.31
Retrorsine	0.9990	0.9982	91.33
Echimidine	0.9989	0.9988	112.62
Senkirkine	0.9981	0.9990	93.87
Echimidine-N-oxide	0.9983	0.9984	111.55
Lasiocarpine	0.9990	0.9978	102.39
Lasiocarpine-N-oxide	0.9962	0.9995	111.23



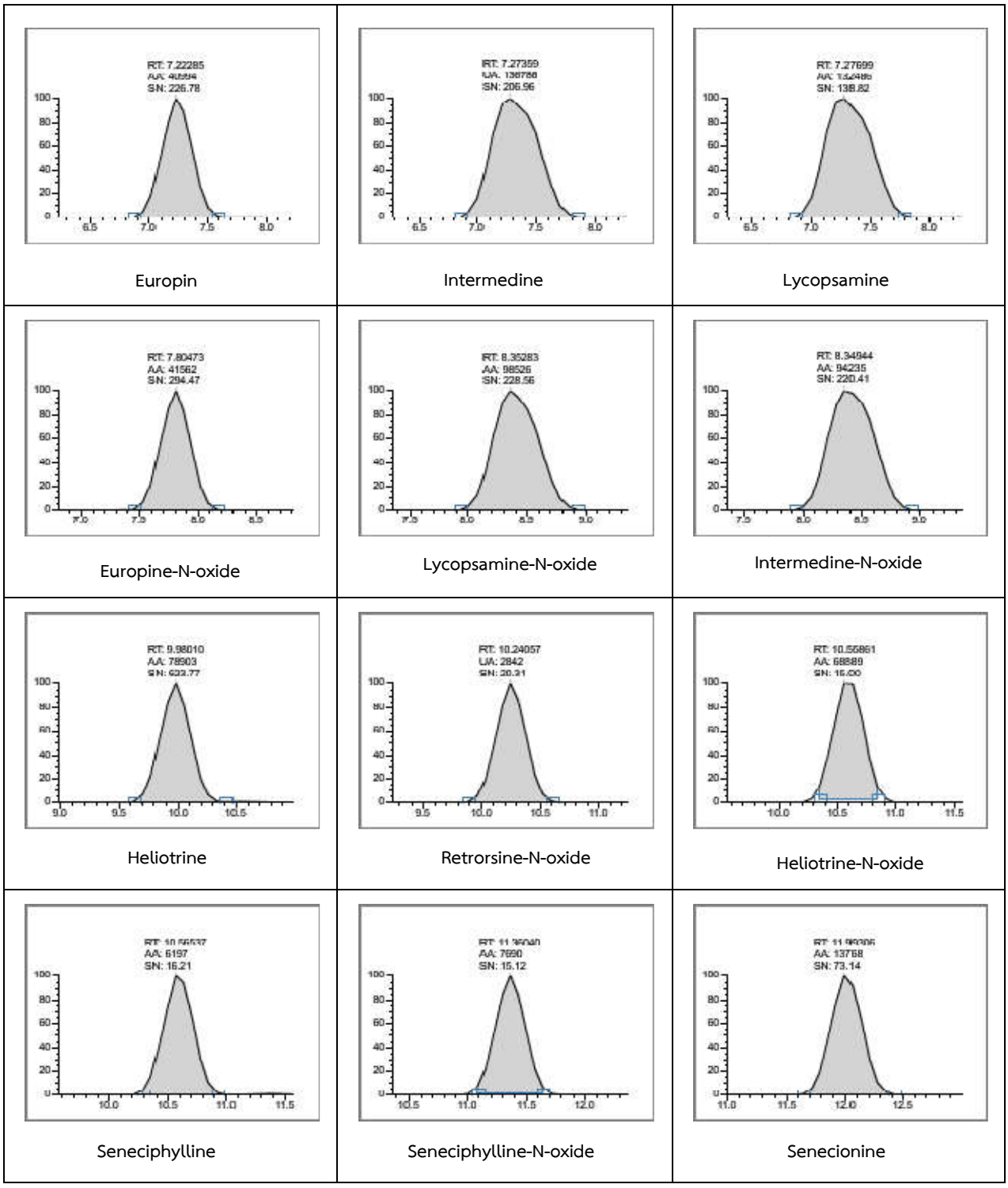
ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของ SSC และ MMC สารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด



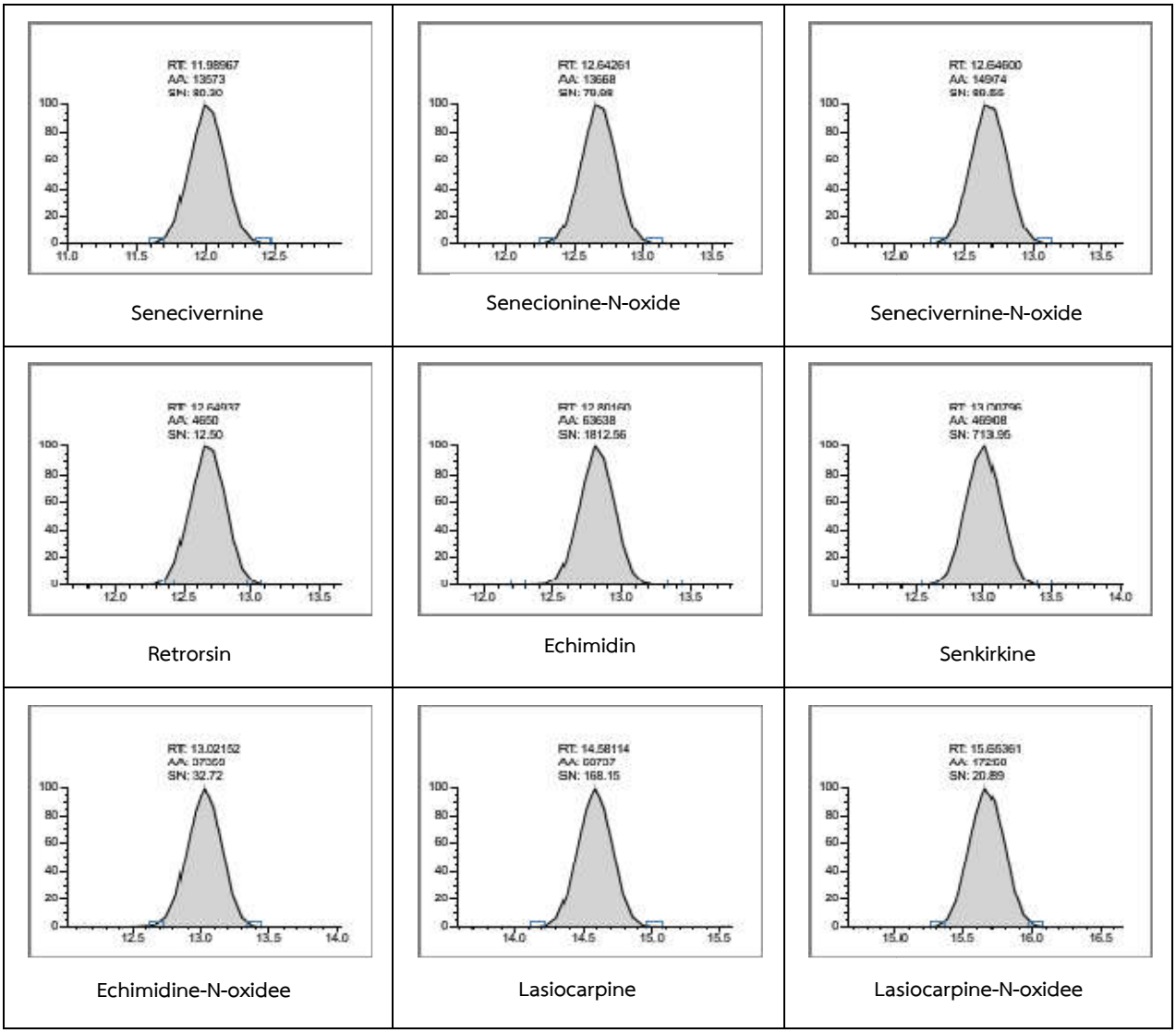
ภาพที่ 3 (ต่อ) กราฟมาตรฐานของ SSC และ MMC สารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด

2. ความจำเพาะ

ตัวอย่าง method blank และ sample blank ไม่พบพีคของสารที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับสารมาตรฐานทุกชนิดสาร แสดงว่าสารเคมีที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง method blank และ sample blank ที่ผ่านการวิเคราะห์ตามวิธีทดสอบแล้วไม่ปนเปื้อนสาร PAs ส่วนในตัวอย่าง spiked sample ที่เติมสาร PAs จำนวน 21 ชนิด ความเข้มข้น 50 µg/kg มีค่า RT และค่า m/z ตรงกับสารมาตรฐานทุกชนิดสาร ตามภาพที่ 6 โดยมีค่า RT ไม่เกิน ±0.1 นาที และ ion ratio ไม่เกิน 30% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้ปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ แสดงตามภาพที่ 4



ภาพที่ 4 พีค (TIC) ของ spiked sample สารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด



ภาพที่ 4 (ต่อ) พีค (TIC) ของ spiked sample สารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด

3. ค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบ spiked sample สาร PAs จำนวน 21 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5 µg/kg ให้สัญญาณ S/N อยู่ในช่วง 40.37(Echimidine-N-oxide)–1109.09(Heliotrine) และที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 µg/kg พบว่าความแม่นที่ประเมินจากค่า %MR อยู่ในช่วง 95.31%(Lycopsamine)-116.75%(Retrorsine-N-oxide) และความเที่ยงที่ประเมินจากค่า $\%RSD_r$ อยู่ในช่วง 2.15%(Europine)-11.31%(Lasiocarpine) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทุกชนิดสาร ตามตารางที่ 5 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์สาร PAs ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS/MS นี้จะมีมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 5 และ 10 µg/kg ตามลำดับ

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์เพื่อยืนยันค่า LOD และ LOQ สารกลุ่ม PAs จำนวน 21 ชนิด

Compounds	LOD 5 µg/kg (n=10)	LOQ 10 µg/kg (n=10)		
	S/N	Conc.	%MR	$\%RSD_r$
Europine	629.21	9.88	98.78	2.15
Intermedine	234.60	10.20	102.01	9.32
Lycopsamine	681.81	9.53	95.31	2.43
Europine-N-oxide	568.30	10.79	107.94	7.21
Lycopsamine-N-oxide	278.55	11.19	111.87	4.79
Intermedine-N-oxide	292.59	11.21	112.09	4.16
Heliotrine	1109.09	9.91	99.06	5.75
Retrorsine-N-oxide	60.45	11.68	116.75	5.62
Heliotrine-N-oxide	1145.05	10.29	102.93	5.51
Seneciphylline	63.39	9.78	97.82	3.99
Seneciphylline-N-oxide	48.01	10.46	104.64	10.41
Senecionine	234.27	10.03	100.35	3.82
Senecivenine	213.90	9.65	96.51	3.69
Senecionine-N-oxide	116.41	10.50	104.95	6.28
Senecivenine-N-oxide	132.56	10.81	108.13	8.23
Retrorsine	47.15	10.71	107.07	7.90
Echimidine	246.78	9.86	98.59	6.39
Senkirkine	319.54	9.60	96.02	5.30
Echimidine-N-oxide	40.37	10.48	104.85	7.10
Lasiocarpine	555.47	10.56	105.62	11.31
Lasiocarpine-N-oxide	43.03	10.42	104.16	10.18

4. ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยง

ผลการทดสอบความแม่น พบว่า %MR ของสาร PAs จำนวน 21 ชนิด อยู่ในช่วง 70.06%(Senecivenine-N-oxide) –112.96%(Retrorsine-N-oxide) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกชนิดสาร ผลการทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ พบว่าค่า $\%RSD_r$ ของสาร PAs จำนวน 21 ชนิด อยู่ในช่วง 2.39%(Seneciphylline-N-oxide)–19.25%(Echimidine-N-oxide) และผลการทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ พบว่า $\%RSD_{WR}$ ของสาร PAs จำนวน 21 ชนิด อยู่ในช่วง 3.95%(Senecivenine-N-oxide)–19.62%(Lasiocarpine-N-oxide) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกชนิดสาร ตามตารางที่ 6 จะสังเกตได้ว่าสารในกลุ่ม Free base เช่น Europine, Intermedine, Heliotrine ค่า %recovery อยู่ในช่วง 89–109% และสารกลุ่ม N-oxide เช่น Europine-N-oxide, Seneciphylline-N-oxide ค่า %recovery จะลดลงมาอยู่ที่ประมาณ 70–87% ที่ความเข้มข้น ที่สูงขึ้น แต่ยังคงผ่านเกณฑ์มาตรฐานยอมรับ เป็นแนวโน้มปกติของสารมีขั้วสูง ซึ่งอาจจะต้องมีการปรับขั้นตอนการ eluting โดยใช้ปริมาณ ethyl acetate:methanol:acetonitrile (80:10:10) 1%NH_4OH 1%triethylamine ที่เพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดึงสารในกลุ่ม N-oxide ให้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision สาร PAs จำนวน 21 ชนิด

Compound	Spiked level (µg/kg)	Accuracy (n=6) (%MR)	Precision			
			Repeatability (n=6)		Within laboratory reproducibility (n=12)	
			Conc.(Mean)	$\%RSD_r$	Conc.(Mean)	$\%RSD_{wR}$
Europine	10 (LOQ)	99.41	9.94	2.43	9.62	4.97
	50	98.97	49.48	3.07	51.33	4.74
	100	101.96	101.96	4.76	105.36	4.70
Intermedine	10 (LOQ)	102.24	10.22	10.76	9.85	11.87
	50	101.94	50.97	6.53	52.24	6.01
	100	96.55	96.55	11.10	102.26	9.80
Lycopsamine	10 (LOQ)	95.81	9.58	2.77	9.41	4.41
	50	102.99	51.50	5.14	53.44	5.64
	100	99.67	99.67	4.71	105.08	6.64
Europine-N-oxide	10 (LOQ)	111.21	11.12	4.98	10.03	12.89
	50	87.12	43.56	14.27	45.65	12.73
	100	76.67	76.67	8.27	80.73	7.67
Lycopsamine-N-oxide	10 (LOQ)	111.62	11.16	4.90	10.35	9.66
	50	84.11	42.06	9.76	41.29	8.39
	100	79.05	79.05	6.44	77.83	5.37
Intermedine-N-oxide	10 (LOQ)	111.75	11.17	4.34	10.30	9.99
	50	80.85	40.43	9.35	40.44	7.37
	100	76.17	76.17	6.85	75.93	5.34
Heliotrine	10 (LOQ)	98.69	9.87	7.32	9.51	9.93
	50	100.88	50.44	6.23	53.51	8.81
	100	100.18	100.18	8.82	103.40	7.42
Retrorsine-N-oxide	10 (LOQ)	112.96	11.30	4.98	10.26	13.82
	50	79.43	39.72	9.02	37.17	10.62
	100	80.47	80.47	5.27	75.99	8.02

ตารางที่ 6 (ต่อ) ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision สาร PAs จำนวน 21 ชนิด

Compound	Spiked level (µg/kg)	Accuracy (n=6) (%MR)	Precision			
			Repeatability (n=6)		Within laboratory reproducibility (n=12)	
			Conc.(Mean)	%RSD$_r$	Conc.(Mean)	%RSD$_{wR}$
Heliotrine-N-oxide	10 (LOQ)	102.98	10.30	5.79	9.72	10.77
	50	87.57	43.79	10.81	46.07	9.35
	100	79.84	79.84	7.90	83.30	8.42
Seneciphylline	10 (LOQ)	96.17	9.62	3.57	9.29	7.43
	50	107.10	53.55	2.79	55.58	5.29
	100	101.90	101.90	8.82	104.03	7.06
Seneciphylline-N-oxide	10 (LOQ)	104.82	10.48	11.95	9.92	12.62
	50	70.37	35.18	2.39	35.17	6.38
	100	70.29	70.29	8.78	70.40	7.37
Senecionine	10 (LOQ)	100.37	10.04	4.20	8.90	13.98
	50	108.25	54.12	5.04	52.22	5.70
	100	102.82	102.82	8.20	97.11	8.81
Senecivenine	10 (LOQ)	95.56	9.56	4.68	8.59	12.43
	50	108.46	54.23	7.22	52.24	6.82
	100	101.44	101.44	9.13	96.60	8.82
Senecionine-N-oxide	10 (LOQ)	106.44	10.64	6.58	10.29	8.25
	50	75.31	37.66	12.23	36.64	9.90
	100	70.34	70.34	7.13	70.59	5.64
Senecivenine-N-oxide	10 (LOQ)	106.94	10.69	8.75	10.16	10.65
	50	71.65	35.82	11.56	35.56	8.77
	100	70.06	70.06	3.68	71.02	3.95
Retrorsine	10 (LOQ)	105.71	10.57	9.15	10.72	7.63
	50	72.73	36.36	5.98	36.74	6.48
	100	70.61	70.61	8.13	70.60	6.04

ตารางที่ 6 (ต่อ) ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision สาร PAs จำนวน 21 ชนิด

Compound	Spiked level (µg/kg)	Accuracy (n=6) (%MR)	Precision			
			Repeatability (n=6)		Within laboratory reproducibility (n=12)	
			Conc.(Mean)	%RSD$_r$	Conc.(Mean)	%RSD$_{wR}$
Echimidine	10 (LOQ)	96.87	9.69	7.19	9.13	9.11
	50	109.99	55.00	7.48	55.12	6.68
	100	89.08	89.08	14.10	90.45	9.75
Senkirkine	10 (LOQ)	96.19	9.62	5.53	8.72	12.65
	50	93.19	46.60	9.89	49.52	9.84
	100	94.39	94.39	7.08	91.93	6.88
Echimidine-N-oxide	10 (LOQ)	100.60	10.06	4.47	9.88	14.08
	50	73.80	36.90	19.25	42.86	19.25
	100	73.45	73.45	10.12	70.84	10.47
Lasiocarpine	10 (LOQ)	106.31	10.63	11.18	9.33	17.22
	50	101.73	50.87	15.38	53.89	12.62
	100	96.09	96.09	7.56	93.59	6.40
Lasiocarpine-N-oxide	10 (LOQ)	107.63	10.76	8.45	9.79	17.99
	50	82.87	41.43	17.63	48.90	19.62
	100	79.18	79.18	15.75	74.30	14.44

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสาร PAs จำนวน 21 ชนิดในน้ำผึ้งโดย เทคนิค LC-MS/MS โดยมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 5 และ 10 µg/kg ตามลำดับ ช่วงของการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 10–100 µg/kg เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และความจำเพาะ เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมคุณภาพปริมาณการตกค้างของ สาร PAs ในน้ำผึ้ง เพื่อสร้างความมั่นใจในความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคได้

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

วิธีวิเคราะห์ที่ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ เป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของห้องปฏิบัติการแห่งเดียว แม้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นจะมีประสิทธิภาพดี อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับ แต่ยังมีข้อสำคัญบางประการที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมคือ ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น สารในกลุ่ม N-oxide จะให้ค่า %recovery ที่ลดลง ซึ่งอาจจะต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนในการ eluting สารที่วิเคราะห์ โดยใช้ปริมาณ ethyl acetate:methanol:acetonitrile (80:10:10) 1%NH_4OH 1%triethylamine เพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดึงสารในกลุ่ม N-oxide ให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ควรมีการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) หรือมีการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparision) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์จิรภัทร อินทร์สุขผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นายสราวุธ ชูกระชั้น หัวหน้างานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน ที่ให้คำปรึกษา แนะนำการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Alvarado-Avila, L. Y., Moguel-Ordóñez, Y. B., García-Figueroa, C., Ramírez-Ramírez, F. J., and Arechavaleta-Velasco, M. E. (2022). Presence of pyrrolizidine alkaloids in honey and the effects of their consumption on humans and honeybees. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(3), 787–802.

Dreolin, N., Foddy, H., Adams, S., Hird, S., & Hancock, P. (2020). *Method development and validation for the determination of pyrrolizidine alkaloids in a range of plant-based foods and honey using* LC-MS/MS (Waters Application Note 720007056EN). Waters Corporation.

European Commission. (2020). Commission Regulation (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 420/1.

European Union Reference Laboratory for Mycotoxins and Plant Toxins. (2026). *Guidance document on performance criteria for methods of analysis for mycotoxins and plant toxins in food and feed* (EURL-MP-guidance doc_003, Version 1.4). European Commission.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2023). *ICH Guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures*.

Kowalczyk, E., and Kwiatek, K. (2017). Pyrrolizidine alkaloids in honey: determination with liquid chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Veterinary Research*, 61(4), 461–467.

Ma, X., Zhang, Y., Wang, L., Liu, C., & Li, H. (2025). Detection of dinotefuran residues in fruits and vegetables using GC-MS/MS and its environmental behavior and dietary risks. *Toxics*, 13(2), 115.

Roncada, P., Isani, G., Peloso, M., Dalmonte, T., Bonan, S., & Caprai, E. (2023). Pyrrolizidine Alkaloids from Monofloral and Multifloral Italian Honey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(7), 5410.

Sixto, A., Niell, S., & Heinzen, H. (2022). Straightforward Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey through Simplified Methanol Extraction (QuPPE) and LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(14), 4443–4453.

U.S. Food and Drug Administration. (2021). *ORA laboratory manual volume II: Methods, method verification and validation* (ORALAB.5.4.5).