

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในเนื้อสัตว์ปีกโดยเทคนิค LC-MS/MS

พิเชษฐ์ กุมภาว* ชัชวาลย์ โรจนทรัพย์

บทคัดย่อ

สืบเนื่องจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้ประกาศแจ้งเตือนในระบบ RASFF ของสหภาพยุโรปว่า ได้ตรวจพบการปนเปื้อนสาร chlorate ในเนื้อไก่ที่ส่งจากประเทศไทย ในระดับสูงกว่าค่าปริมาณตกค้างสูงสุด ตามที่กำหนดไว้ใน COMMISSION REGULATION (EU) 2020/749 กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ จึงได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS และได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร perchlorate ไปพร้อมกัน เนื่องจากเป็นสารตกค้างที่คณะกรรมการอาหารยุโรป ได้ประกาศไว้ใน COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 เพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์เนื้อสัตว์ปีกส่งออก เริ่มด้วยการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยน้ำและ acetonitrile แยกไขมันออกจากตัวอย่างด้วย hexane และทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วย SPE ชนิด MCX กรองด้วย PTFE filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS ชนิด Triple Quadrupole และผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่า วิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate มีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายและในเมทริกซ์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 5–100 ng/mL มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.98 การประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ chlorate และ perchlorate พบว่า มีค่าผลกระทบจากเมทริกซ์ ตั้งแต่ 44.22-68.72% และ 0.61-33% ตามลำดับ ค่าความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้และแบบทำซ้ำได้ โดยพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่า 20% ค่าความแม่นยำโดยประเมินจากร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 74.63-91.05% และ 76.61-103.11% ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 5 µg/kg และ 10 µg/kg ตามลำดับ มีช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 5–100 µg/kg โดยทุกพารามิเตอร์ได้ค่าสอดคล้องตามข้อกำหนดใน SANTE/11312/2021 V2 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก

คำสำคัญ : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี คลอเรต เปอร์คลอเรต เนื้อสัตว์ปีก LC-MS/MS

เลขทะเบียนวิชาการ : 68(2)-0304-012

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

เลขที่ 91 หมู่ที่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

* ผู้รับผิดชอบ หมายเลขโทรศัพท์ 0-2967-9700 ต่อ 1121 E-mail: chenthailand@yahoo.com

Development and validation of a method for the analysis of chlorate and perchlorate in poultry meat using LC-MS/MS technique

Pichet Koompa* Chatchawan Rodjanasap

ABSTRACT

A warning issued by authorities in the Netherlands through the RASFF system of the European Union highlighted chlorate contamination in chicken meat exported from Thailand, exceeding the Maximum Residue Limits (MRLs) as defined in COMMISSION REGULATION (EU) 2020/749. Consequently, a method for analyzing chlorate in poultry meat using the LC-MS/MS technique was developed and validated by The Veterinary Public Health Laboratory for use in analyzing export poultry meat and simultaneously developed a method for analyzing perchlorate because it is a residue that the European Commission has specified in COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915. Start with extracting the chicken meat sample with water and acetonitrile, separating fat using hexane, purifying the sample with SPE MCX, filtering it through a 0.22-micrometer PTFE filter and determining the type and quantity using Triple Quadrupole LC-MS/MS. The validation results of the method revealed that chlorate and perchlorate showed linearity on the standard curves in both the solvent and the matrix, with concentrations ranging from 5 to 100 ng/mL. The decision coefficient (R^2) was greater than 0.98. Evaluation of matrix effects indicated that the matrix effect values for chlorate and perchlorate ranged from 44.22% to 68.72% and 0.61% to 33.00%, respectively. Precision type repeatability and within laboratory reproducibility with percent relative standard deviations (%RSD) less than 20%. The accuracy, estimated from the percentage recovery (% recovery), ranged from 74.63% to 91.05% for chlorate and 76.61% to 103.11% for perchlorate. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were determined to be 5 µg/kg and 10 µg/kg, respectively. The analytical range was 5–100 µg/kg. All parameters comply with the requirements in SANTE/11312/2021 V2. Based on these results, the method is suitable for testing chlorate and perchlorate in poultry meat samples.

Keywords: method development and validation, chlorate, perchlorate, poultry meat, LC-MS/MS

Registered No: 68(2)-0304-012

Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

91 Moo. 4, Tiwanon Road, Bangkadi Subdistrict, Muang District, Pathum Thani Province, 12000

Corresponding author, Tel 0 2967 9700 #1121, E-mail: chenthailand@yahoo.com

บทนำ

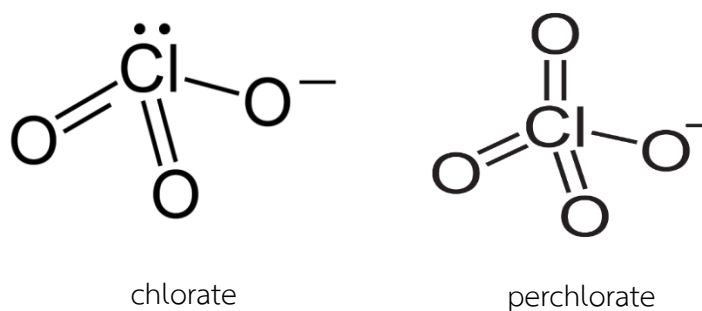
สารคลอเรต (chlorate) เป็นสารประกอบเคมีที่มีคลอรีนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหลัก มีสูตรทั่วไปคือ ClO_3^- โครงสร้างและคุณสมบัติประกอบด้วย อะตอมคลอรีน 1 อะตอมและออกซิเจน 3 อะตอม (รูปที่ 1) มักพบในรูปของเกลือ เช่น โซเดียมคลอเรต (NaClO_3) สาร chlorate เกิดขึ้นหรือเป็นผลพลอยได้เมื่อใช้คลอรีนคลอรีนไดออกไซด์หรือไฮโปคลอไรต์ในการฆ่าเชื้อน้ำดื่ม น้ำสำหรับการผลิตหรือการแปรรูปอาหาร และการทำความสะอาดพื้นผิวที่สัมผัสอาหารบนอุปกรณ์ (EFSA, 2015) ผลิตได้จากการอิเล็กโทรไลซิสของสารละลายคลอไรด์หรืออาจเกิดขึ้นตามธรรมชาติในปริมาณน้อยในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน เป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง นอกจากนี้สาร chlorate ยังถูกนำมาใช้ในการผลิตสารฟอกขาวและสารกำจัดวัชพืช ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ การผลิตสารเคมีอื่น ๆ และการทำเหมืองแร่บางประเภท ความเป็นอันตรายคือ เป็นสารออกซิไดซ์ที่แรงสามารถทำปฏิกิริยารุนแรงกับสารอินทรีย์ อาจเป็นอันตรายหากกลืนกิน สูดดม หรือสัมผัสผิวหนัง สามารถระเบิดได้เมื่อสัมผัสกับความร้อนหรือแรงกระแทก

สาร chlorate มีความเป็นพิษหลังจากการกลืนกินและสูดดม การกิน chlorate อาจทำให้เกิดโรคกระเพาะ ไตอักเสบจากพิษ เม็ดเลือดแดงแตกทำให้มีฮีโมโกลบินในเลือดและในปัสสาวะและไตวายเฉียบพลัน (Robert A. Howd, 2002) หากได้รับในระดับที่สูงอาจรบกวนความสามารถของเลือดในการลำเลียงออกซิเจนทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ เวียนศีรษะ และเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินในเลือด การกลืนกินอาจทำให้เกิดอาการไม่สบายทางเดินอาหาร และอาจส่งผลเสียต่อไต โพแทสเซียมคลอเรตทำให้เกิดภาวะเนื้อตายของท่อไตในสัตว์ (Reubi, 1978)

สารเปอร์คลอเรต (perchlorate) เป็นสารประกอบเคมีที่มีคลอรีนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหลัก มีสูตรทั่วไปคือ ClO_4^- แตกต่างจากสาร chlorate คือ มีออกซิเจนมากกว่า chlorate (ClO_3^-) 1 อะตอม (รูปที่ 1) และมักจะเสถียรกว่าและทำปฏิกิริยาช้ากว่า chlorate โครงสร้างและคุณสมบัติประกอบด้วย อะตอมคลอรีน 1 อะตอมและออกซิเจน 4 อะตอม เป็นไอออนลบ (anion) มักพบในรูปของเกลือ เช่น แอมโมเนียมเปอร์คลอเรต (NH_4ClO_4)

สาร perchlorate สามารถก่อตัวขึ้นเองตามธรรมชาติในบรรยากาศ และตกตะกอนลงในดินและน้ำใต้ดิน ส่งผลให้มี perchlorate ในระดับเล็กน้อยในฝนที่ตก perchlorate ในระดับสูงเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในบางพื้นที่ เช่น ภูมิภาคทางตะวันตกของเท็กซัสและทางตอนเหนือของซีลี (Department of Health and Human Services, 2008) การปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมเกิดจากการใช้ปุ๋ยในเกษตร การผลิต การใช้ และการกำจัดแอมโมเนียมเปอร์คลอเรตที่ใช้ในเชื้อเพลิงจรวด วัตถุระเบิด พลุไฟ ดอกไม้ไฟ พลุสัญญาณ และอุปกรณ์พองลมถุงลมนิรภัย และในกระบวนการอุตสาหกรรมอื่นๆ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (The Food and Drug Administration) ของสหรัฐอเมริกา อนุมัติให้ใช้สาร perchlorate ในบรรจุภัณฑ์พลาสติกและอุปกรณ์จัดการอาหารสำหรับอาหารแห้ง เช่น ซีเรียล แป้ง เครื่องเทศ และสารเติมแต่งอื่นๆ อีกมากมาย เพื่อลดการสะสมของประจุไฟฟ้าสถิต (Environmental Defense Fund, 2018)

สาร perchlorate มีความเป็นพิษหากได้รับในระดับความเข้มข้นสูง ส่งผลต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ โดยยับยั้งการดูดซึมไอโอดีน แข่งขันกับไอโอดีนในการจับกับโปรตีนที่ขนส่งไอโอดีนเข้าสู่ต่อมไทรอยด์ ผลลัพธ์คือการลดการสร้างฮอร์โมนไทรอยด์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโต การได้รับในปริมาณสูงอาจนำไปสู่ภาวะต่อมไทรอยด์ทำงานต่ำ (hypothyroidism) และอาจส่งผลกระทบต่อผู้ที่มีความผิดปกติของไอโอดีนอยู่แล้ว โดยเฉพาะการยับยั้งการนำไอโอดีนไปสร้างฮอร์โมนไทรอยด์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ในผู้ใหญ่ ส่วนในวัยรุ่นหรือผู้ที่อายุน้อยก็อาจส่งผลให้เกิดภาวะขาดไอโอดีนได้ (iodine deficiency) (Asha *et al.*, 2009) รวมถึงมีความเสี่ยงเป็นพิเศษสำหรับทารกในครรภ์ ทารกแรกเกิด และเด็กเล็ก เนื่องจากฮอร์โมนไทรอยด์มีความสำคัญต่อการพัฒนาสมองและการเจริญเติบโต (Tom Neltner, 2017)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ chlorate และ perchlorate

คณะกรรมการการยุโรป ได้ออกกฎระเบียบ COMMISSION REGULATION (EU) 2020/749 of 4 June 2020 amending Annex III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorate in or on certain products กำหนดปริมาณตกค้างสูงสุด (maximum residue limits; MRL) ของสาร chlorate ในเนื้อสัตว์ เท่ากับ 0.05 mg/kg ส่วนสาร perchlorate กำหนดปริมาณตกค้างสูงสุดไว้ใน COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 เฉพาะในพืช ผัก ผลไม้ และอาหารสำหรับทารก แต่ไม่ได้กำหนดปริมาณตกค้างสูงสุดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate พบว่า มีการใช้เทคนิคการแยกสารและหาปริมาณที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS, UPLC-MS/MS, UPLC-Qtrap MS และ LC-QqQ-MS/MS ตัวอย่างเช่น Hepperle *et al.* (2014) ศึกษาการวิเคราะห์ perchlorate ในพืชที่ใช้เป็นอาหารโดยเทคนิค LC-MS/MS สกัดตัวอย่างตามวิธีของ QuPPE-Method (Quick Polar Pesticides Method) โดยสกัดตัวอย่างด้วยน้ำ และ methanol เติม internal standard กรองตัวอย่างด้วย filter ขนาด 0.45 μm ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ขนาด 100X2.1 mm 5 μm ใช้ 1% acetic acid ในน้ำที่มี methanol 5% (A) และ acetic acid ใน methanol 1% (B) เป็น mobile phase Huadong *et al.* (2020) ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สาร chlorate, perchlorate และ bromate ในผักและผลไม้ โดยเทคนิค UPLC-MS/MS โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์จาก QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) สกัดตัวอย่างด้วย 50% acetonitrile ในน้ำ clean-up ด้วย GCB และ C18 ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด IC-PakTM Anion HR ในการแยกสาร Zhang, Feng *et al.* (2022) ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในกาแฟสำเร็จรูป และกาแฟพร้อมดื่มโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ด้วย trifunctional-groups modified hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column แล้ว

clean-up ด้วย SPE (Solid Phase Extraction) ชนิด MCX ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Torus DEA ขนาด 100X2.1 mm ใช้ 2mM ammonium acetate ในน้ำที่มี 0.4% ammonium (A) และ acetonitrile (B) เป็น mobile phase Xiaoli *et al.* (2024) ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในผักและผลไม้ ด้วยเทคนิค UPLC-Qtrap MS โดยสกัดตัวอย่างด้วยน้ำและ acetonitrile แล้ว clean-up ด้วย GCB และ PSA ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด waters anionic polar pesticide ขนาด 100X2.1 mm 5 μ m ใช้ 20mM ammonium formate (A) และ acetonitrile (B) เป็น mobile phase Zhang, Zheng *et al.* (2022) ได้พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ chlorate และ perchlorate ในน้ำดื่มและอาหารต่างๆ โดยใช้เครื่อง LC-QqQ-MS/MS ตัวอย่างน้ำดื่มกรองด้วย polyether sulfone filter ขนาด 0.22 μ m ตัวอย่างอาหารสด (เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อโค เนื้อแกะ และเนื้อสุกร) และอาหารแห้ง สกัดตัวอย่างด้วยน้ำ 7 mL และ acetonitrile 13 mL clean-up ด้วย SPE ชนิด HLB 60 mg กรองด้วย PTFE filter ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Torus™ DEA ขนาด 100X2.1 mm 1.7 μ m ใช้ 20mM ammonium formate (A) และ acetonitrile (B) เป็น mobile phase

การพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในครั้งนี้ สืบเนื่องมาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ได้ประกาศแจ้งเตือนในระบบ RASFF ของสหภาพยุโรปว่า วันที่ 2 ตุลาคม 2566 ได้ตรวจพบการปนเปื้อนสาร chlorate ในเนื้อไก่ที่ส่งจากประเทศไทย 0.76 mg/kg ซึ่งสูงกว่าค่า MRLs ตามที่ สหภาพยุโรปกำหนดไว้คือ 0.05 mg/kg การตรวจพบสารตกค้างดังกล่าวส่งผลกระทบต่อการส่งออกสินค้า เนื้อสัตว์ปีกของไทยไปสหภาพยุโรป กรมปศุสัตว์ จึงได้สั่งการให้สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์เร่ง ศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร chlorate ในเนื้อสัตว์ปีก โดยเทคนิค LC-MS/MS และได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร perchlorate ไปพร้อมกัน เนื่องจากเป็นสารตกค้างที่คณะกรรมการอาหารยุโรป ได้ประกาศไว้ใน COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006 และมีความเสี่ยงที่อาจจะตกค้างในอาหาร เนื่องจากงานวิจัยนี้จำเป็นต้องเร่งดำเนินการทั้งการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อให้ทันกับการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งออกตามข้อกำหนดของ สหภาพยุโรป และห้องปฏิบัติการยังขาดอุปกรณ์สำคัญ เช่น คอลัมน์ HPLC ชนิด Torus™ DEA ที่ใช้ในการแยกสาร จึงได้นำคอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb มาใช้แทน เมื่อทดลองทำการสกัดตัวอย่างและ clean-up ตามวิธีของ Zhang, Zheng *et al.* (2022) พบว่า สารสกัดตัวอย่างยังสะอาดไม่เพียงพอ พบสารหรือพีคแปลกปลอมที่ปรากฏในเวลาเดียวกันกับสาร chlorate จึงได้ดัดแปลงวิธีเพื่อให้ได้วิธีการสกัดตัวอย่างที่มีความเหมาะสม สารที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และกระบวนการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate มีประสิทธิภาพสูงสุด การศึกษาครั้งนี้ ใช้ตัวอย่างเนื้อไก่เป็นตัวแทนเนื้อสัตว์ปีกซึ่งเป็นไปตามหลักการใน SANTE 11312/2021 V2 หลังจากพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ให้ได้วิธีตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 ทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ความจำเพาะ (specificity) ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect: ME) ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity) ช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (working range) LOD, LOQ ความเที่ยง (precision) แบบการ ทวนซ้ำได้ (repeatability) ความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility) ความแม่นยำ (accuracy) รวมถึงได้ดำเนินการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว มีความ

นำเชื้อถือและตรงตามวัตถุประสงค์การใช้งาน และสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับค่า MRLs ที่สหภาพยุโรปกำหนดไว้ ทั้งนี้ เพื่อให้สามารถรองรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งออกที่ส่งเข้ามาตรวจวิเคราะห์ ซึ่งกรมปศุสัตว์จำเป็นต้องเฝ้าระวังการตกค้างของสารดังกล่าว และควบคุมกำกับระบบการผลิตสินค้าเนื้อสัตว์ปีกเพื่อส่งออกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์หลัก

เครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSQ quantis และรุ่น TSQ endura 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 คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ขนาด 2.1 X 100 mm 5 μm (porous graphitic carbon) และคอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 ขนาด 2.1X150 mm 3 μm (C18)

2. สารเคมี สารมาตรฐาน และอื่นๆ

สารเคมี AR grade ได้แก่ acetonitrile, acetic acid, formic acid และ hexane และ HPLC grade ได้แก่ methanol

สารมาตรฐาน (standards) chlorate ยี่ห้อ LGC product no. VGH-ICL03-100 และ perchlorate ยี่ห้อ LGC product no. VGH-ICL04-100 ความเข้มข้นชนิดละ $1,000 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ ละลายในน้ำ

SPE HLB 6 mL 200 mg และ MCX 6 mL 150 mg

อื่นๆ ได้แก่ น้ำขจัดไอออน (deionized, DI)

วิธีการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

1.1 การหาสถานะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์

โดยเตรียมสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate แต่ละชนิด ความเข้มข้น $1 \mu\text{g/mL}$ ในน้ำ ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรง เลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดแบบไอออนลบ (negative ionization) เพื่อหาค่า collision energy (CE) RF Lens และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ parent ion และ product ion ที่ให้ค่าสัญญาณสูงที่สุดในการวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM)

1.2 การหาสถานะที่เหมาะสมของเครื่อง LC

ทำการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบคอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ขนาด 2.1X100 mm 5 μm ใช้ 0.5% acetic acid ในน้ำ (A) และ methanol (B) เป็น mobile phase (EURL-SRM, 2023) และคอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 ขนาด 2.1X150 mm 3 μm ใช้ 0.1% formic acid ในน้ำ (A) และ 0.1% formic acid ใน methanol (B) เป็น mobile phase ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยฉีดสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 30 ng/mL นำผลวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับสัญญาณของพีค จากนั้น ฉีดสารมาตรฐาน

ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ng/mL นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($y=mx+c$) ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area ของสารมาตรฐาน (แกน y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เกณฑ์การยอมรับ $R^2 \geq 0.98$ (CAC/GL 40-1993, 2010)

1.3 การพัฒนาวิธีการสกัด (extraction) และการทำให้บริสุทธิ์ (clean-up)

1.3.1 การสกัดตัวอย่าง

วิธีการสกัดตัวอย่าง ได้ทำการดัดแปลงจากวิธีของ Zhang, Zheng *et al.* (2022) เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ chlorate และ perchlorate ในตัวอย่างอาหารสด (เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อโค เนื้อแกะ และเนื้อสุกร) โดยเพิ่มน้ำหนักของตัวอย่างจาก 2 g เป็น 5 g เติมน้ำ 2 mL และ acetonitrile 8 mL (วิธีเติมน้ำ 7 mL และ acetonitrile 13 mL) vortex 1 min ultrasonicated 15 min centrifuge 10,000 r/min นาน 5 min และเพิ่มขั้นตอนการเติม hexane 5 mL vortex 1 min centrifuge 5,000 r/min นาน 2 min เพื่อให้สารละลายตัวอย่างแยกชั้น จากนั้น ดูดสารละลายชั้นล่างเพื่อนำตัวอย่างไป clean-up ด้วย SPE ในขั้นตอนต่อไป

1.3.2 การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยใช้ SPE

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ SPE 2 ชนิด ที่ทำให้ตัวอย่างบริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีดังนี้

(1) condition: ด้วย acetonitrile 5 mL น้ำ 5 mL และ acetonitrile 5 mL ตามลำดับ

(2) loading: ใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 15 mL ลงใน rack ของชุด vacuum manifold เพื่อรองรับตัวอย่าง ใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 mL

(3) eluting: ชะสารตัวอย่างและเก็บส่วนที่ไหลผ่าน SPE ลงมา โดยใช้ acetonitrile ปริมาตร 3 mL โดยทุกขั้นตอนต้องควบคุมให้มีอัตราการไหลสม่ำเสมอ และ cartridge ไม่แห้งจนเกินไป

(4) ระเหยสารตัวอย่างที่ได้ด้วยเครื่อง automatic nitrogen concentrator โดยไม่ใช้ความร้อนในการทำแห้ง ปรับปริมาตรด้วย 0.5% acetic acid ในน้ำ:methanol (95:5) ปริมาตร 1 mL กรองผ่าน PTFE filter ขนาด 0.2 μ m ลงใน vial สีชา ขนาด 1.5 mL เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb และคอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 (สภาวะตามข้อ 1.2)

การศึกษาวิธีสกัดและการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ โดยการวิเคราะห์ sample blank และ method blank (reagent blank) อย่างละ 1 ตัวอย่าง และ spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 50 μ g/kg โดยใช้ SPE ชนิดละ 3 ซ้ำ ทำ 2 ชุดการทดสอบ โดยชุดการทดสอบที่ 1 ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb และชุดการทดสอบที่ 2 ใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 นำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกัน โดยคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120 % และ %RSD $\leq$ 20 % (SANTE 11312/2021 V2)

การตรวจสอบความความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

เมื่อได้วิธีที่ได้จากการพัฒนาที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการยืนยันประสิทธิภาพของวิธี โดยตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามขั้นตอน SANTE 11312/2021 V2 ดังนี้

1. ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและผลกระทบจากเมทริกซ์

ฉีดสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ในตัวทำละลาย 0.5% acetic acid ในน้ำ:methanol (95:5) (standard in solvent) กับในสารสกัดเนื้อสัตว์ปีก (matrix matched standard) จำนวน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 30, 50, 70 และ 100 ng/mL ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาสร้าง calibration curve ระหว่าง concentration กับ peak area คำนวณหาค่า R^2 เกณฑ์การยอมรับ $R^2 \geq 0.98$ (CAC/GL 40-1993, 2010) จากนั้น นำ peak area ของ standard in solvent กับ peak area ของ matrix matched standard มาคำนวณค่า %ME โดยมีสูตรการคำนวณ ดังนี้ (SANTE 11312/2021 V2)

$$\%ME = \left(\frac{R_{std \text{ in matrix extract}}}{R_{std \text{ in solvent}}} - 1 \right) \times 100$$

R = Detector response

ประเมินผล %ME โดยกำหนดเกณฑ์ผลการประเมิน (Mohammed *et al.*, 2020) ดังนี้ %ME มีค่า $< \pm 20\%$ หมายถึง มีผลกระทบน้อย (low) แสดงว่า ผลกระทบของเมทริกซ์ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์และสามารถใช้ standard in solvent ในการคำนวณผลการวิเคราะห์ได้ค่า %ME $> \pm 20$ and $< \pm 50\%$ หมายถึง มีผลกระทบปานกลาง (medium) และค่า %ME $> \pm 50\%$ หมายถึง มีผลกระทบมาก (strong) แสดงว่า ไม่สามารถใช้ standard in solvent ในการคำนวณผลการวิเคราะห์ได้ จะต้องใช้ matrix matched standard ในการคำนวณผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์การตัดสินผลกระทบของเมทริกซ์

Matrix effect (%ME)	Consideration	Result
$< \pm 20\%$	low	Negative (-)
$> \pm 20$ and $< \pm 50\%$	medium	Zero (0)
$> \pm 50\%$	strong	Positive (+)

2. การทดสอบความจำเพาะ

วิเคราะห์ method blank sample blank และ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 50 µg/kg เทียบกับสารมาตรฐานหรือ matrix matched standard ความเข้มข้น 50 ng/mL เพื่อตรวจสอบการรบกวนโดยพิจารณาจากพีคของสารที่ปรากฏใน method blank และ sample blank เกณฑ์การยอมรับ คือ ผลการวิเคราะห์ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับสารมาตรฐานหรือ matrix matched standard ส่วน spiked sample ต้องมีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับสารมาตรฐานหรือ matrix matched standard โดยค่า RT $\pm$ ไม่เกิน 0.1 นาที (SANTE 11312/2021 V2)

3. การทดสอบหาค่า limit of detection (LOD) และค่า limit of quantitation (LOQ) โดยประมาณ

วิเคราะห์ spike sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 10 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S_0'$ และ ค่า LOQ จาก $10S_0'$ (Eurachem, 2014)

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

n = จำนวนทดสอบซ้ำในงาน routine

S_0 = standard deviation จากการทดสอบซ้ำ

S_0' = standard deviation สำหรับคำนวณค่า LOD และ LOQ

4. การทดสอบยืนยันค่า LOD และ LOQ

เมื่อได้ค่า LOD และ LOQ โดยประมาณแล้ว ทำการวิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณได้ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อเป็นการยืนยัน ค่า LOD และ LOQ

- ประเมินค่า LOD โดยพิจารณาจากค่าสัญญาณของสารที่ตรวจ เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) เกณฑ์การยอมรับค่า LOD คือ $S/N \geq 3$ (SANTE 11312/2021 V2)

- ประเมินค่า LOQ โดยนำค่าความเข้มข้นที่วัดได้ มาคำนวณ %MR และ %RSD เกณฑ์การยอมรับ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120 % และ %RSD ≤ 20 % (SANTE 11312/2021 V2)

5. การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

5.1 การทดสอบความแม่นยำ โดยวิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 30, 50, 70 และ 100 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินค่าความแม่นยำโดยนำความเข้มข้นที่วัดได้มาคำนวณ %MR เกณฑ์การยอมรับ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120 % (SANTE 11312/2021 V2)

5.2 การทดสอบความเที่ยง

- การทดสอบความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกัน ใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน และใช้เครื่อง LC-MS/MS เครื่องเดียวกัน โดยวิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 30, 50, 70 และ 100 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ โดยนำความเข้มข้นที่วัดได้มาคำนวณ %RSD_r เกณฑ์การยอมรับคือ %RSD_r $\leq 20\%$ (SANTE 11312/2021 V2)

- การทดสอบความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกัน ใช้เครื่อง LC-MS/MS ต่างเครื่องกัน (LC-MS/MS ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSQ quantis และรุ่น TSQ endura) โดยวิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 10(LOQ), 50 และ 100 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ โดยนำความเข้มข้นที่วัดได้มาคำนวณ %RSD_{WR} เกณฑ์การยอมรับคือ %RSD_{WR} $\leq 20\%$ (SANTE 11312/2021 V2)

6. การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 10(LOQ), 30, 50, 70 และ 100 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($y=mx+c$) ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง (แกน x) กับความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ (แกน y) คำนวณหาค่า R^2 เกณฑ์การยอมรับคือ $R^2 \geq 0.98$ (CAC/GL 40-1993, 2010)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ แนวทางการประเมินตาม ISO GUM Approach หรือ Bottom-up Approach (Eurachem, 2012) โดยรวมแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่งที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ได้แก่ sample weight extract volume clean up volume final volume calibration curve (C_0) standard conc. method precision และ recovery เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนทุกแหล่งมารวมกัน ให้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า $k = 2$

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

หาสภาวะเครื่อง LC-MS/MS (Triple Quadrupole) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ได้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ สภาวะของ mass spectrometer ประกอบด้วย spray voltage 3,500 volts sheath gas 50 Arb auxiliary gas 10 Arb Ion transfer tube temperature 350 °C และ vaporizer temperature 325 °C สาร chlorate ใช้ precursor ที่ 83 m/z และ product ion เท่ากับ 67(quantification), 51(qualification) และ 35 m/z สาร perchlorate ใช้ precursor ที่ 99 m/z และ product ion เท่ากับ 83 (quantification), 67 (qualification) และ 51 m/z ค่า CE และ RF Lens ที่ได้ ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 MRM parameter ของการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	RF lens (V)	CE (V)	Transition type
Chlorate	83	67	-21	-83	quantification
	83	51	-29	-83	qualification
	83	35	-37	-83	
Perchlorate	99	83	-26	-99	quantification
	99	67	-36	-99	qualification
	99	51	-45	-99	

2. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC โดยใช้คอลัมน์ HPLC Hypercarb ขนาด 2.1X100 mm 5 μ m ใช้ 0.5% acetic acid ในน้ำ (A) และ methanol (B) เป็น mobile phase สภาวะในการแยกสารเป็นแบบ gradient elution อัตราการไหล 0.5 mL/min ตามตารางที่ 2 อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 35 $^{\circ}$ C และ injection volume เท่ากับ 10 μ L โดยผู้วิจัยได้ปรับวิธีของ QuPPE-Method (EURL-SRM, 2023) ซึ่งใช้ 1% acetic acid ในน้ำ+5% methanol (A) และ 1% acetic acid in methanol (B) เป็น mobile phase เพื่อลดการเกิดกลิ่นที่ค่อนข้างฉุนของ acetic acid และปรับอัตรา gradient condition เพื่อให้ RT ของสาร chlorate และ perchlorate มีความเหมาะสม ไม่ออกเร็วเกินไป ซึ่งค่า RT ตามวิธีของ QuPPE-Method สาร chlorate และ perchlorate คือ 2.10 และ 3.01 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 LC conditions สำหรับ คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb

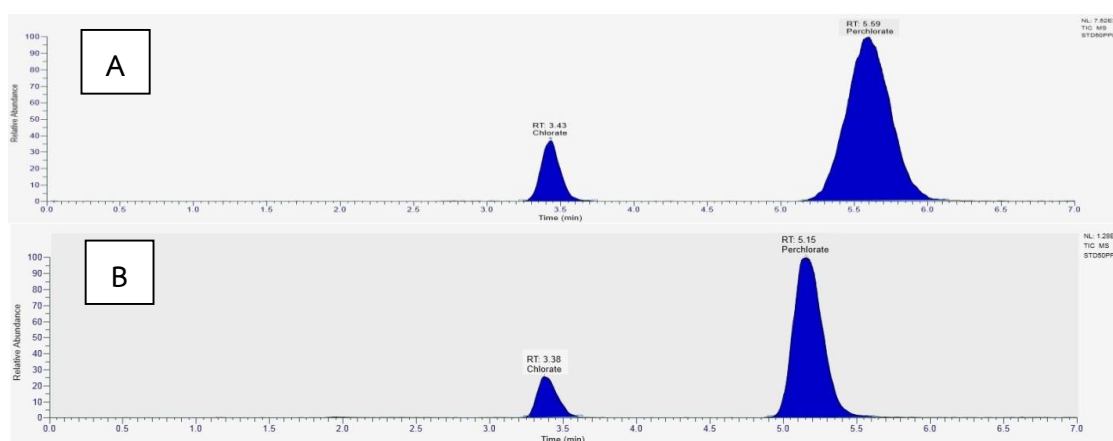
Time (min)	Mobile phase		Flow rate (mL/min)
	A (%)	B (%)	
0	95	5	0.5
10	95	5	0.5
12	0	100	0.5
16	0	100	0.5
16.5	95	5	0.5
25	95	5	0.5

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC โดยใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 ขนาด 2.1X150 mm 3 μ m ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้น เป็นคอลัมน์ HPLC ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการมาเปรียบเทียบ เพื่อใช้ทดแทนคอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ที่มีข้อจำกัด คือ จะต้องใช้เวลาในการ condition คอลัมน์นาน ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานขึ้น ทำให้มีต้นทุนในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น และปัญหาอีกอย่างที่พบในกระบวนการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb คือ เมื่อฉีดตัวอย่างจำนวนมากใน batch เดียว ค่า RT ของสาร chlorate และ perchlorate จะขยับไปจากเดิม (peak shift) โดยใช้ 0.1% formic acid ในน้ำ (A) และ 0.1% formic acid ใน methanol (B) เป็น mobile phase สภาวะการแยกสารเป็นแบบ gradient elution อัตราการไหล 0.2 mL/min ตามตารางที่ 3 อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 35 $^{\circ}$ C และ injection volume เท่ากับ 10 μ L

ตารางที่ 3 LC conditions สำหรับคอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3

Time (min)	Mobile phase		Flow rate (mL/min)
	A (%)	B (%)	
0	95	5	0.2
2	95	5	0.2
7	50	50	0.2
9	50	50	0.2
9.5	95	5	0.2
12	95	5	0.2

เมื่อนำสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 30 ng/mL เพื่อเปรียบเทียบกับคอลัมน์ HPLC ทั้ง 2 ชนิด พบว่า สามารถแยกพีคของสาร chlorate และ perchlorate ออกจากกันได้ดี ค่า RT สาร chlorate และ perchlorate ตามตารางที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบสัญญาณของพีค พบว่า peak area มีความแตกต่างกันเล็กน้อย สาร perchlorate ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil สาร perchlorate จะให้สัญญาณพีค ที่สูงกว่า (peak height) คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ตามตารางที่ 4 และเมื่อนำสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ng/mL และนำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ได้ค่า R^2 มากกว่า 0.98 ตามตารางที่ 5 ดังนั้น สามารถใช้คอลัมน์ HPLC ทั้ง 2 ชนิด ในการตรวจวัดสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate



รูปที่ 2 พีคของสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 30 ng/mL

(A) คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb (B) คอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3

ตารางที่ 4 ค่าสัญญาณพีคของ Chlorate และ Perchlorate ความเข้มข้น 30 ng/mL

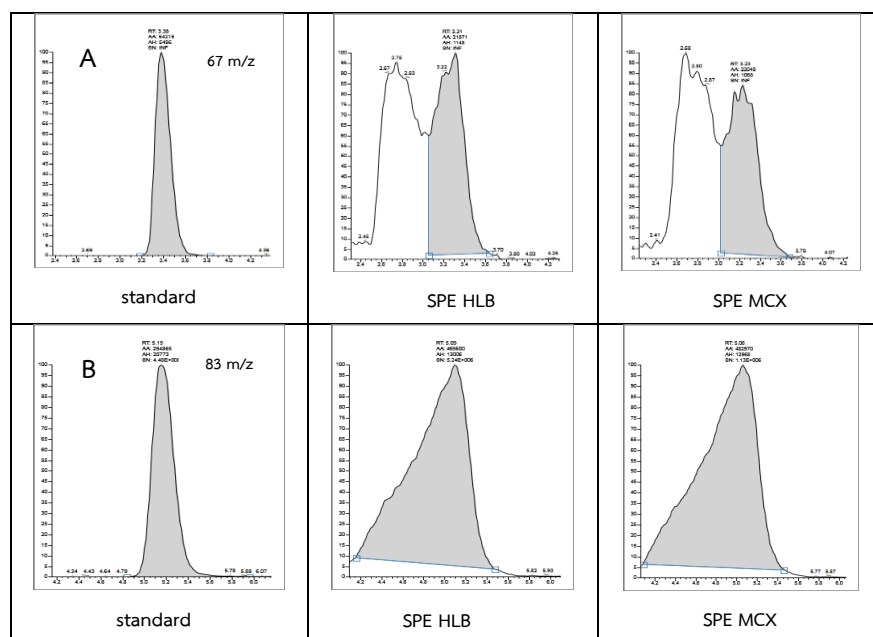
Compounds	HPLC column: Hypercarb				HPLC column: Inertsil ODS-3			
	Peak area	Peak height	RT (min)	S/N	Peak area	Peak height	RT (min)	S/N
Chlorate	25096	2628	3.43	1069	28982	2870	3.38	545
Perchlorate	164599	8028	5.59	3535	140823	10835	5.15	1918

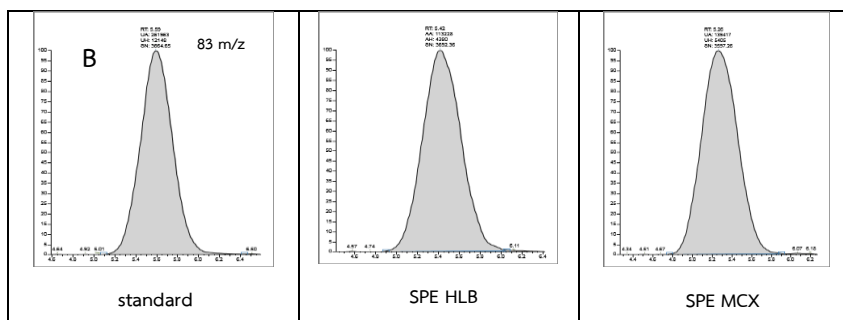
ตารางที่ 5 Calibration curve และค่า R^2 ของสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate

Compounds	Hypercarb 2.1X100 mm		Inertsil ODS-3 2.1X150 mm	
	Calibration curve	R^2	Calibration curve	R^2
Chlorate	$y = 797.49x + 2140.1$	0.9985	$y = 1060.1x + 199.76$	0.9976
Perchlorate	$y = 5118.2x + 8022.6$	0.9988	$y = 5707.3x + 9442.1$	0.9979

3. ผลการพัฒนาวิธีการสกัด (extraction) และการทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (clean-up)

การใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Inertsil ODS-3 ในการฉีดตัวอย่าง spiked sample ที่ clean-up โดยใช้ SPE ชนิด HLB และ SPE ชนิด MCX ไม่สามารถแยกเมทริกซ์ออกจากสาร chlorate ได้ ลักษณะเป็น peak splitting ตามรูปที่ 3(A) ส่วนสาร perchlorate พิคจะมีลักษณะไม่สมมาตรมีลักษณะเป็น peak fronting ตามรูปที่ 3(B) ส่วนการใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ในการฉีดตัวอย่าง spiked sample ที่ clean-up โดยใช้ SPE ชนิด HLB พิคของสาร chlorate มีลักษณะไม่สมมาตร เกิด small peak รูปที่ 4(A) พบสารหรือพิกแปลกปลอมที่ปรากฏในเวลาเดียวกันกับสาร chlorate เนื่องจากสารสกัดตัวอย่างยังสะอาดไม่เพียงพอ อาจเป็นเพราะปริมาณตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ปริมาตรสารสกัดตัวอย่างที่น้อยลง แต่ผลการ clean-up โดยใช้ SPE ชนิด MCX ไม่พบการเกิด small peak ไม่พบสารหรือพิกแปลกปลอมที่ปรากฏในเวลาเดียวกันกับสาร chlorate เนื่องจากสารสกัดตัวอย่างสะอาดขึ้นมีความบริสุทธิ์มากกว่า จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ใน clean-up ตามรูปที่ 4(B)





รูปที่ 4 พิกของ spiked sample ที่ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วย SPE ชนิด HLB และ SPE ชนิด MCX โดยใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb, (A) chlorate (B) perchlorate

ผลการวิเคราะห์ spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/kg}$ โดยใช้ SPE จำนวน 2 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ และใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb พบว่า สาร chlorate และ perchlorate ที่ clean-up ด้วย SPE ชนิด HLB มีค่า %MR เท่ากับ 73.28 และ 91.35 ตามลำดับ %RSD มีค่าเท่ากับ 7.62 และ 5.89 ตามลำดับ และสาร chlorate และ perchlorate ที่ clean-up ด้วย SPE ชนิด MCX มีค่า %MR เท่ากับ 83.83 และ 98.72 ตามลำดับ %RSD มีค่าเท่ากับ 13.54 และ 4.48 ตามลำดับซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120% ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ spiked sample ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/kg}$ ที่ clean-up ด้วย SPE 2 ชนิด

Compounds	SPE ชนิด HLB			SPE ชนิด MCX		
	conc.	%MR	%RSD	conc.	%MR	%RSD
Chlorate	36.64	73.28	7.62	41.92	83.83	13.54
Perchlorate	45.67	91.35	5.89	49.36	98.72	4.48

ดังนั้น จึงเลือกใช้ SPE ชนิด MCX ในขั้นตอนการ clean-up และใช้คอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb ในการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก เพื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในขั้นตอนต่อไป ส่วนปัญหา peak shift ของคอลัมน์ HPLC ชนิด Hypercarb เมื่อฉีดตัวอย่างจำนวนมากใน batch เดียว ควรฉีดสารมาตรฐานคั่นประมาณ ทุกๆ 4-5 inject เพื่อเทียบสัญญาณของพีคและ RT ของการฉีดสารตัวอย่าง

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

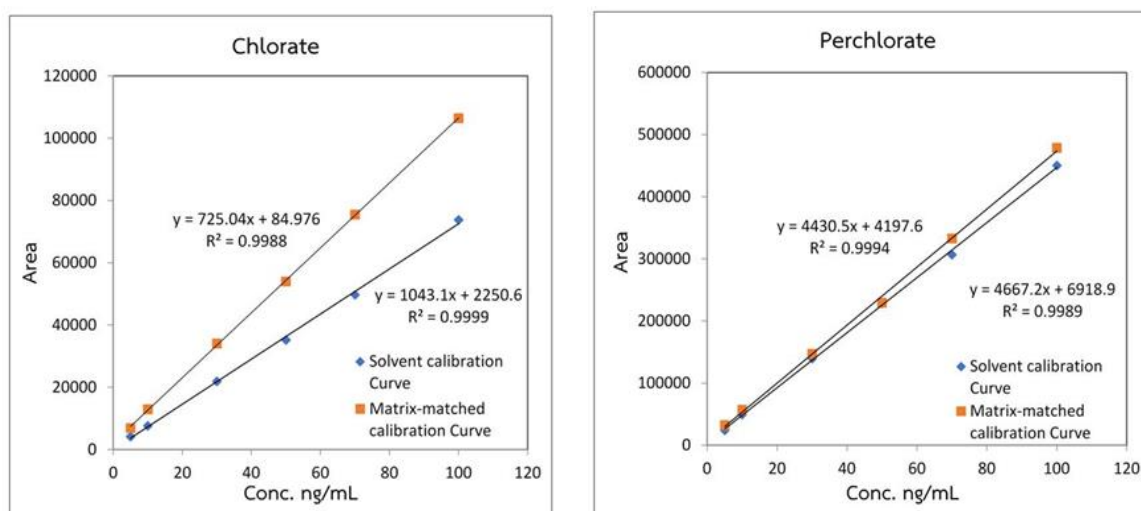
1. ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและผลกระทบจากเมทริกซ์

กราฟมาตรฐานของสาร chlorate และ perchlorate ในตัวทำละลาย 0.5% acetic acid ในน้ำ:methanol (95:5) และในเมทริกซ์ มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5–100 ng/mL สาร chlorate มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 และ 0.9988 ตามลำดับ และสาร perchlorate มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9989 และ 0.9994 ตามลำดับ ตามตารางที่ 7 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ค่า $R^2 \geq 0.98$ และเมื่อนำค่า peak area มาคำนวณเพื่อตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ พบว่าสาร chlorate ช่วงความเข้มข้น 5–100 ng/mL มีค่า %ME $>\pm 50\%$ หมายถึง มีผลกระทบมาก (strong) แสดงว่าไม่สามารถใช้ standard in solvent ในการคำนวณผลการวิเคราะห์ได้ จะต้องใช้ matrix

matched standard ในการคำนวณผลการวิเคราะห์ อาจยังมีสารรบกวนในตัวอย่างที่สกัดได้ ส่วน perchlorate ที่ระดับความเข้มข้น 5 ng/mL มีค่า %ME อยู่ในช่วง $> \pm 20$ and $< \pm 50\%$ หมายถึง มีผลกระทบปานกลาง (medium) ส่วนความเข้มข้นอื่นๆ $< \pm 20\%$ หมายถึง มีผลกระทบน้อย (low) ตามตารางที่ 8 ดังนั้น จึงใช้การชดเชยผลของเมทริกซ์ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานจาก matrix matched standard เพื่อความเหมาะสมในการวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก

ตารางที่ 7 Calibration curve ค่า R^2 ของ standard in solvent และ matrix matched standard

Compounds	Standard in solvent		Matrix matched standard	
	Calibration curve	R^2	Calibration curve	R^2
Chlorate	$Y=1043.1X+2250.6$	0.9999	$Y=725.04X+84.976$	0.9988
Perchlorate	$Y=4667.2X+6918.9$	0.9989	$Y=4430.5X+4197.6$	0.9994



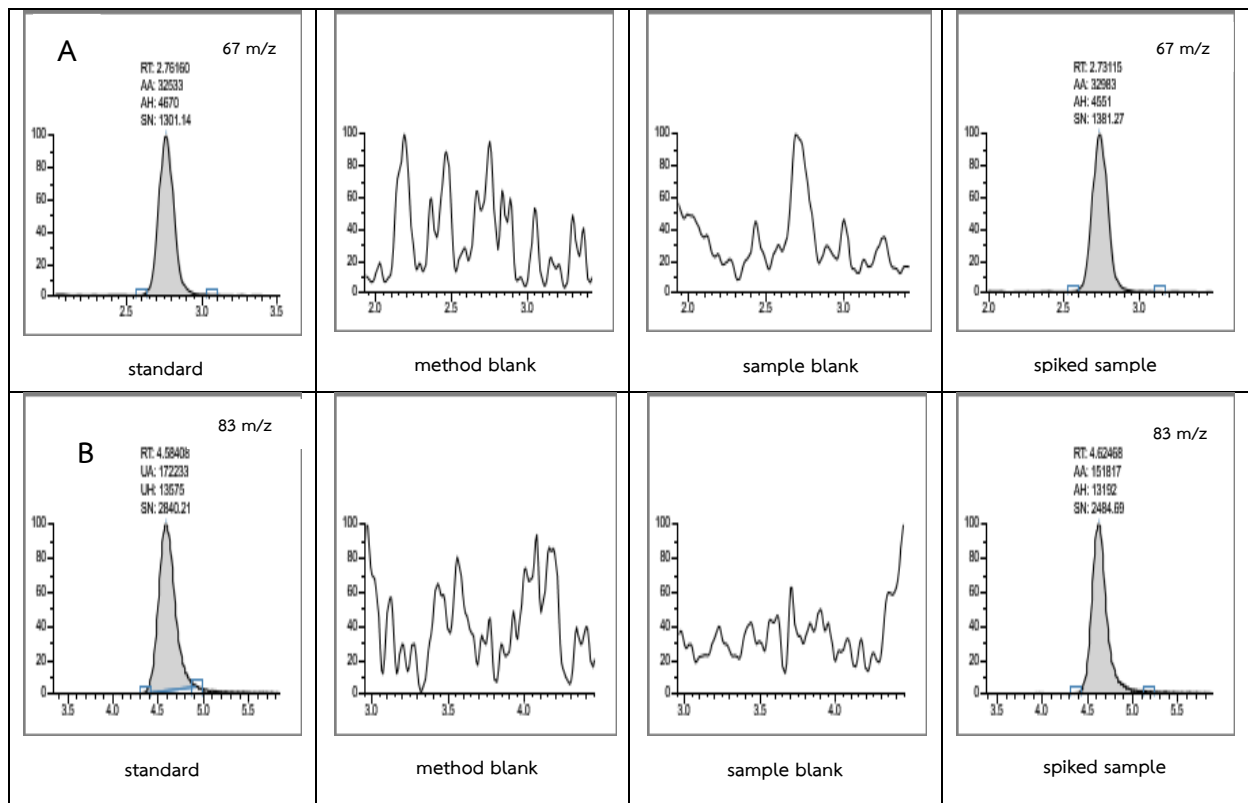
รูปที่ 5 กราฟมาตรฐาน ของ standard in solvent และ matrix matched standard

ตารางที่ 8 Matrix effect สาร chlorate และ perchlorate

Conc. (ng/mL)	Chlorate				Perchlorate			
	Mean Area standard in solvent	Mean Area matrix matched standard	%ME	Consideration	Mean Area standard in solvent	Mean Area matrix matched standard	%ME	Consideration
5	4223	6950.67	64.59	strong	24326	32355.33	33.00	medium
10	7679	12956	68.72	strong	49755.67	57219.67	15.00	soft
30	21935	34075	55.35	strong	139647	147318.7	5.49	soft
50	35260.33	54010.33	53.18	strong	228243.3	229646.3	0.61	soft
70	49747.67	75487	51.74	strong	306867.7	332919	8.49	soft
100	73801.33	106437.7	44.22	strong	450427.7	478870.3	6.31	soft

2. ผลการทดสอบความจำเพาะ

method blank และ sample blank ตรวจไม่พบพีคของสารรบกวนที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตรงหรือใกล้เคียงกับ matrix matched standard ส่วน spiked sample ที่เติมสารมาตรฐาน chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 50 µg/kg มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตรงกับ matrix matched standard โดยมีค่า RT $\pm$ ไม่เกิน 0.1 min แสดงในรูปที่ 6 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้ปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ



รูปที่ 6 พีคของ matrix matched standard method blank sample blank และ spiked sample
(A) chlorate (B) perchlorate

3. ผลการทดสอบหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) โดยประมาณ

ผลการวิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 10 ซ้ำ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เทียบกับ matrix matched standard เพื่อหาค่า LOD และ LOQ โดยประมาณ คำนวณค่า LOD จาก $3S_0$ ได้ค่า LOD เท่ากับ 3.61 และ 3.29 ตามลำดับ ตามตารางที่ 9 จึงกำหนดให้ LOD มีค่าเท่ากับ 5 µg/kg คำนวณค่า LOQ จาก $10S_0$ ได้ค่า LOQ เท่ากับ 12.04 และ 10.97 ตามลำดับ ตามตารางที่ 9 จึงกำหนดให้ค่า LOQ มีค่าเท่ากับ 10 µg/kg โดยประมาณ

2. ผลการทดสอบยืนยันค่า LOD และ LOQ

ยืนยันค่า LOD โดยวิเคราะห์ spiked sample สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 5 µg/kg จำนวน 10 ซ้ำ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เทียบกับ matrix matched standard พบว่า ค่า S/N (เฉลี่ย) ของ chlorate และ perchlorate มีค่าเท่ากับ 651.02 และ 539.77 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ $S/N \geq 3$ ตามตารางที่ 9 และ

ยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ spiked sample ความเข้มข้น 10 µg/kg จำนวน 10 ซ้ำ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เทียบกับ matrix matched standard พบว่า %MR ของ chlorate และ perchlorate มีค่าเท่ากับ 74.63 และ 103.11% ตามลำดับ %RSD มีค่าเท่ากับ 5.35 และ 7.08% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120% และ %RSD ต้องมีค่า ≤ 20% ตามตารางที่ 9 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้น 5 µg/kg และ LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/kg เมื่อเปรียบเทียบกับค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ของ Zhang, Zheng *et al.* (2022) ในตัวอย่างอาหารสด (เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อโค เนื้อแกะ และเนื้อสุกร) ได้เท่ากับ 6.0 µg/kg and 1.0 µg/kg ตามลำดับ ดังนั้น วิธีวิเคราะห์นี้เป็นไปตามเกณฑ์ SANTE 11352/2021 V2 กำหนดไว้ คือ $LOQ \leq MRL$ ซึ่งค่า MRL ตามมาตรฐาน Commission regulation (EU) No 2020/749 ของสหภาพยุโรปกำหนดมาตรฐานสาร chlorate ในเนื้อสัตว์ปีกเท่ากับ 50 µg/kg

ตารางที่ 9 Limit of detection (LOD) & limit of quantitation (LOQ)

Compounds	10 µg/kg (n=10)			LOD (n=10) (5 µg/kg)	LOQ (n=10) (10 µg/kg)	
	SD	LOD	LOQ	S/N	%MR	%RSD
		(3S ₀)	(10S ₀)			
Chlorate	1.2039	3.61	12.04	651.02	74.63	5.35
Perchlorate	1.0968	3.29	10.97	539.77	103.11	7.08

5. ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ผลการทดสอบความแม่นยำ พบว่า %MR ของสาร chlorate และ perchlorate อยู่ในช่วง 75.28-79.40% และ 77.76-82.56% ตามลำดับ ตามตารางที่ 10 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %MR ต้องอยู่ในช่วง 70-120% การทดสอบ ความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ พบว่า %RSD_r ของ chlorate และ perchlorate มีค่าเท่ากับ 2.89-6.13 และ 3.01-6.75% ตามลำดับ ตามตารางที่ 10 การทดสอบความแม่นยำแบบการทำซ้ำได้ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกันด้วยเครื่อง LC-MS/MS 2 เครื่อง ที่ต่างรุ่นกัน พบว่า %RSD_{WR} ของสาร chlorate และ perchlorate มีค่าเท่ากับ 4.59-18.82 และ 5.46-15.13 ตามลำดับ ตามตารางที่ 11 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ ค่า %RSD_r และ %RSD_{WR} ≤ 20%

ตารางที่ 10 %MR และ %RSD_r ของการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate

Spiked level (µg/kg)	Chlorate (n=10)			Perchlorate (n=10)		
	conc.	%RSD _r	%MR	conc.	%RSD _r	%MR
30	22.58	2.89	75.28	24.77	3.01	82.56
50	39.70	5.00	79.40	41.17	6.65	82.34
70	53.63	6.13	76.62	54.43	5.38	77.76
100	76.08	4.64	76.08	78.05	6.75	78.05

ตารางที่ 11 %MR และ %RSD_{WR} ของการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate

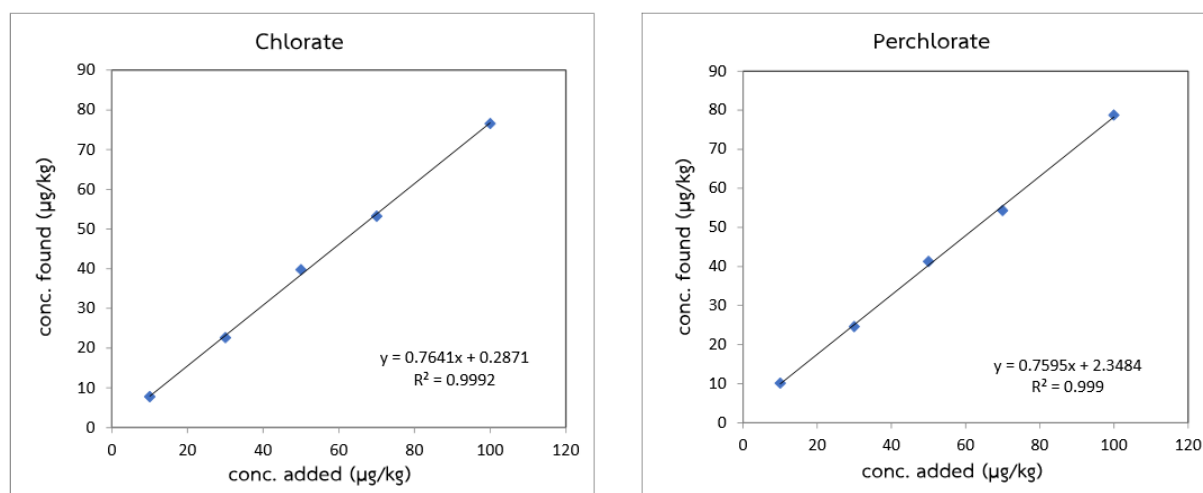
Spiked level (µg/kg)	Chlorate (n=10)					Perchlorate (n=10)				
	LC-MS/MS รุ่น TSQ Quantis		LC-MS/MS รุ่น TSQ Endura		%RSD _{WR}	LC-MS/MS รุ่น TSQ Quantis		LC-MS/MS รุ่น TSQ Endura		%RSD _{WR}
	conc.		conc.			conc.		conc.		
	%MR		%MR			%MR		%MR		
LOQ(10)	7.81	78.10	9.04	90.40	18.82	10.19	101.90	7.88	78.80	15.13
50	39.81	79.62	38.14	76.24	5.41	41.27	82.54	39.71	79.42	5.46
100	76.59	76.59	74.33	74.33	4.59	78.77	78.77	82.20	82.20	6.95

6. ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ พบว่า ค่า R^2 ของสาร chlorate และ perchlorate ใน spike sample เท่ากับ 0.9992 และ 0.9990 ตามลำดับ ตามตารางที่ 10 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ค่า $R^2 \geq 0.98$ แสดงว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีความเป็นเส้นตรงของช่วงวิเคราะห์ ตั้งแต่ความเข้มข้น 10–100 µg/kg ตามรูปที่ 7

ตารางที่ 10 Calibration curve, ค่า R^2 ของ working range

Compounds	Calibration curve	R^2
Chlorate	$Y=0.7641X+0.2871$	0.9992
Perchlorate	$Y=0.7595X+2.3484$	0.9990

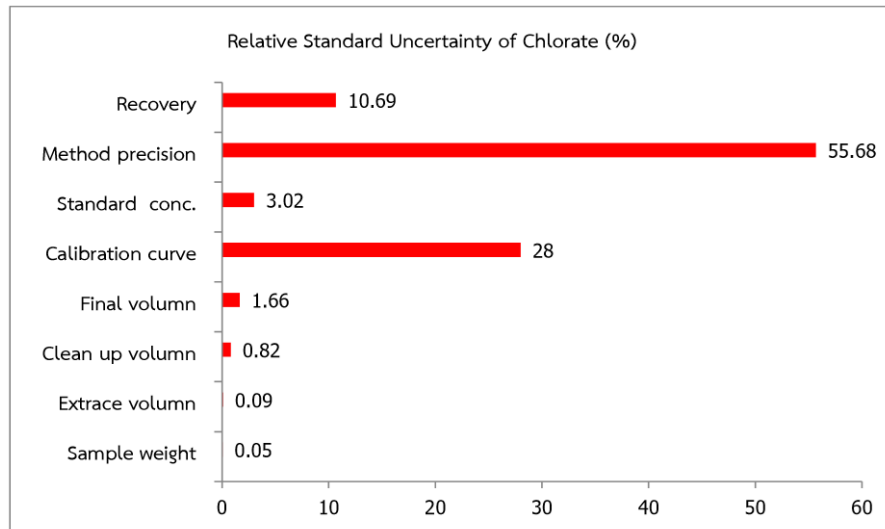


รูปที่ 7 Working range ของวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีก

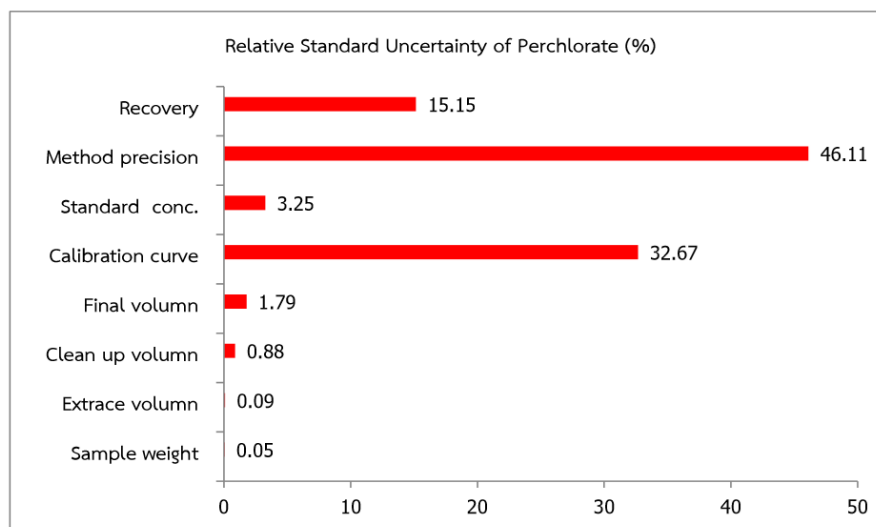
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ โดยการวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น 50 µg/kg ซึ่งเป็นระดับค่า MRL พบว่า ค่าความไม่แน่นอนของสาร chlorate มีค่าเท่ากับ 39.70 ± 7.1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ method precision (55.68%) calibration curve (28%) bias หรือ recovery (10.69%) standard concentration (3.02%) และองค์ประกอบอื่นๆ รวมกัน (2.62%) ดังแสดงในรูปที่ 8

ส่วนค่าความไม่แน่นอนของสาร perchlorate มีค่าเท่ากับ 41.20 ± 6.4 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ method precision (46.11%) calibration curve (32.67%) bias หรือ recovery (15.15%) standard concentration (3.25%) และองค์ประกอบอื่นๆ รวมกัน (2.81%) ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 8 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนที่มีผลต่อการวิเคราะห์สาร chlorate แสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละ



รูปที่ 9 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนที่มีผลต่อการวิเคราะห์สาร perchlorate แสดงอัตราส่วนเป็นร้อยละ

พิจารณาค่าความไม่แน่นอน Values of Measurement Uncertainty Estimates โดยใช้เกณฑ์จาก (CAC/GL 54-2004) กำหนดค่าความไม่แน่นอนที่คำนวณได้ความเข้มข้น $<100 \mu\text{g/kg}$ ต้องไม่เกิน 44% เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนของสาร chlorate และ perchlorate ความเข้มข้น $50 \mu\text{g/kg}$ ได้เท่ากับ 39.70 ± 7.1 และ 41.17 ± 6.4 คิดเป็น 17.88% และ 15.55% ซึ่งน้อยกว่าเกณฑ์ที่กำหนด วิธีวิเคราะห์นี้จึงเหมาะสมและสอดคล้องตามเกณฑ์การพิจารณาค่าความไม่แน่นอน

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในเนื้อสัตว์ปีกที่พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Zhang, Zheng *et al.* (2022) ด้วยการสกัดตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกด้วยน้ำปริมาตร 2 mL และ acetonitrile ปริมาตร 8 mL นำตัวอย่างไป ultrasonicated เป็นเวลา 15 min จากนั้น นำไป centrifuge เพื่อตกตะกอนเนื้อสัตว์ออก เติม hexane 5 mL เขย่าด้วยเครื่อง vortex นำตัวอย่างไป centrifuge เพื่อให้สารละลายตัวอย่างแยกชั้น เก็บสารละลายชั้นล่างนำไป clean-up โดยผ่าน SPE ชนิด MCX โดยทำการ condition SPE ด้วย acetonitrile 5 mL น้ำ 5 mL และ acetonitrile 5 mL ตามลำดับ จากนั้น ใส่สารละลายสกัดตัวอย่างปริมาตร 2 mL ลงใน SPE แล้ว elute SPE ด้วย acetonitrile ปริมาตร 3 mL นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไประเหยโดยไม่ใช้ความร้อน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 mL ด้วย 0.5% acetic acid ในน้ำ: methanol (95:5) กรองด้วย PTFE filter ขนาด 0.2 μm นำไปทดสอบด้วยเครื่อง LC-MS/MS ชนิด Triple Quadrupole

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาได้ มีความจำเพาะ ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ความแม่นยำ ความเที่ยงแบบการทวนซ้ำได้ ความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ LOD LOQ และช่วงการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สาร chlorate และ perchlorate ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ปีกโดยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับการตรวจสอบเฝ้าระวังสารพิษตกค้างของ กรมปศุสัตว์ ให้เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานระหว่างประเทศ หรือตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะการส่งออกเนื้อสัตว์ปีกไปยังสหภาพยุโรป ต้องเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน Regulation (EU) 2020/749

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

แม้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นจะมีประสิทธิภาพดี แต่ยังมีข้อสำคัญบางประการที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมคือ การทดสอบตัวอย่างทดสอบความชำนาญและการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนสาร chlorate และ perchlorate จริง ผู้วิจัยได้ตรวจสอบองค์กรผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing provider) ระดับนานาชาติแล้วพบว่า ยังไม่มีโปรแกรมทดสอบความชำนาญรายการทดสอบสารนี้ ซึ่งหากในอนาคตมีโปรแกรมทดสอบ ความชำนาญรายการนี้ ควรสมัครเข้าร่วมทดสอบเพื่อเป็นการประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ ส่วนการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนในตัวอย่างจริงนั้น เนื่องจากภายหลังจากที่สหภาพยุโรปได้ประกาศแจ้งเตือนการตรวจพบสาร chlorate ปัจจุบันตัวอย่างที่ส่งเข้าตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่ไม่พบการปนเปื้อน อาจเนื่องมาจากการตรวจสอบควบคุมตั้งแต่ต้นทาง และนอกจากนี้ ควรทดสอบ internal standard เพิ่มเติม จะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์โดยเฉพาะสำหรับตัวอย่างที่มีความซับซ้อน แต่หากไม่สามารถหาได้ อาจพิจารณาใช้สารอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงแทน สำหรับการพัฒนาในอนาคต ควรมีการขยายขอบเขตของวิธีวิเคราะห์ให้ครอบคลุมสารในกลุ่มเดียวกัน เช่น chlorite และ bromate โดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบ multi-residue ที่สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดพร้อมกัน ทั้งนี้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบความปลอดภัยอาหาร และควรนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนสาร chlorate และ perchlorate โดยจะต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางสาววิภาดา สิริสมภพชัย ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นายสรารุช ชูกระชั้น หัวหน้างานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน ที่ให้คำปรึกษา แนะนำการศึกษาใน ครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิต จากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Asha S. and Thiruvengkatachari V. 2009. Perchlorate: Health Effects and Technologies for Its Removal from Water Resources. *Int. J. Environ Res. Public Health*. Apr 14;6(4): 1418–1442. [online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2681191>. Accessed November 5, 2023.
- CAC/GL 40-1993. 2010. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis: apply and which is analyzed. Rome, Italy: Codex Alimentarius; 2010. p. 20.
- CAC/GL 54-2004. 2004. GUIDELINES ON MEASUREMENT UNCERTAINTY. pp 5. [online]. Available: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>. Accessed November 5, 2023.
- COMMISSION REGULATION (EU) 2020/749. 2020. Amending Annex III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorate in or on certain products 39-40. [online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2020/749/oj>. Accessed November 1, 2023.
- COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915. 2023. REGULATION of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006 (Text with EEA relevance). 51. [online]. Available: [online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>. Accessed November 5, 2023.
- DEPARTMENT of HEALTH AND HUMAN SERVICES. 2008. Public Health Statement Perchlorates. [online]. Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp162-c1-b.pdf>. Accessed November 1, 2023.
- Ellison SLR, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2012.
- Environmental Defense Fund. 2018. Perchlorate in food. [online]. Available: <https://www.edf.org/health/perchlorate-food>. Accessed November 2, 2023.
- Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics., Second edition. 2014. [online]. Available: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>. Accessed November 1, 2023.

- European Commission Directorate General for Health and Food Safety. 2024. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE 11312/2021 V2, Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024. [online]. Available: [https:// https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf). Accessed January 5, 2024.
- European Commission (EURL-SRM). 2023. Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-or IC-MS/MS Measurement. (QuPPE-Method) Version 12.1. pp 39-40.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Chlorate risk assessment [online]. Available: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/4135ax1.pdf>. Accessed October 2, 2023.
- Hepperle, J., Wolheim, A., Kolberg, D., Wildgrube, C., Kaufmann-Horlacher, I., Anastassiades, M. and Scherbaum, E. 2014. Analysis of Perchlorate in Food Samples of Plant Origin Applying the QuPPE-Method and LC-MS/MS. [online]. Available: https://www.cvuas.de/ejournal/docs/cvuas_ejournal_201302.pdf. Accessed October 2, 2023.
- Huadong, S., Xiangjie, P., Shuifeng, Z., Minfang, L., Yuanxu, S., Lulu, W. and Wenqi, L. 2020. Simultaneous Determination of Perchlorate, Chlorate and Bromate in Vegetables and Fruits by Modified QuEChERS Method Coupled with UPLC-MS/MS. [online]. Available: <https://engine.scichina.com/doi/pdf/79217CDF1875488FA54E588302DFD31A>. Accessed October 2, 2023.
- Mohammed, A., Ramadan, G., Abdelkader, A., Gadalla, S., Ayoub, M., Alabdulmalik, N. and AL Baker, W. 2020. Evaluation of method performance and matrix effect for 57 commonly used herbicides in some vegetable families using LC-MS/MS determination. [online]. Available: <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1815287>
- Reubi FC. 1978. Pathogenesis and renal function in acute toxic nephropathies. *Contrib. Nephrol.* 10:1-14. Available: <https://oehha.ca.gov/water/notification-level/proposed-action-level-chlorate>. Accessed November 10, 2023.
- Robert A. Howd. 2002. Proposed Action Level for Chlorate. [online]. Available: <https://oehha.ca.gov/water/notification-level/proposed-action-level-chlorate>. Accessed November 10, 2023.
- Tom Neltner. 2017. Too many young children get too much perchlorate from food. [online]. Available: <https://blogs.edf.org/health/2017/01/27/too-many-young-children-get-too-much-perchlorate-from-food/>. Accessed October 10, 2023.
- Xiaoli, F., Ruifen, L., Shuran, Y., Bingben, C. and Sanyan, Z. 2024. Simultaneous determination of chlorate and perchlorate in vegetables and fruits using ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. [online]. Available:

https://www.zgspws.com/zgspwszzen/article/abstract/202403007?st=article_issue. Accessed April 5, 2024.

Zhang, H., Feng, X., Liu, D., Wang, X., Wei, J. and Liu, H. 2022. A HILIC LC-MS/MS method for the determination of perchlorate and chlorate in coffee samples. [online]. Available:

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107822>. Accessed October 2, 2023.

Zhang, W., Lu, Q., Zheng, R., Qiu, W., Hua, Y. and Li, Y. 2022. Simultaneous determination of chlorate and perchlorate in drinking water and foods using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. [online]. Available: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2201547/v1>. Accessed October 2, 2023.