การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไพโรลิซิดีน อัลคาลอยด์ 21 ชนิด ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ไกรวุฒิ นวลขาว* **ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน** **ธาวิดา ม่วงไตรรัตน์**

บทคัดย่อ

ไพโรลิซิดีน อัลคาลอยด์ (PAs) เป็นเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่เป็นพิษ ซึ่งผลิตโดยพืชหลากหลายชนิด โดยมีอยู่ในสองรูปแบบ คือ tertiary amine (free base) และ N-oxide (PANOs) สารเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อตับ เป็นพิษต่อพันธุกรรม และเป็นสารก่อมะเร็งทั้งในสัตว์และมนุษย์ โดยสามารถตรวจพบได้ในอาหารที่ผลิตจากพืชและวัตถุดิบอาหารสัตว์รวมถึงน้ำผึ้งและอาหารสัตว์ ในการศึกษานี้ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ PAs/PANOs จำนวน 21 ชนิดในอาหารสุกร อาหารสัตว์ปีก อาหารโคนม และน้ำผึ้ง โดยใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) ร่วมกับเทคนิค reverse phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-LC-MS/MS) การสกัดตัวอย่างใช้สารละลาย เมทานอล:น้ำ:กรดฟอร์มิก (60:39.6:0.4, v/v/v) สำหรับอาหารสัตว์ ส่วนน้ำผึ้งใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก ขั้นตอน clean-up ใช้เทคนิค SPE ชนิด Oasis prime HLB สำหรับอาหารสัตว์ และ Oasis MCX สำหรับน้ำผึ้ง วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 V2 ได้ค่าการคืนกลับที่ความเข้มข้น 2, 8 และ 40 µg/kg สำหรับอาหารสัตว์ 0.8, 3.2 และ 16 สำหรับน้ำผึ้ง อยู่ในช่วง 71.3%–116.3% และค่าการทำซ้ำโดยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 15.5% สำหรับทุกสารและเมทริกซ์ การประเมินความไวและช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์พบว่าค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจากความเข้มข้นจริงอยู่ในช่วง –13.7% ถึง 0.02% โดยมีค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.4 µg/kg สำหรับน้ำผึ้ง และ 1.0 µg/kg สำหรับอาหารสุกร อาหารสัตว์ปีก และอาหารโคนม ค่าความไม่แน่นอนขยายอยู่ระหว่าง 10.9%–49.7% ตามลำดับ วิธีที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้นี้ถูกนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารสัตว์ 63 ตัวอย่าง และน้ำผึ้ง 38 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ PAs/PANOs อย่างน้อยหนึ่งชนิดคิดเป็น 93% ของอาหารสัตว์ และพบการปนเปื้อนทุกตัวอย่างในน้ำผึ้ง

คำสำคัญ: ไพโรลิซิดีน อัลคาลอยด์ LC-MS/MS อาหารสัตว์ น้ำผึ้ง

เลขทะเบียนวิชาการ: 69(2)-0304-010

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

*ผู้รับผิดชอบ, e-mail: kraiwut.n@dld.go.th

Method development and validation for simultaneous determination of 21 pyrrolizidine alkaloids in animal feeds and honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Kraiwut Nualkaw* Chusak Ardsoongnearn Thawida Muangtrairat

Abstract

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are toxic secondary metabolites produced by various plant species. They occur in two forms: the tertiary amine (free base) and the N-oxide (PANOs) form. PAs are potentially hepatotoxic genotoxic and carcinogenic to animal and humans, have been detected in plant-derived food and feed materials, including honey and animal feed. This study developed and optimized a novel method for the simultaneous determination of 21 PAs/PANOs in swine, poultry, dairy feed and honey using solid-phase extraction (SPE) coupled with reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-LC-MS/MS). Sample extraction was performed using methanol: water: formic acid (60:39.6:0.4, v/v/v) for animal feeds and sulfuric acid for honey. Cleanup was carried out using Oasis prime HLB SPE cartridges for animal feeds and Oasis MCX SPE cartridges for honey. Method validation followed the SANTE 11312/2021 V2 guidelines. Average recoveries at concentrations of 2, 8 and 40 µg/kg for feedstuffs and 0.8, 3.2 and 16 µg/kg for honey ranged from 71.3% to 116.3%, with repeatability (expressed as %RSD) below 15.5% for all analyte/matrix combinations. Sensitivity and linearity assessments showed back-calculated concentration deviations between –13.7% and 0.02%, with limits of quantification (LOQs) for individual analytes at 0.4 µg/kg for honey and 1.0 µg/kg for swine poultry and dairy feed, respectively. Expanded uncertainties ranged from 10.9% to 49.7%. The validated method was applied to 63 feedstuffs and 38 honey samples, revealing contamination with at least one PA/PANO in 93% of feedstuffs and all honey samples.

Keyword: Pyrrolizidine alkaloids, LC-MS/MS, Feeds, Honey

Scientific No.: 69(2)-0304-010

Bureau of Quality Control of Livestock Products, Tiwanon Rd., Bangkadi, Mueng, Pathum Thani, 12000 *Corresponding author, e-mail: kraiwut.n@dld.go.th

บทนำ

ไพโรลิซิดีน อัลคาลอยด์ (pyrrolizidine alkaloids; PAs) เป็นสารพิษที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในพืชต่างๆ ทั่วโลกมากกว่า 6,000 ชนิด คิดเป็น 3% ของพืชดอกทั้งหมด ได้แก่ กลุ่มพืชดอก (angiosperm) ในวงศ์ *Boraginaceae* ทุกสกุล ในวงศ์ *Asteraceae* จะพบได้ในเผ่า *Senecioneae* และ *Eupatorieae* และ ในส่วนของสกุล *Crotalaria* จะพบในเผ่า *Fabaceae* (Smith and Culvenor, 1981) สารพิษ PAs จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืชเพื่อใช้เป็นกลไกในการป้องกันตัวจากสัตว์กินพืชและแมลง ใน 2 รูปแบบ ได้แก่ PAs ในรูป tertiary amine (free base) และ pyrrolizidine alkaloids N-oxide (PANOs) สาร PAs/PANOs ไม่เป็นอันตรายต่อพืช แต่สามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ได้ หากได้รับสารดังกล่าวในปริมาณที่สูง หรือได้รับเป็นเวลานาน (EURL-MP-method_002 V3, 2019)

การศึกษาความเป็นพิษอันเนื่องมาจากสาร PAs พบว่าทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxicity) ทั้งในมนุษย์และในสัตว์ (Wiedenfeld and Edgar, 2011) โดยสารเมทาบอไลต์ที่เป็นพิษจากสาร PAs สามารถรบกวนการทำลายของเซลล์ตับนำไปสู่การเกิดการอักเสบของตับ พังผืด ภาวะตับอุดตัน hepatic veno-occlusive disease (HVOD) และการพัฒนาเป็นมะเร็งได้ (Chen and Huo, 2010) องค์กรวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research of Cancer, IARC) ได้จัดให้ PAs เป็นสามารถก่อมะเร็ง (carcinogenicity) ได้ในหนูทดลอง (IARC, 2002) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อพันธุกรรม (genotoxicity) ในสัตว์ทดลอง (Fu *et al*, 2004; Chen *et al*., 2010)

ในสัตว์การสัมผัสกับสารพิษกลุ่ม PAs เมื่อสัตว์กินอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อนสารพิษ โดยชนิดของ PAs ที่มักพบปนเปื้อนในอาหารสัตว์ ได้แก่ senecionine (Sn), seneciphylline (Sp), erucifoline (Er), monocrotaline (Mc), trichodesmine (Td), heliotrine (Ht), indicine (Id), intermedine (Im) และ lycopsamine (Ly) เป็นต้น (EFSA, 2007) โดยในระหว่างปี 2006-2010 ได้มีการสำรวจการปนเปื้อนสารกลุ่ม PAs ในอาหารสัตว์ 7 กลุ่มตามวัตถุดิบที่นำมาผลิต จำนวน 351 ตัวอย่าง จากกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป ด้วยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) พบว่า 85% พบการปนเปื้อนของ Sn และ 10% สำหรับ Sp ในกลุ่มอาหารหยาบและพืชอาหารสัตว์ (forage and roughage) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อน Ly ในอาหารสัตว์กลุ่มที่ใช้เมล็ดพืชน้ำมัน (oil seed) เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งมีการนำเข้ามาจากประเทศนอกสหภาพยุโรป ในอีกด้านหนึ่งสำหรับกลุ่มอาหารสัตว์ที่มีการผสมสมุนไพร (herbal feed additives) พบการปนเปื้อนที่สำคัญของ Ht 70% ของตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ แต่อย่างไรก็ดีข้อมูลของอุบัติการณ์การปนเปื้อนก็ยังไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ความเสี่ยงในการสัมผัส PAs สำหรับสัตว์ (EFSA, 2011)

น้ำผึ้งเป็นหนึ่งในอาหารที่พบการปนเปื้อน PAs/PANOs โดยเป็นการปนเปื้อนทางอ้อมจากน้ำหวาน (floral nectar) และเกสร (pollen) (Edga *et al.*, 2011) เกิดจากเมื่อผึ้งไปสัมผัสกับเกสรหรือน้ำหวานจาก

พืชดอกบางชนิด ได้แก่ *Heliotropium, Crotolaria, Echium* และ *Senecio* ที่สร้างสารพิษ PAs (Beales *et al*., 2004) โดยองค์การความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority, EFSA) ได้สำรวจตัวอย่างน้ำผึ้งถังรวม (bulk honey) 13,280 ตัวอย่าง และ น้ำผึ้งขายปลีก (retail honey) 1,324 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบการปนเปื้อน PAs ชนิด Ly และ echimidine (Em) มากกว่า 80% และ 79% ใน bulk honey และ retail honey ตามลำดับ สำหรับ bulk honey พบการปนเปื้อนสูงสุดของ PAs ชนิด echimidine-N-oxide (EmNO) ที่ 2,031 µg/kg, Em ที่ 1,522 µg/kg, Ly ที่ 1,448 µg/kg และ seneciphylline-N-oxide (SpNO) ที่ 1,441 µg/kg ตามลำดับ แต่สำหรับ retail honey พบการปนเปื้อนสูงสุดที่ต่ำกว่า bulk honey โดยพบ Em ที่ 150 µg/kg, Ly ที่ 126 µg/kg และ echiuplatine (Ep) ที่ 115 µg/kg ตามลำดับ (EFSA, 2011) ทั้งนี้ Machan *et al.* (2006) ได้รายงานการศึกษาประโยชน์จากหญ้างวงช้าง (*Heliotropium indicum* Linn.) ที่แพร่กระจายในจังหวัดพิษณุโลก เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันระเหยจากหญ้างวงช้าง โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านวัณโรค อย่างไรก็ดี Sauza *et al.* (2005) ได้เคยรายงานการพบ PAs ไว้ในพืชชนิดนี้

การตรวจวิเคราะห์สาร PAs ใช้เทคนิค LC-MS/MS เนื่องจากมีความไว (sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ในการตรวจวิเคราะห์สูง โดยเทคนิคนี้ใช้การตรวจวัดมวลต่อประจุของไอออน ทำให้สามารถตรวจยืนยันชนิด (qualification) และปริมาณ (quantification) สารพิษในระดับต่ำๆ ได้อย่างถูกต้อง ร่วมกับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), SPE (solid phase extraction) และ dilute and shoot (DnS) ในการวิเคราะห์ PAs ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง (Mol *et al*., 2008; Dzuman *et al*., 2015; Kowalczyk and Kwiatek, 2018; Dzuman *et al*., 2020; Dreolin *et al.*, 2022)

เทคนิค QuEChERS ที่มีขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile: water ตามด้วย salting-out ให้สารที่จะวิเคราะห์ (analytes) อยู่ในส่วนของ acetonitrile phase เพื่อดึงสิ่งสกัดที่มีขั้วออกจากตัวอย่าง (polar matrix co-extract) โดยพบรายงานการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง ยาสัตว์ตกค้าง สารพิษจากเชื้อรา และสารพิษจากพืช (Anastassiades *et al*., 2003; Mol *et al*., 2008; Dzuman *et al*., 2015)

โดย Mol *et al.* (2008) ใช้เทคนิค QuEChERS มาใช้วิเคราะห์ยาสัตว์ สารกำจัดศัตรูพืช สารพิษจากเชื้อรา และสารพิษจากพืช กลุ่ม PAs/PANOs 9 ชนิด ได้แก่ Mc, Sn, Sp, SpNO, Ht, Sk, RtNO, ScNO และ Rt ในตัวอย่างอาหารสัตว์ ข้าวโพด ไข่ เนื้อ นม โดยใช้ sodium acetate buffer ในขั้นตอน salting-out ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) นอกจากนี้พบการใช้เทคนิค QuEChERS ในการวิเคราะห์ PAs 11 ชนิด ในตัวอย่างข้าวสาลี ต้นหอม และใบชา โดยเพิ่มการแช่ตัวอย่างด้วย 0.2% formic acid เป็นเวลา 30 นาที ก่อน

สกัดตัวอย่างด้วย 100% acetonitrile และใช้ dispersive solid phase extraction (dSPE) ชนิด C18 ในขั้นตอน clean up ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) โดยใช้กราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณแบบ matrix matched calibration (Dzuman *et al*., 2015)

เทคนิค DnS โดยสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อแยก analyte ออกจากตัวอย่างไปที่ตัวทำละลาย จากนั้นทำการเจือจาง (dilution) ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ (Greer *et al*., 2021) ซึ่งพบการใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับสารตกค้างแบบหลายชนิด (multi-residue analysis) โดยพบการใช้เทคนิค DnS สำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOS จำนวน 33 ชนิด ในธัญพืช เครื่องเทศ และชาสมุนไพร โดยสกัดตัวอย่างด้วย 60: 39.6: 0.4, methanol: water: formic acid (v/v/v) เป็นเวลา 30 นาที และใช้ dSPE ชนิด C18 ในขั้นตอน clean up ตัวอย่าง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Dzuman *et al*., 2020)

เทคนิค SPE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนสกัดตัวอย่างสำหรับตัวอย่างของเหลว (liquid sample) และ การทำให้บริสุทธิ์ (clean up) หลังจากการสกัดตัวอย่างของแข็ง (solid sample) สำหรับการวิเคราะห์ PAs/PANOs พบรายงานการใช้ SPE ชนิด C18 ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs 28 ชนิด ในวัตถุดิบจากพืช สมุนไพร อาหารสัตว์ และใช้ SPE ชนิด strong cation exchange (SCX) สำหรับตัวอย่างน้ำผึ้ง ร่วมกับการสกัดตัวอย่างด้วย 0.05 M sulfuric acid ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS (BfR-PAs-Honey-1.0/2013, 2013; BfR-PAs-Tea-2.0/2014, 2014) นอกจากนี้ยังพบการใช้ SPE ชนิด mixed mode polymeric (MCX) ระหว่าง cation sulfonic acid group กับ hydrophilic lipophilic balance (HLB) ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs 35 ชนิด ในอาหารที่ผลิตจากพืช (plant based food) และในน้ำผึ้ง (Dreolin *et al*., 2022)

สำหรับประเทศไทยไม่พบรายงานการศึกษาอุบัติการณ์การปนเปื้อนและวิธีวิเคราะห์สารพิษจากพืชกลุ่ม PAs ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในสินค้าปศุสัตว์ เห็นถึงความสำคัญที่ต้องดำเนินการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีเพื่อใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับศึกษาอุบัติการณ์การปนเปื้อน การเฝ้าระวัง และควบคุมการปนเปื้อน สารพิษจากพืชกลุ่ม PAs/PANOs และรองรับกิจกรรมการตรวจวิเคราะห์ของกรมปศุสัตว์ ได้แก่ กิจกรรม พรบ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ด้านมาตรฐานอาหารสัตว์ กิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปี (residue monitoring plan) และกิจกรรมมาตรฐานฟาร์มผึ้ง ในอนาคตได้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากพืชกลุ่ม PAs/PANOs 21 ชนิด ได้แก่ Im, Ly, intermedine-N-oxide (ImNO), lycopsamine-N-oxide (LyNO), senecionine (Sn), senecivernine (Sv), senecionine-N-oxide (SnNO), senecivernine-N-oxide (SvNO), Sp, SpNO, retrorsine (Rt), retrorsine-N-oxide (RtNO), Em, EmNO, lasiocarpine (Lc), lasiocarpine-N-oxide (LcNO), senkirkine (Sk), europine (Eu), europine-N-oxide (EuNO), Ht และ heliotrine-N-oxide

(HtNO) โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ PAs/PANOs ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เปรียบเทียบเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ QuEChERS, SPE และ DnS ในตัวอย่างอาหารสัตว์โดยใช้อาหารสุกรเป็นตัวแทน และในตัวอย่างน้ำผึ้ง ซึ่งคณะกรรมมาธิการยุโรปได้กำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อน (maximum level, ML) ที่ 500 µg/kg ของผลรวมของ PAs/PANOs 21 ชนิด ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนประกอบหลักจากเกสรและผลิตภัณฑ์จากเกสร (European commission, 2023) แต่ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาอุบัติการณ์การปนเปื้อนและวิธีวิเคราะห์สารพิษจากพืชกลุ่ม PAs/PANOs ทั้งในอาหารสัตว์และน้ำผึ้งในประเทศไทย

สำหรับการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ในอาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีก และน้ำผึ้ง ดำเนินการตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 V2 (European commission, 2024) โดยทดสอบตามพารามิเตอร์ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ขีดจำกัดตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์แบบ repeatability และ within-laboratory reproducibility และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ เมื่อวิธีผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้วิธีแล้ว จะเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของ PAs/PANOs

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี :

- Methanol (MeOH), ammonium formate (AmF), formic acid (FA), acetonitrile (ACN), LC-MS และ HPLC grade
- Sulfuric acid (H_2SO_4), magnesium sulfate ($MgSO_4$), sodium chloride (NaCl), triethylamine (TEA), ethyl acetate (EtAc), ammonium hydroxide (NH_4OH), Zinc dust (Zn), AR grade
- น้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI water) มีความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18 MΩ.cm

สารมาตรฐาน (standard) : เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง

- สารละลายมาตรฐานผสม pyrrolizidine alkaloids 21 ชนิด ความเข้มเข้น 100 µg/mL in methanol ยี่ห้อ LGC

Solid Phase Extraction (SPE):

- Oasis HLB ปริมาณ 200 mg ปริมาตร 6 mL ยี่ห้อ Waters
- Oasis MCX ปริมาณ 150 mg ปริมาตร 6 mL ยี่ห้อ Waters
- Oasis prime HLB ปริมาณ 150 mg ปริมาตร 3 mL ยี่ห้อ Waters
- Strata-X Polymeric ปริมาณ 200 mg ปริมาตร 6 mL ยี่ห้อ Phenomenex

QuEChERS extraction kits และ Dispersive Solid Phase Extraction (dSPE) sorbent:

- R0Q extraction kit EN 15662 methods (4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g Sodium Citrate Tribasic Dihydrate (SCTD), 0.5 g Sodium Citrate Dibasic Sesquihydrate (SCDS)) ยี่ห้อ Phenomenex
- Bondesil C18 sorbent ยี่ห้อ Agilent
- PSA sorbent ยี่ห้อ Agilent
- Carbon SPE sorbent ยี่ห้อ Agilent

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น Nexera LC-40D X3 และ ยี่ห้อ Sciex รุ่น Triple Quad 7500
- HPLC column Kinetex EVO C18, 2.6 µm, 2.1 x 150 mm ยี่ห้อ Phenomenex

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างอาหารสุกร อาหารสัตว์ปีก อาหารโคนมและน้ำผึ้งที่ไม่พบการปนเปื้อน PAs/PANOs และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ mass spectrometer (optimized MS/MS)

เตรียมสารมาตรฐาน PAs/PANOs 21 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL ใน 5% MeOH ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรงแบบ direct infusion โดยเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive ionization) เพื่อหาค่าพลังงาน collision energy (CE), declustering potential (DP), entrance potential (EP) และ ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion และ product ion ที่ให้สัญญาณสูงสุดในการวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM)

4.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารด้วย RPLC (optimized reverse phase liquid chromatography)

ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ PAs/PANOs ด้วยเทคนิค RPLC-MS/MS โดยทำการเปรียบเทียบสภาวะการแยกของ HPLC ตามแนวทางของ Putz *et al.* (2021) และสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยทดสอบโดยใช้คอลัมน์ Kinetex EVO C18, 2.6 µm, 2.1 x 150 mm และ mobile phase (MP) คือ 5 mM AmF with 0.1% FA in DI water (MPA) และ 5 mM AmF with 0.1 FA in MeOH (MPB) ด้วยการฉีดสารมาตรฐาน PAs/PANOs 21 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.64 ng/mL เปรียบเทียบการแยกของโครมาโทแกรม (chromatogram) และความเข้มของสัญญาณพีค (peak signal intensity) จากนั้นเลือกสภาวะที่เหมาะสมและทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 และ 1.6 ng/mL ประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995 ($r \geq 0.995$) (สุจิตตรา, 2555) รายละเอียดสภาวะที่ทำการทดสอบตาม**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 HPLC condition และ column สำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs

Parameters	Conditions	
	Putz *et al.*, 2021	**สภาวะที่พัฒนาขึ้น**
HPLC column	Kinetex EVO C18, 2.6 µm, 2.1 x 150 mm	
Flow rate	0.35 mL/min	0.4 mL/min
Injection volume	2.0 µL	2.0 µL
Column oven	35 °C	40°C
Elution mode	gradient elution	gradient elution
	Initial 0-0.5 min 5% B; 7 min 50% B; 12-15 min 95% B; 16.0-24.0 min 5% B	Initial 0.0 min 0% B; 0.1-6.5 min 5% B; 10 min 25% B; 12 min 40% B; 12.1-15.0 min 100 %B; 15.1-19.0 min 0%B
Run time	24 min	19 min

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่าง

อาหารสุกร

Method A: DnS with dSPE clean-up (Dzuman *et al*., 2020)

ชั่งตัวอย่าง 2 ± 0.02 g เติม 20 mL ของ (MeOH: DI water: FA, 60:39.6:0.4, V/V/V) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยงไปกรองด้วย microfiber filter ขนาด 0.22 µm แล้วนำสิ่งกรองปริมาตร 2 mL ผ่าน dSPE C18 sorbent ปริมาณ 0.1 g แล้วเขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 ºC และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5% MeOH กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE ขนาด 0.22 µm และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Method B: QuEChERS (Dzuman *et al*., 2015)

ชั่งตัวอย่าง 2 g เติม 10 mL ของ 0.2% FA แช่ทิ้งไว้ 30 นาที เติม 10 mL ของ 100% ACN เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที เติมเกลือ $MgSO_4$ 4 g + NaCl 1 g เขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 2 mL ผ่าน dSPE C18 sorbent 0.1 g + $MgSO_4$ 0.3 g แล้วเขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับ method A

Method C: SPE Polymeric Strata-X (EURL-MP-method_002 V3, 2019)

ชั่งตัวอย่าง 2 ± 0.05 g เติม 40 mL ของ 2% FA เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 5 mL ผ่าน SPE Strata-X ซึ่งผ่านการ condition ด้วย MeOH ปริมาตร 6 mL และ DI water ปริมาตร 6 mL จากนั้นล้าง SPE ด้วย 1% FA ปริมาตร 6 mL ตามด้วย DI water ปริมาตร 6 mL จากนั้น elute ตัวอย่าง ด้วย MeOH ปริมาตร 6 mL จากนั้นนำ eluate ไประเหยแห้งเช่นเดียวกับ method A

Method D: SPE Oasis Prime HLB ดัดแปลงจาก (Dreolin *et al*., 2021)

ชั่งตัวอย่าง 2 ± 0.02 g เติม 25 mL ของ (MeOH: DI water: FA, 60:39.6:0.4, V/V/V) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 0.4 mL (ครั้งที่ 1) ผ่าน SPE ทิ้ง จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 1.2 mL (ครั้งที่ 2) ผ่าน SPE จากนั้นนำ eluate ปริมาตร 0.5 mL เจือจางด้วย 0.5 mL ของ 5% MeOH กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE ขนาด 0.22 µm และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

น้ำผึ้ง

Method E: QuEChERS (Kempf *et al*., 2011)

ชั่งตัวอย่าง 2 g เติม 10 mL ของ DI water เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เติมเกลือ QuEChERS extraction kits EN15622 และ 10 mL ของ 100% ACN เขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 6 นาที นำส่วนใสปริมาตร 4 mL ผ่าน dSPE sorbent ($MgSO_4$ 0.9 g + PSA 0.15 g) แล้วเขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 6 นาที นำส่วนใสไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 ºC และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5% MeOH กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE ขนาด 0.22 µm และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Method F: QuEChERS (Martinello *et al*., 2014)

ชั่งตัวอย่าง 2.5 g เติม 10 mL ของ 5 mM H_2SO_4 และ 1 g ของ Zn dust เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 90 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 5 นาที เติมเกลือ QuEChERS extraction kits EN15622 และ 10 mL ของ 100% ACN เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 8 mL ผ่าน dSPE sorbent ($MgSO_4$ 0.9 g + PSA 0.15 g + carbon 0.045 g) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 ºC และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5% MeOH กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE ขนาด 0.22 µm และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Method G: SPE Oasis MCX (Dreolin *et al*., 2022)

ชั่งตัวอย่าง 2 ± 0.02 g เติม 20 mL ของ 50 mM H_2SO_4 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่างแนวราบที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 1 mL ผ่าน SPE Oasis MCX ซึ่งผ่านการ condition ด้วย MeOH ปริมาตร 3 mL และ DI water ปริมาตร 3 mL จากนั้นล้าง SPE ด้วย DI water ปริมาตร 6 mL ตามด้วย MeOH ปริมาตร 6 mL แล้วทำการ elute ตัวอย่าง ด้วย EtAc: MeOH: ACN (80:10:10, v/v/v) ที่มี 1% NH_4OH และ 1% TEA ปริมาตร 6 mL นำ eluate ไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 ºC และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5% MeOH กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE ขนาด 0.22 µm และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Method H: SPE Oasis MCX ดัดแปลงจาก (Dreolin *et al*., 2022)

ดำเนินการเช่นเดียวกับ method G แต่ใช้ MeOH ปริมาตร 2 mL ตามด้วย 50 mM H_2SO_4 ปริมาตร 5 mL สำหรับ condition SPE และ elute ตัวอย่าง ด้วย EtAc: MeOH: ACN (80:10:10, v/v/v) ที่มี 0.25% NH_4OH และ 1% TEA ปริมาตร 6 mL

การทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างทำโดยการทดสอบ spike sample จำนวนชนิดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 8 µg/kg สำหรับอาหารสุกร และ 6.4 µg/kg สำหรับน้ำผึ้ง คำนวณผลด้วย external calibration standard (ECS) แบบ solvent calibration curve (SCC) โดยคำนวณค่าการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พิจารณาเกณฑ์การประเมิน %MR อยู่ระหว่าง 70-120 และ %RSD ≤ 20 ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024)

5. การพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์

5.1 การตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน PAs/PANOs 21 ชนิด แบบ SCC ในตัวทำละลาย 5% MeOH ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 และ 1.6 ng/mL เปรียบเทียบกับในสิ่งสกัดอาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีก และน้ำผึ้ง เตรียมโดยเติมสารมาตรฐานแบบ matrix-match calibration (MMC) หลังจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (post spike) โดยประเมินผล matrix effect จากค่า % signal suppression and enhancement (%SSE) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายจากการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่มีสภาวะของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ดีที่สุด ซึ่งค่าการยอมรับอยู่ระหว่าง 80-120% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024)

$$\%SSE = \frac{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย}} \times 100 \qquad \textbf{สมการที่ 1}$$

5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

ทดสอบโดยสร้างกราฟมาตรฐานในตัวละลายที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 และ 1.6 ng/mL โดยกราฟมาตรฐานจะสร้างระหว่างแกน y คือ area ของ PAs/PANOs และ แกน X คือความเข้มข้นของ PAs/PANOs ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (y = mx + c) และประเมินจากค่า %deviation of back-calculated concentration โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นจริง (C_{True}) เทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ ($C_{Measured}$) ของสารมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้นต้องผิดพลาดไม่เกิน ±20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2) (European commission, 2024)

Deviation of back-calculated concentration (%) = $(C_{Measured} - C_{True}) \times 100/C_{True}$ **สมการที่ 2**

5.3 การทดสอบค่า LOD และ LOQ

ทำการทดสอบเพื่อหาค่า LOD โดยการเติมสารมาตรฐาน PAs/PANOs จำนวน 10 ซ้ำ ในน้ำผึ้งที่ความเข้มข้น 0.1 µg/kg และในตัวอย่างอาหารสุกร อาหารโคนม และอาหารสัตว์ปีกที่ความเข้มข้น 0.5 µg/kg โดยใช้เกณฑ์ S/N ≥ 3

สำหรับการหาค่า LOQ ทำการเติมสารมาตรฐานจำนวน 10 ซ้ำ ในน้ำผึ้งที่ความเข้มข้น 0.4 µg/kg และในตัวอย่างอาหารสุกร อาหารโคนม และอาหารสัตว์ปีกที่ความเข้มข้น 1.0 µg/kg โดยใช้เกณฑ์ S/N ≥ 10, ค่า %MR อยู่ในช่วง 70–120% และ RSD ≤ 20% ตามตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 V2 (European Commission, 2024)

5.4 การทดสอบความแม่นและความเที่ยง

ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน PAs/PANOs ที่ระดับความเข้มข้น 0.8, 3.2 และ 16 µg/kg สำหรับน้ำผึ้ง และทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 8.0 และ 40 µg/kg สำหรับอาหารสุกร อาหารโคนมและอาหารสัตว์ปีก ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จำนวน 2 ชุด ทดสอบต่างวัน ต่างผู้วิเคราะห์ ประเมินความแม่นพิจารณาค่า %MR และความเที่ยงพิจารณาจาก %RSD ของแต่ละระดับความเข้มข้น เกณฑ์ %MR อยู่ระหว่าง 70-120% และ RSD ≤ 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2) (European commission, 2024)

5.5 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของ PAs/PANOs ที่ค่า LOQs ตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 จากนั้นคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U') ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) = 2 เกณฑ์กำหนดให้ค่า U'(expanded MU, %) มีค่าไม่เกิน 50% SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024)

6. เข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการรายการ pyrrolizidine alkaloids in honey รหัสตัวอย่าง 22238 จากหน่วยงานผู้จัด FAPAS ประเมินผลจากค่าสถิติ z-score โดยเกณฑ์การตัดสิน คือ $|z| \leq 2$ แสดงว่าผลการทดสอบนั้นยอมรับได้ (satisfactory)

7. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ตัวอย่างอาหารสุกร อาหารโคนม และอาหารสัตว์ปีก จากกิจกรรมเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปี กิจกรรมตรวจตาม พรบ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ และตัวอย่างน้ำผึ้งจากห้างสรรพสินค้าในจังหวัดนนทบุรีและปทุมธานี รวม 101 ตัวอย่าง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

ทำการหา precursor ion ที่เหมาะสมของ PAs/PANOs 21 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL โดยทำ precursor ion scan ที่ช่วง 300-450 m/z ที่ให้ intensity สูงสุด ของ PA แต่ละชนิด จากนั้นทำการหา product ion โดยใช้ค่า m/z ของ precursor ion ที่ให้ intensity สูงสุด และทำ product ion scan โดยในการหา precursor ion และ product ion ที่เหมาะสมทำภายใต้สภาวะแบบ ESI ใน positive mode ตาม **ตารางที่ 2**

เมื่อได้ค่า m/z ของ precursor และ product ion ที่เหมาะสม จากนั้นทำการหาสภาวะของ MRM transitions สำหรับการวิเคราะห์ PAs/PANOs โดยหาค่าพลังงาน collision energy (CE), dwell time และ collision cell exit potential (CXP) โดยค่าพลังงานที่หาได้รายละเอียดตาม**ตารางที่ 3**

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

parameters	values
Ion Source	ESI (+)
Ion spray voltage	1.5 kV
Source temperature	600 °C
Curtain gas	40 psi
CAD gas	9
Ion source gas 1	55 psi
Ion source gas 2	55 psi

ตารางที่ 3 MRM transitions ของ PAs/PANOs

PAs/PANOs	Precursor ion (m/z)	Product ion_1 (m/z)*	CE_1 (V)	CXP_1 (V)	Product ion_2 (m/z)**	CE_2 (V)	CXP_2 (V)	Dwell time (ms)	RT (min)
Im	300	138	27	7	94	36	6	112.9	3.6
Ly	300	94	36	13	156	38	20	88.7	3.8
Eu	330.1	138.1	31	15	254.1	27	19	80.4	4.0
EuNO	346	172	42	13	111	61	10	54.9	4.8
ImNO	316	172	37	9	138	40	9	48.5	5.1
LyNO	316	172	37	11	138	36	7	45.8	5.4
Rt	352	324	37	19	120	43	17	41.4	6.6
Ht	314	138	30	9	156	39	9	39.1	7.4
Sp	334	306	36	25	120	36	9	39.1	7.5
RtNO	368	118	43	8	120	48	7	39.1	7.7
HtNO	330.1	171.1	37	12	111.1	57	9	40.0	8.8
SpNO	350	120	39	6	138	38	17	40.0	8.9
Sv	336	120	37	20	308	39	13	41.5	9.3
Sn	336.1	120.1	39	10	138.1	40	12	41.5	9.6
SvNO	352	118	42	16	120	46	7	53.8	10.0
SnNO	352	120	40	7	118	44	7	50.3	10.4
Em	398	120	34	12	220	24	20	71.6	11.3
Sk	366	168	39	17	150	38	9	77.4	11.4
EmNO	414	254	43	17	352	35	16	77.4	11.5
Lc	412	120	38	9	336	26	23	148.3	12.1
LcNO	428	254	40	30	94	69	12	250	12.4

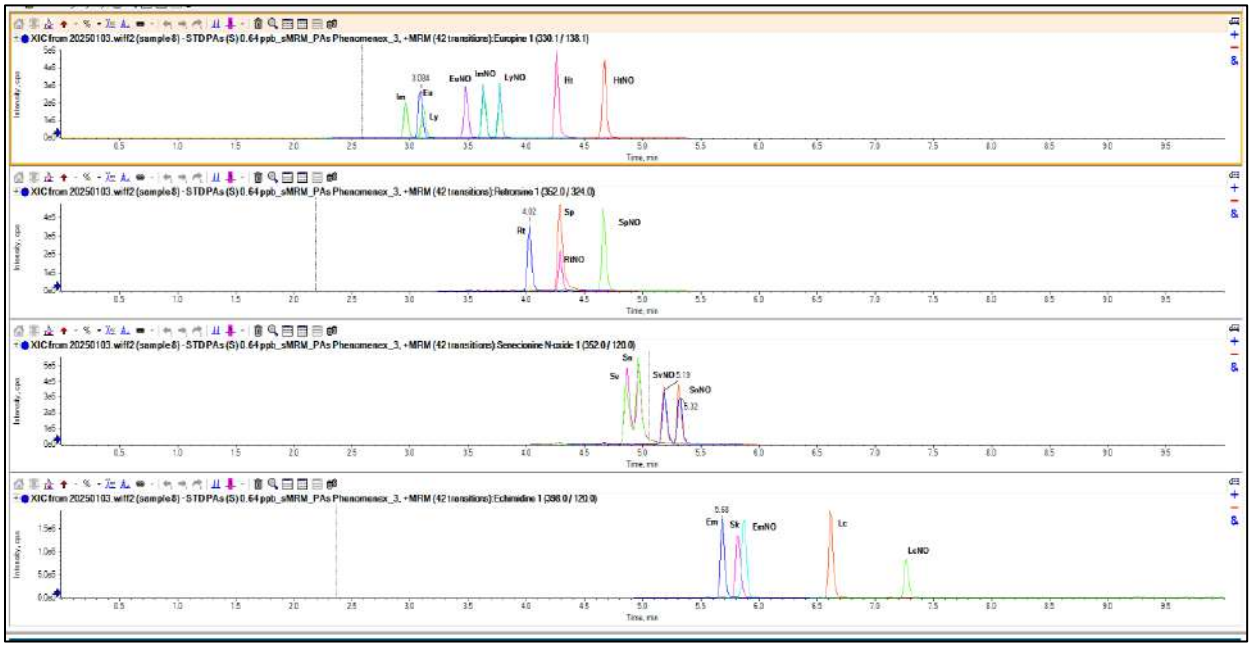
หมายเหตุ * = Quantifier, ** = Qualifier

1.2 สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ PAs/PANOs ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

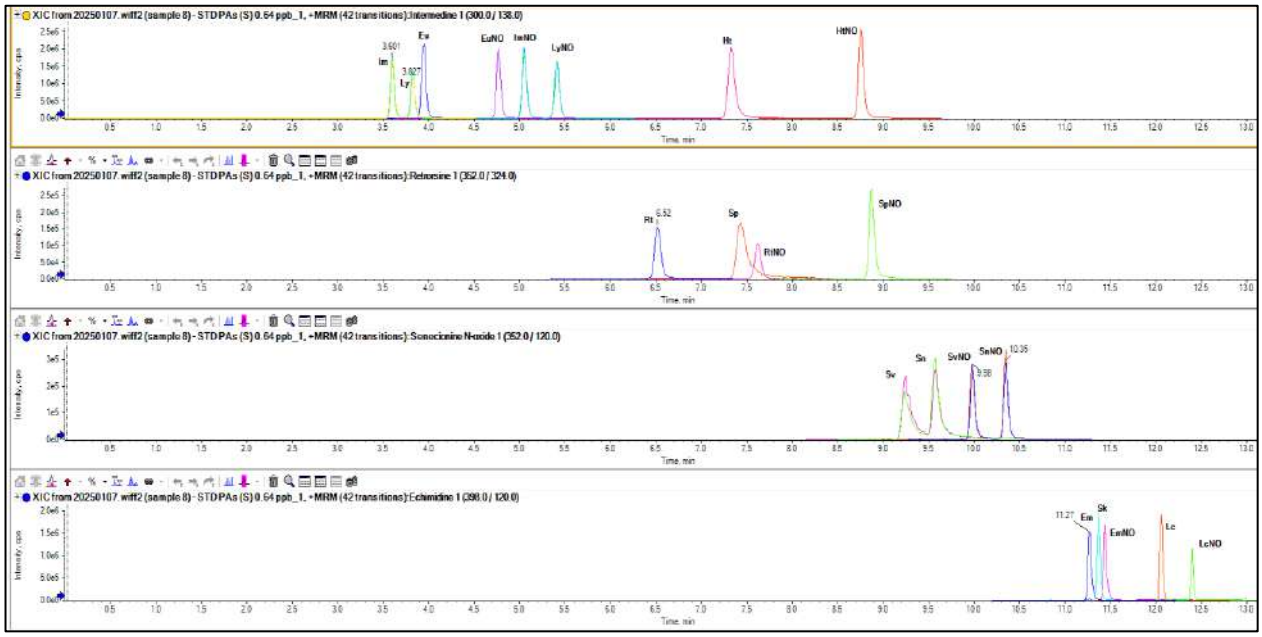
จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ HPLC column ชนิด C18 ร่วมกับสารละลาย formate buffer ด้วยสภาวะของ Putz *et al.* (2021) ให้ค่า signal intensity สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dzuman *el al.* (2020) ที่ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ในการวิเคราะห์ PAs/PANOs ในตัวอย่างอาหาร ร่วมกับการเลือกใช้ formate buffer เป็น mobile phase เพื่อเพิ่ม signal intensity สำหรับ PAs/PANOs ที่มี molecular ion แบบ protonated $(M+H)^+$ ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

สำหรับการแยกสภาวะดังกล่าวสามารถแยกสาร PAs/PANOs รวมถึงสาร PAs/PANOs ที่เป็น isomer กัน ได้แก่ Im/Ly, ImNO/LyNO ได้ดี แต่อย่างไรก็ดีสภาวะดังกล่าวไม่สามารถแยก isomer ของ Sv/Sn, SvNO/SnNO ได้ จึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโดยปรับสัดส่วน mobile phase ในระหว่างการวิเคราะห์ (gradient) อัตราการไหล (flow rate) และอุณหภูมิคอลัมน์ (column

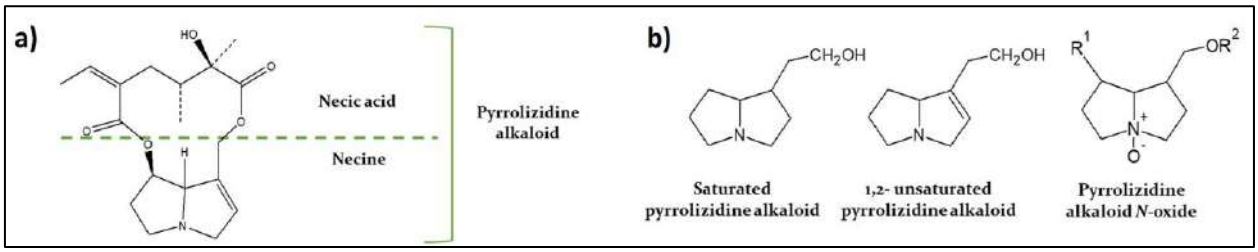
temperature) เพื่อช่วยให้แยกสารที่เป็น isomer ได้ดีขึ้น และจากการศึกษาพบว่าสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารที่เป็น isomer กัน คือ Sv กับ Sn และ SvNO กับ SnNO ได้ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์ได้สั้นกว่าสภาวะของ Putz *et al.* (2021) โดยจากใช้เวลา 24 นาที ลดลงเหลือ 19 นาที ต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง รายละเอียดโครมาโทแกรมของ PAs/PANOs ตาม**ภาพที่ 1-2** แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสาร PAs/PANOs ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น tertiary amine มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic compounds) (EURL-MP-method_002 V3, 2019) เมื่อแยกด้วยสภาวะที่พัฒนาขึ้นมีลักษณะของพีคไม่สมมาตร (peak asymmetry) โดยเฉพาะ Sp Sv และ Sn ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ลดลง ในอนาคตควรเลือกใช้คอลัมน์ที่มีการเพิ่มประจุบนผิวอนุภาค (charge surface) สำหรับวิเคราะห์สารที่มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic compounds) ซึ่งในปัจจุบันมีคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติและเทคโนโลยีดังกล่าว คือ Waters CSH (charge surface hybrid) โดยมีการตรึงประจุบวกระดับต่ำไว้ที่พื้นผิวอนุภาค จึงช่วยลด interaction ระหว่างสารที่เป็นเบสกับพื้นผิวของอนุภาคส่งผลทำให้รูปร่างของพีค (peak shape) ดีขึ้น และความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้น (Fountain *et.al.*, 2019) รายละเอียดแสดงโครงสร้างพื้นฐานที่มีลักษณะ PAs/PANOs ตาม**ภาพที่ 3**



ภาพที่ 1 Extract ion chromatogram (XIC) ของ PAs/PANOs ที่ความเข้มข้น 0.64 ng/mL เมื่อทดสอบตามสภาวะของ Putz *et al.*, (2021)



ภาพที่ 2 Extract ion chromatogram (XIC) ของ PAs/PANOs ที่ความเข้มข้น 0.64 ng/mL เมื่อทดสอบตามสภาวะที่พัฒนาขึ้น



ภาพที่ 3 (a) โครงสร้างพื้นฐานของ PAs (b) โครงสร้างของ saturated PAs, 1,2-unsaturated PAs และ PANOs (โดยที่ R1 และ R2 แทน necic acid ชนิดต่างๆ (Casado *et al*., 2022)

ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน พบว่าที่ช่วงความเข้มข้น 0.04–1.6 ng/mL ในการให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการทดสอบที่ r > 0.999 ของ PAs/PANOs จึงเลือกใช้สภาวะที่พัฒนาขึ้นในการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างต่อไป

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่าง

การทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างทำโดยการทดสอบ spiked sample ของสารมาตรฐาน PAs/PANOs ที่ความเข้มข้น 8.0 µg/kg สำหรับอาหารสุกร และ 6.4 µg/kg สำหรับน้ำผึ้ง จำนวนชนิดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่าง และคำนวณผล แบบ solvent calibration curve โดยประเมินจากค่า %MR อยู่ในช่วง 70-120%

อาหารสุกร

เทคนิค DnS ที่อาศัยการ clean up ตัวอย่างด้วย dSPE C18 (method A) พบว่าให้ค่า %MR มีค่า < 60% (40.5-58.9) สำหรับ PAs/PANOs 14 ชนิด และมีเพียง 7 ชนิด ที่มีค่า %MR > 60% (60.1-77.7) ในทางกลับกันพบว่าเทคนิค QuEChERS ที่มีการการสกัดตัวอย่างด้วย 0.2% FA และ ACN (method B) พบว่า %MR มีค่า > 65% (65.3-85.7) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีการ salting-out ทำให้สารที่จะวิเคราะห์อยู่ในส่วนของ ACN phase จึงสามารถลด polar matrix co-extract ที่อยู่ในตัวอย่างได้ (Anastassiades *et al*., 2003) ส่งผลให้ %MR มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ method A ที่ไม่มีการ salting out ก่อนการ clean-up

สำหรับเทคนิค SPE ชนิด polymeric (method C) ให้ค่า %MR อยู่ระหว่าง 82.0-99.5 และ SPE ชนิด prime HLB ที่ไม่ต้องอาศัยการ condition คอลัมน์ (method D) ให้ค่า %MR อยู่ระหว่าง 72.5-107.9 ตามลำดับ สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานของปฏิบัติการอ้างอิงของสหภาพยุโรป ซึ่งใช้ SPE ชนิด polymeric หรือ HLB ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ อาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีพืชเป็นองค์ประกอบ (EURL-MP-method_002 V3, 2019) โดย SPE ชนิด polymeric มีกลไกการทำงานแบบ reverse phase โดยอาศัย polymeric sorbent ของ N-vinylpyrrolidone ในการเกิด hydrophobic interaction (Phenomenex, 2022) เช่นเดียวกับ SPE ชนิด prime HLB ที่มีกลไกการทำงานเป็นแบบ reverse phase เช่นกัน โดยมี copolymer ของ hydrophilic N-vinylpyrrolidone และ lipophilic divinylbenzene แต่ไม่ต้องอาศัยการ condition หรือ equilibrate ก่อนการ load ตัวอย่างผ่านคอลัมน์ SPE (Waters, 2024) ซึ่ง SPE ทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้วิเคราะห์ที่มีคุณสมบัติที่เป็นกลาง (neutral) กรด (acid) และเบส (base) จึงสามารถวิเคราะห์กับชนิดตัวอย่างได้หลากหลายชนิดที่มีค่า pH ที่แตกต่างกันได้ดี รายละเอียดผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs ในอาหารสุกรตาม**ภาพที่ 4**

น้ำผึ้ง

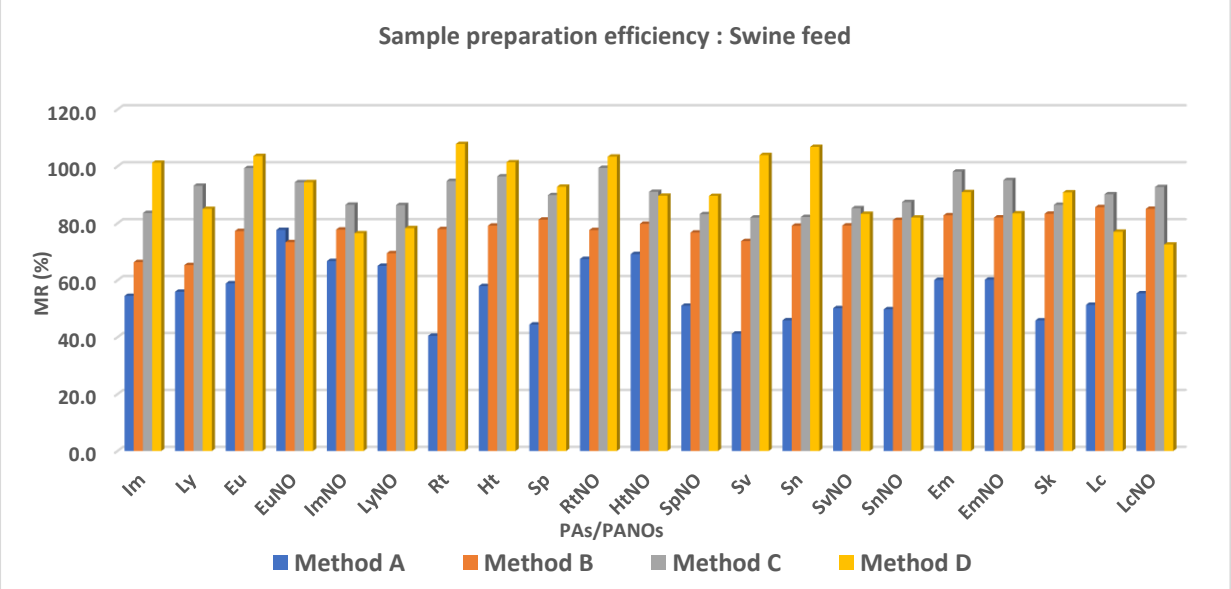
เทคนิค QuEChERS ที่ใช้ DI water และ ACN ในการสกัดตัวอย่าง แต่ไม่มีการเติม zinc dust (method E) พบว่าให้ค่า %MR มีค่า < 30% (4.3-26.7) สำหรับ PAs/PANOs 9 ชนิด และมี 12 ชนิด ที่มีค่า %MR > 60% (60.1-109.2) สำหรับ method F ซึ่งมีการเติม zinc dust เพื่อลด PANOs ให้อยู่ในรูป PAs (Martinello *et al.*, 2014) พบว่า PANOs ทั้ง 10 ชนิด ไม่มีสัญญาณการตรวจวัด แต่สำหรับ PAs ให้ค่า %MR อยู่ระหว่าง 56.3-126.2

สำหรับเทคนิค SPE ชนิด MCX (method G) โดยใช้ elution solvent คือ EtAc: MeOH: ACN (80:10:10, v/v/v) ที่มี 1% NH_4OH และ 1% TEA ให้ค่า %MR มีค่า < 15% (3.8-12.9) สำหรับ PANOs 3 ชนิด และ %MR อยู่ระหว่าง 49.3-94.7 ในทางกลับกันเมื่อมีการลดความเข้มข้นของ elution solvent จาก 1% เป็น 0.25% ของ NH_4OH (method H) พบว่าค่า %MR ของ PAs/PANOs ทั้ง 21 ชนิด อยู่ระหว่าง 79.5-102.9 สอดคล้องกับรายงานของ Kowalczyk and Kwiatek, (2018) ที่ทำการวิเคราะห์ PAs 10 ชนิด ในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยใช้ SPE ชนิด MCX ในการ clean-up ร่วมกับการใช้ elution solvent คือ (8:2:0.1:0.1,

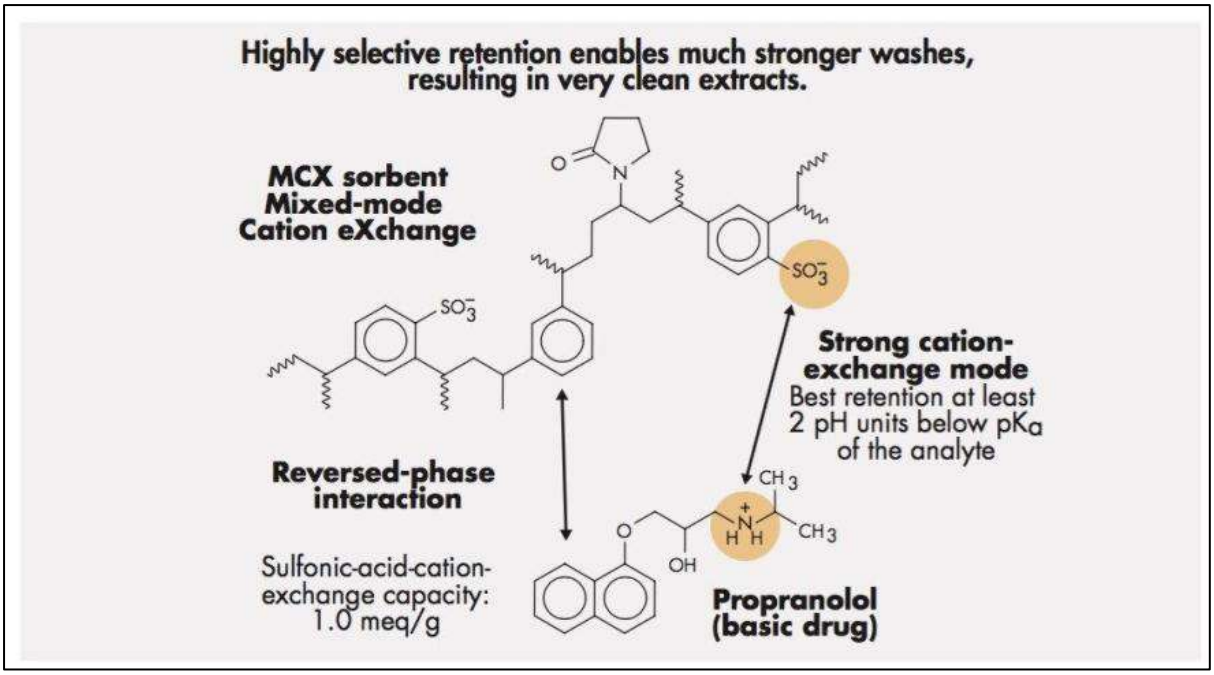
EtAc: MeOH: NH_4OH: TEA) ซึ่งการลดความเข้มข้นของ NH_4OH จะลดการ elute ของ impurity ต่างๆ ในตัวอย่าง ทำให้คุณภาพของโครมาโตแกรม และประสิทธิภาพของการสกัดดีขึ้น

โดย SPE ชนิด MCX มีกลไกการทำงาน 2 แบบ (dual mode) คือ reverse phase กับ cation exchange โดยมี sulfonic group ทำหน้าที่จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ซึ่งทำงานได้ดีที่สุดที่ค่า pH ที่น้อยกว่า 2 หน่วย ของค่า pKa ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Waters, 2019) รายละเอียดแสดงการทำงานของ SPE MCX ตาม**ภาพที่ 5** ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวสามารถช่วยลด matrix co-extract และ isobaric interference ในการวิเคราะห์ PAs/PANOs ที่มีคุณสมบัติเป็น protonated basic compounds ในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ (Dreolin *et al*., 2022) รายละเอียดผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs ในน้ำผึ้งตาม**ภาพที่ 6**

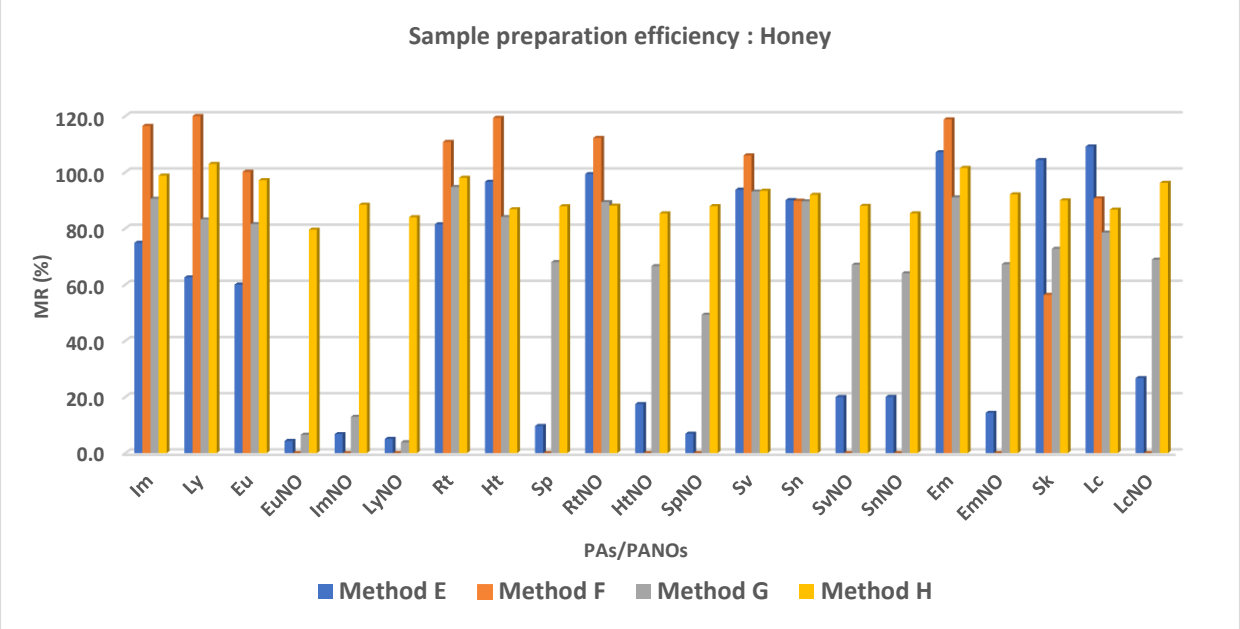
ซึ่งจากผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างจึงเลือกเทคนิค method D ในการพิสูจน์ความใช้ได้สำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs สำหรับอาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีกและ method H สำหรับน้ำผึ้งต่อไป



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs ในอาหารสุกร



ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของ SPE MCX (Waters, 2019)

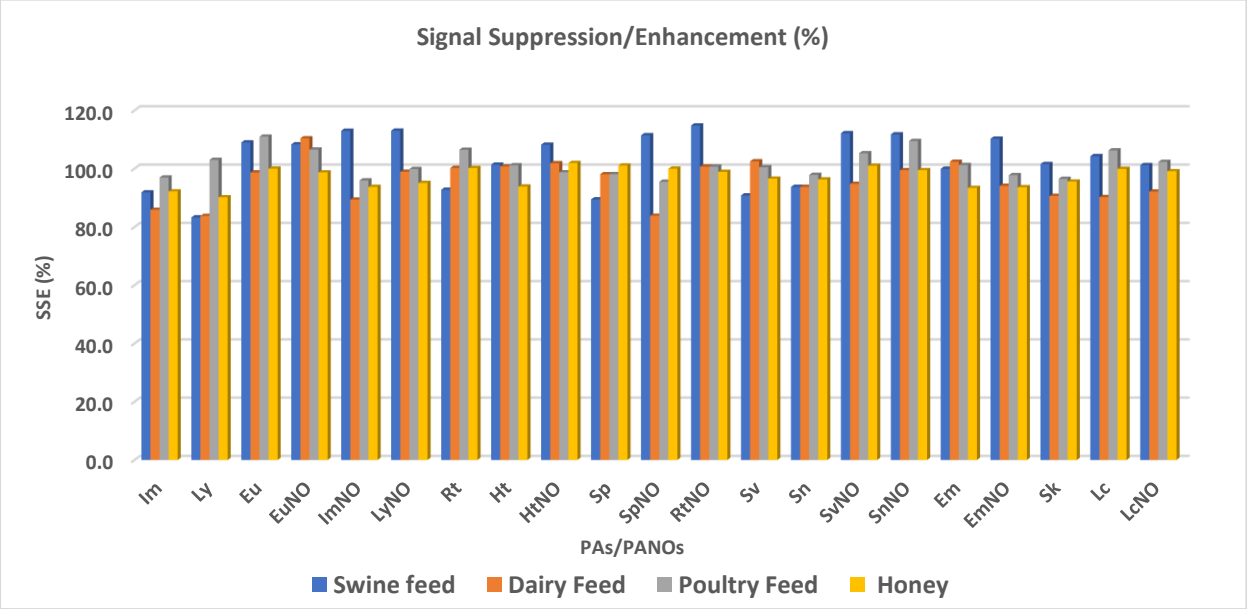


ภาพที่ 6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ PAs/PANOs ในน้ำผึ้ง

2. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี

2.1 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect, ME)

ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบการใช้ ECS โดยประเมินค่า %SSE จากการสร้างกราฟมาตรฐานในตัวอย่าง (MMC) และในตัวทำละลาย (SCC) พบค่า %SSE ในอาหารสุกรอยู่ระหว่าง 83.2 (Ly) – 114.8 (RtNO), 83.8 (Ly) – 110.4 (EuNO) สำหรับอาหารโคนม และ 95.5 (SpNO) – 111.0 (EU) สำหรับอาหารสัตว์ปีกตามลำดับ สำหรับน้ำผึ้ง %SSE อยู่ระหว่าง 90.2 (Ly) – 101.9 (HtNO) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ %SSE อยู่ระหว่าง 80-120% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024) โดยผลของ ME ที่ได้ชี้ให้เห็นว่าค่า ME อยู่ในระดับที่สามารถการคำนวณผลโดยใช้กราฟมาตรฐานแบบ SCC ซึ่งจะลดค่าใช้จ่ายและความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังช่วยลดสิ่งสกปรกตกค้างในเครื่อง LC-MS/MS เมื่อต้องสร้างกราฟมาตรฐานแบบ MMC ของตัวอย่างแต่ละชนิด แสดงให้เห็นว่าวิธีเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค SPE โดยเฉพาะแบบ mixed-mode หรือ reversed-phase สามารถขจัดสารรบกวนในตัวอย่างได้ดีกว่าการตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) หรือ liquid-liquid extraction (LLE) ทำให้ได้สารสกัดที่สะอาดขึ้นและลด matrix effect ได้อย่างชัดเจน (Chambers *et al.*, 2007) นอกจากนี้การปรับสภาวะของ mobile phase เช่น pH และการเลือก stationary phase ของระบบ LC-MS/MS โดยที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารรบกวนออกจากสารเป้าหมาย สามารถลด ME ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Trufelli *et al.*, 2009) รายละเอียดผลการทดสอบ matrix effect ของ PAs/PANOs ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง ตาม**ภาพที่ 7**



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบ matrix effect ของ PAs/PANOs ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง

2.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

ผลการทดสอบค่า %deviation of back-calculated concentration โดยสร้างกราฟมาตรฐาน PAs/PANOs ที่ความเข้มข้น 0.04-1.6 ng/mL พบมีค่าอยู่ระหว่าง 0.02 (Ly) – (-13.7) (EmNO) ซึ่งค่า %deviation of back-calculated concentration เป็นไปตามเกณฑ์ที่ SANTE 11352/2021 V2 (European commission, 2024) กำหนดไว้ คือ %deviation of back-calculated concentration ของสารมาตรฐาน PAs/PANOs แต่ละความเข้มข้นผิดพลาดไม่เกิน ±20% แสดงให้เห็นว่าการประเมิน linearity ในการศึกษานี้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นตรง และค่าความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานมีความถูกต้องแม่นยำ สำหรับสาร PAs/PANOs ทั้ง 21 ชนิด แสดงถึงความเหมาะสมของวิธีสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณรายละเอียดตาม**ตารางที่ 4**

ตารางที่ 4 ค่า deviation of back-calculated concentration (%) ของกราฟมาตรฐาน PAs/PANOs ที่ความเข้มข้น 0.04-1.6 ng/mL

PAs/PANOs	Deviation of Back-Calculated Concentration (%), conc. (ng/mL)					
	0.04	**0.08**	**0.16**	**0.32**	**0.64**	**1.6**
Im	8.3	9.8	-0.9	-2.8	-0.6	0.2
Ly	-12.7	-0.7	0.02	1.9	0.1	-0.1
Eu	4.1	6.0	0.8	-1.4	-2.1	0.2
EuNO	-10.8	2.3	-0.7	-0.2	1.1	-1.8
ImNO	-3.7	3.0	0.1	-0.1	-0.2	0.03
LyNO	3.3	6.6	1.8	-1.1	-1.6	0.3
Rt	5.1	5.8	0.2	-0.03	-1.7	0.3
Ht	-7.5	2.6	0.5	-2.4	1.7	-0.2
HtNO	6.6	8.7	0.4	-1.3	-1.7	0.3
Sp	4.1	5.5	1.6	-2.2	-0.4	0.1
SpNO	-2.8	5.3	-0.2	-0.1	-0.6	0.1
RtNO	7.9	4.3	0.5	-0.8	-1.4	0.2
Sv	12.4	7.5	1.4	-2.1	-1.9	0.3
Sn	4.8	3.4	2.4	-0.9	-1.5	0.2
SvNO	4.7	8.2	-0.2	-0.2	-1.9	0.3
SnNO	0.8	5.6	-0.2	-2.0	0.2	0.03
Em	-12.7	1.6	-1.3	0.5	1.3	-0.2
EmNO	-13.7	-0.6	-0.5	1.7	0.6	-0.1
Sk	-1.7	3.4	0.1	-0.4	-0.3	0.1
Lc	-0.4	2.6	0.1	-0.4	-0.2	0.05
LcNO	-5.4	5.0	0.7	-4.0	1.9	-0.2

2.3 ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบ LODs ของตัวอย่างอาหารสุกร อาหารโคนมและอาหารสัตว์ปีก ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 µg/kg พบว่า S/N ของ PAs/PANOs อยู่ระหว่าง 9.9 (LyNO)-28.3 (HtNO), 3.3 (Sp) - 67.2 (Ly), 5.5 (SnNO) – 86.1 (Ly) ตามลำดับ

และทดสอบ LOQs ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/kg ค่า %MR อยู่ระหว่าง 86.5 (LcNO)-118.7(Sn), %RSD อยู่ระหว่าง 1.6 (Em)-3.2 (SvNO) สำหรับอาหารสุกร สำหรับอาหารโคนมค่า %MR อยู่ระหว่าง 79.5 (RtNO) – 119.3 (HtNO), %RSD อยู่ระหว่าง 1.5 (LcNO) – 7.1 (Ly) และอาหารสัตว์ปีก ค่า %MR อยู่ระหว่าง 76.3 (ImNO) – 117.8 (Sp) และ %RSD อยู่ระหว่าง 1.0 (ImNO) – 7.5 (Ly) ตามลำดับ

สำหรับน้ำผึ้งทดสอบ LODs ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/kg พบว่า S/N ของ PAs/PANOs อยู่ระหว่าง 3.2 (Sp) – 614.1 (Im) และทดสอบ LOQs ที่ความเข้มข้น 0.4 µg/kg ค่า %MR อยู่ระหว่าง 71.1 (Lc) – 101.1 (HtNO) และ %RSD อยู่ระหว่าง 3.0 (Em) – 10.0 (RtNO)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความไว (sensitivity) สูง โดยสามารถตรวจวัด PAs/PANOs ได้ที่ระดับ 0.1 µg/kg สำหรับน้ำผึ้งและ 0.5 µg/kg สำหรับอาหารสัตว์ ซึ่งมีความไวสูงกว่าการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานค่า LODs ในช่วง 0.1-5.0 µg/kg สำหรับเมทริกซ์ที่คล้ายคลึงกัน (Martinello *et al*., 2014; Picron *et al.*, 2017; Kowalczyk and Kwiatek *(*2018) ความแตกต่างของความไวระหว่างเมทริกซ์ โดยค่า LODs ของ PAs/PANOs ในน้ำผึ้งมีความไวสูงกว่าอาหารสัตว์ 5 เท่า สามารถอธิบายได้จากความซับซ้อนของเมทริกซ์ กล่าวคือตัวอย่างอาหารสัตว์มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ และสารอื่นๆ ที่อาจก่อให้เกิด ME (Trufelli *et al.,* 2009) จึงจำเป็นต้องเพิ่มการเจือจางตัวอย่างเพื่อลด ME ทำให้ความไวลดลง ในขณะที่น้ำผึ้งประกอบด้วยน้ำตาลเป็นหลักจึงมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่น้อยกว่าอาหารสัตว์ทำให้ ME รบกวนน้อยกว่า

ค่า LOQs ของ PAs/PANOs ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้งของวิธีที่พิสูจน์นี้เป็นไปตามเกณฑ์ที่ SANTE 11352/2021 V2 กำหนดไว้ คือ LOQ ≤ ML (European commission, 2024) เมื่อค่า ML ของผลรวมของ PAs/PANOs ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนประกอบหลักจากเกสรและผลิตภัณฑ์จากเกสรตามมาตรฐานของสหภาพยุโรปใน Commission regulation (EU) No 2023/915 เท่ากับ 500 µg/kg (European commission, 2023) บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิธีใช้เป็นวิเคราะห์ยืนยันผลเชิงปริมาณ (confirmatory quantitative method) ได้ เนื่องจากผ่านเกณฑ์ทั้งความแม่นยำ และความเที่ยงตามข้อกำหนด

2.4 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยง

ความแม่นของวิธีทดสอบแสดงโดยค่า %MR และความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) จาก $\%RSD_r$ และแบบทวนซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) จาก $\%RSD_{wR}$ ในน้ำผึ้งที่เติมสารมาตรฐาน PAs/PANOs 21 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.8, 3.2 และ 16 µg/kg พบว่าผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR อยู่ระหว่าง 70.0 (Sp)-107.4 (LyNO) และค่า $\%RSD_r \leq 13.0$ และความแม่นและความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ก็ให้ค่า %MR อยู่ระหว่าง 71.3 (Sp)-101.9 (Lc) และค่า $\%RSD_{wR} \leq 15.5$

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Dreolin et al, (2022) ซึ่งใช้ SPE ชนิด MCX ในการเตรียมตัวอย่างร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS สำหรับ PAs/PANOs จำนวน 35 ชนิดในน้ำผึ้ง โดยใช้การคำนวณแบบด้วยกราฟมาตรฐาน MMC ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 1.0, 20 และ 250 µg/kg พบว่า สารบางชนิด ได้แก่ EuNO (62%), LyNO (58%), Sn (67%), Sp (65%) และ Lc (64%) ให้ค่า %MR ต่ำกว่า 70% ที่ความเข้มข้น 1 µg/kg ซึ่งแตกต่างจากวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ค่า %MR สูงกว่า 70% EuNO (86.8%), LyNO (71.4%), Sn (76.9%), Sp (78.1%) และ Lc (77.3%) ที่ความเข้มข้น 0.8 µg/kg แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่าในช่วงความเข้มข้นต่ำ แต่หากพิจารณาในความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะไม่พบความแตกต่างกันของผลการทดสอบทั้งในส่วนของค่า %MR และ %RSD

สำหรับอาหารสัตว์ ทดสอบที่ความเข้มข้น 2, 8 และ 40 µg/kg พบว่าผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR อยู่ในช่วง 71.3 (Ly)-116.4 (EuNO) และ ค่า $\%RSD_r \leq 14.8$ สำหรับอาหารสุกร 76.5 (LcNO)-116.3 (Eu, SpNO) และค่า $\%RSD_r \leq 5.7\%$ สำหรับอาหารโคนม และ 74.8 (LcNO)-115.1 (SnNO) และค่า $\%RSD_r \leq 6.1\%$ สำหรับอาหารสัตว์ปีก

สำหรับความแม่นและความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ให้ค่า %MR อยู่ระหว่าง 73.9 (LcNO)-114.6 (EuNO) และค่า $\%RSD_{wR} \leq 15.1\%$ สำหรับอาหารสุกร 77.1 (LcNO)-113.0 (SpNO) และค่า $\%RSD_{wR} \leq 10.3\%$ สำหรับอาหารโคนม และ 78.4 (LcNO)-114.8 (SnNO) และค่า $\%RSD_{wR} \leq 11.3\%$ สำหรับอาหารสัตว์ปีก

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Kowalczyk and Kwiatek (2018) ซึ่งใช้ SPE ชนิด SCX (strong cation exchange) ในการเตรียมตัวอย่าง ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS สำหรับ PAs จำนวน 10 ชนิดในอาหารสัตว์ ที่ค่า LOQs เท่ากับ 5 µg/kg โดยใช้กราฟมาตรฐานแบบ MMC ในการคำนวณเชิงปริมาณและทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 5, 20 และ 200 µg/kg พบว่าค่า %MR อยู่ในช่วง 84.1-111.9 และค่า $\%RSD_{wR}$ อยู่ในช่วง 4.9-18.9 ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดสอบของวิธีที่พัฒนาขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ PANOs และ PAs ได้ 21 ชนิด โดยไม่จำเป็นต้องใช้การคำนวณผลด้วย MMC และมีค่า LOQs เท่ากับ 1 µg/kg ทำให้มีความรวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่สูงกว่า

ดังนั้น จากทดสอบความแม่นและความเที่ยงโดยค่า %MR, $\%RSD_r$ และ $\%RSD_{wR}$ บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นและความเที่ยงที่ดี สะท้อนถึงความแม่นยำและเสถียรภาพของวิธีภายในห้องปฏิบัติการได้เหมาะสม เป็นไปตามเกณฑ์ที่ SANTE 11352/2021 V2 กำหนดให้ค่า %MR เท่ากับ 70-120 และค่า $\%RSD_r$ $\%RSD_{wR}$ ≤ 20% จึงสามารถใช้เป็นวิธียืนยันผลที่มีความถูกต้องและความน่าเชื่อถือสำหรับการตรวจสอบ PAs/PANOs ในอาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีก และน้ำผึ้ง ได้ รายละเอียดค่า %MR และ %RSD ของการวิเคราะห์ PAs/PANOs ใน spiked sample ของอาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีก และน้ำผึ้ง ตาม**ตารางที่ 5-8**

ตารางที่ 5 ค่า %RSD และ %MR ของการวิเคราะห์ PAs/PANOs ใน spiked sample (อาหารสุกร)

PAs/PANOs	%RSD (%MR)								
	Day 1, conc. (ug/kg), n = 5			Day 2, conc. (ug/kg), n = 5			Within-lab reproducibility, conc. (ug/kg), n=10		
	2	8	40	2	8	40	2	8	40
Im	2.8 (86.9)	0.4 (86.0)	1.3 (83.6)	1.8 (88.9)	1.4 (81.0)	1.9 (84.5)	2.5 (87.9)	3.3 (83.5)	3.3 (84.1)
Ly	14.8 (71.3)	1.3 (81.1)	1.7 (78.7)	3.8 (89.6)	1.6 (73.1)	1.7 (83.1)	15.1 (80.4)	5.6 (77.1)	3.3 (80.9)
Eu	1.9 (93.5)	1.7 (84.6)	2.6 (82.2)	1.9 (92.7)	1.3 (83.7)	2.0 (81.5)	1.8 (93.1)	1.5 (84.2)	2.2 (81.8)
EuNO	1.7 (112.7)	1.0 (95.1)	2.7 (91.2)	0.4 (116.4)	1.1 (89.4)	2.0 (90.3)	2.1 (114.6)	3.4 (92.3)	2.3 (90.7)
ImNO	2.5 (81.4)	2.1 (84.8)	6.4 (84.1)	1.3 (73.0)	2.2 (83.5)	1.2 (86.4)	6.1 (77.2)	2.2 (84.2)	4.5 (85.2)
LyNO	1.2 (84.2)	1.2 (86.0)	0.8 (84.1)	3.2 (84.8)	2.3 (84.0)	1.4 (85.5)	2.3 (84.5)	2.1 (85.0)	1.4 (84.8)
Rt	1.6 (104.1)	1.1 (92.6)	0.9 (88.8)	1.3 (97.5)	1.1 (88.5)	0.2 (84.3)	3.7 (100.8)	2.6 (90.5)	2.8 (86.6)
Ht	1.5 (102.6)	0.5 (91.9)	2.0 (85.7)	1.0 (99.3)	2.0 (90.4)	1.3 (88.2)	2.1 (101.0)	1.6 (91.1)	2.2 (86.9)
HtNO	1.0 (98.8)	1.3 (90.0)	1.6 (87.0)	1.0 (97.8)	1.6 (90.1)	1.6 (88.1)	1.1 (98.3)	1.4 (90.0)	1.6 (87.6)
Sp	1.9 (92.4)	1.5 (89.0)	1.7 (86.9)	1.8 (91.9)	1.8 (87.2)	1.6 (84.9)	1.8 (92.2)	1.9 (88.1)	2.0 (85.9)
SpNO	1.9 (91.7)	0.7 (88.7)	1.8 (83.9)	1.5 (90.9)	0.6 (85.7)	0.6 (83.1)	1.6 (91.3)	1.9 (87.2)	1.7 (83.5)
RtNO	1.1 (103.7)	2.5 (91.4)	1.2 (86.7)	1.1 (107.3)	1.8 (88.1)	1.0 (85.2)	2.1 (105.5)	2.8 (89.7)	1.4 (85.9)
Sv	1.8 (101.0)	0.7 (89.6)	1.3 (85.3)	1.5 (98.7)	0.7 (86.7)	0.8 (84.2)	2.0 (99.9)	1.8 (88.1)	1.2 (84.8)
Sn	3.1 (99.3)	0.5 (89.4)	2.1 (85.3)	2.6 (98.3)	0.7 (87.3)	1.5 (83.9)	2.7 (98.8)	1.4 (88.4)	1.9 (84.6)
SvNO	0.8 (96.0)	1.0 (87.4)	1.5 (82.3)	1.3 (91.6)	1.8 (84.5)	1.4 (83.0)	2.7 (93.8)	2.2 (85.9)	1.4 (82.7)
SnNO	1.8 (104.8)	2.0 (89.6)	2.2 (86.9)	3.0 (91.0)	1.5 (85.7)	1.6 (85.8)	2.2 (103.6)	2.9 (87.7)	1.9 (86.4)
Em	1.0 (85.2)	0.8 (89.0)	1.2 (87.1)	1.7 (84.7)	1.5 (86.7)	1.4 (87.3)	1.3 (85.0)	1.8 (87.9)	1.3 (87.2)
EmNO	1.1 (87.6)	1.9 (85.2)	1.5 (79.1)	1.0 (85.4)	1.8 (83.4)	0.9 (82.2)	1.7 (86.5)	2.1 (84.3)	2.3 (80.7)
Sk	2.2 (101.6)	2.1 (86.0)	2.6 (81.3)	0.8 (108.0)	1.6 (86.3)	3.2 (86.8)	3.5 (104.8)	1.8 (86.1)	4.4 (84.1)
Lc	2.0 (92.6)	0.8 (82.4)	2.8 (78.9)	1.4 (91.0)	1.5 (82.7)	1.4 (80.6)	1.9 (91.8)	1.2 (82.5)	2.4 (79.7)
LcNO	1.5 (83.5)	0.7 (75.7)	0.9 (74.1)	1.1 (83.6)	2.2 (74.4)	0.9 (73.6)	1.2 (83.6)	1.8 (75.1)	0.9 (73.9)

ตารางที่ 6 ค่า %RSD และ %MR ของการวิเคราะห์ PAs/PANOs ใน spiked sample (อาหารโคนม)

PAs/PANOs	%RSD (%MR)								
	Day 1, conc. (ug/kg), n = 5			Day 2, conc. (ug/kg), n = 5			Within-lab reproducibility, conc. (ug/kg), n=10		
	2	8	40	2	8	40	2	8	40
Im	2.6 (90.8)	1.7 (86.7)	1.6 (91.3)	4.8 (98.2)	1.2 (82.4)	1.7 (83.3)	5.6 (94.5)	3.0 (84.5)	5.1 (87.3)
Ly	1.8 (93.5)	1.4 (85.5)	1.4 (88.2)	5.7 (100.7)	1.2 (86.6)	1.9 (85.3)	5.7 (97.1)	1.4 (86.1)	2.3 (86.7)
Eu	1.1 (102.8)	0.9 (91.4)	0.8 (94.9)	2.0 (116.3)	1.6 (94.9)	2.0 (93.2)	6.7 (109.5)	2.4 (93.1)	1.7 (94.0)
EuNO	3.7 (95.0)	4.1 (89.7)	0.9 (93.1)	3.2 (111.4)	2.9 (100.1)	3.0 (104.0)	9.0 (103.2)	6.6 (94.9)	6.3 (98.6)
ImNO	3.2 (83.2)	3.5 (87.3)	1.4 (95.0)	4.6 (88.4)	3.4 (82.9)	1.5 (88.9)	4.9 (85.8)	4.2 (85.1)	3.8 (91.9)
LyNO	1.6 (100.5)	1.1 (91.1)	1.5 (92.6)	4.1 (110.4)	1.4 (92.5)	0.6 (93.7)	5.8 (105.5)	1.4 (91.8)	1.3 (93.2)
Rt	3.2 (103.9)	3.5 (94.0)	1.3 (95.1)	3.6 (115.0)	2.1 (96.6)	1.3 (92.0)	6.3 (109.4)	3.1 (95.3)	2.1 (93.6)
Ht	1.4 (100.7)	1.3 (91.5)	2.4 (95.0)	3.7 (110.3)	2.2 (97.0)	0.7 (99.2)	5.5 (105.5)	3.5 (94.3)	2.8 (97.1)
HtNO	1.5 (93.6)	1.6 (89.0)	0.7 (93.9)	3.3 (113.1)	1.2 (93.6)	0.8 (96.2)	10.3 (103.4)	2.9 (91.3)	1.9 (95.1)
Sp	4.4 (97.7)	1.9 (85.5)	1.6 (92.0)	2.8 (112.9)	1.8 (91.6)	1.2 (94.3)	8.3 (105.3)	4.0 (88.5)	1.8 (93.1)
SpNO	4.6 (109.8)	0.3 (101.0)	2.2 (88.5)	2.7 (116.3)	1.2 (94.7)	1.8 (90.0)	4.6 (113.0)	3.5 (97.9)	2.1 (89.3)
RtNO	1.9 (100.1)	1.0 (89.4)	0.9 (91.0)	2.8 (109.2)	1.5 (93.1)	0.8 (93.7)	5.1 (104.7)	2.5 (91.2)	1.8 (92.4)
Sv	4.1 (101.5)	1.8 (92.1)	1.1 (93.7)	2.2 (109.9)	0.9 (92.8)	0.8 (93.2)	5.2 (105.7)	1.4 (92.4)	1.0 (93.4)
Sn	5.4 (106.4)	2.9 (87.7)	0.9 (91.7)	4.3 (104.8)	2.1 (90.6)	0.7 (89.3)	4.7 (105.6)	2.9 (89.1)	1.6 (90.5)
SvNO	3.4 (91.4)	1.5 (84.7)	2.0 (87.0)	2.1 (105.0)	1.0 (85.3)	0.4 (84.0)	7.8 (98.2)	1.3 (85.0)	2.3 (85.5)
SnNO	2.5 (97.5)	1.1 (83.4)	0.6 (85.5)	1.8 (109.8)	3.5 (91.2)	0.9 (86.8)	6.6 (103.7)	5.4 (87.3)	1.1 (86.2)
Em	0.7 (82.4)	0.9 (85.0)	1.4 (92.9)	2.1 (87.7)	3.2 (90.4)	2.0 (91.5)	3.6 (85.0)	4.0 (87.7)	1.8 (92.2)
EmNO	1.7 (96.1)	1.5 (85.8)	0.9 (86.5)	1.8 (101.9)	1.7 (84.5)	0.5 (83.0)	3.5 (99.0)	1.7 (85.2)	2.3 (84.8)
Sk	0.9 (98.0)	2.0 (85.8)	1.0 (86.7)	3.4 (107.9)	3.5 (89.6)	1.4 (87.1)	5.7 (102.9)	3.6 (87.7)	1.1 (86.9)
Lc	1.8 (82.3)	2.4 (82.1)	2.6 (87.7)	1.8 (85.0)	2.5 (83.9)	1.4 (90.0)	2.4 (83.7)	2.6 (83.0)	2.4 (88.9)
LcNO	1.2 (81.7)	1.4 (77.7)	1.7 (80.3)	1.7 (78.3)	3.1 (76.5)	1.6 (79.8)	2.6 (80.0)	2.4 (77.1)	1.6 (80.0)

ตารางที่ 7 ค่า %RSD และ %MR ของการวิเคราะห์ PAs/PANOs ใน spiked sample (อาหารสัตว์ปีก)

PAs/PANOs	%RSD (%MR)								
	Day 1, conc. (ug/kg), n = 5			Day 2, conc. (ug/kg), n = 5			Within-lab reproducibility, conc. (ug/kg), n=10		
	2	8	40	2	8	40	2	8	40
Im	1.7 (91.8)	1.1 (94.8)	2.4 (91.9)	2.4 (97.2)	1.8 (100.1)	1.2 (89.9)	3.6 (94.5)	3.2 (97.4)	2.2 (90.9)
Ly	3.6 (113.0)	2.5 (96.1)	0.8 (86.7)	2.8 (110.5)	1.6 (101.5)	2.4 (82.5)	3.2 (111.8)	3.5 (98.8)	3.1 (84.6)
Eu	0.3 (96.6)	3.1 (100.4)	2.4 (100.1)	1.9 (95.7)	2.3 (103.1)	2.2 (92.9)	1.4 (96.1)	2.9 (101.8)	4.5 (96.5)
EuNO	1.0 (99.4)	1.3 (99.5)	1.3 (102.3)	2.6 (94.9)	3.2 (96.4)	2.4 (87.1)	3.0 (97.2)	2.8 (97.9)	8.6 (94.7)
ImNO	2.2 (89.5)	2.3 (87.3)	4.6 (86.7)	4.5 (93.2)	1.5 (92.8)	1.8 (81.0)	4.0 (91.3)	3.7 (90.0)	5.0 (83.8)
LyNO	1.2 (114.1)	1.0 (91.4)	1.0 (86.4)	2.6 (106.6)	1.7 (92.4)	2.2 (78.9)	4.0 (110.3)	1.4 (91.9)	5.1 (82.7)
Rt	1.8 (94.0)	1.7 (91.8)	0.8 (91.9)	4.1 (92.0)	2.3 (97.8)	2.1 (88.7)	3.2 (93.0)	3.8 (94.8)	2.4 (90.3)
Ht	0.5 (94.5)	1.1 (95.7)	1.6 (96.5)	0.3 (89.4)	1.9 (93.2)	1.7 (83.3)	3.0 (92.0)	2.0 (94.5)	7.9 (89.9)
HtNO	1.9 (114.5)	1.9 (95.0)	2.3 (91.9)	0.8 (112.8)	1.3 (98.8)	1.8 (82.3)	1.6 (113.7)	2.5 (96.9)	6.1 (87.1)
Sp	2.3 (89.2)	2.1 (88.5)	2.2 (88.4)	1.0 (90.2)	1.2 (94.4)	2.1 (85.4)	1.8 (89.7)	3.7 (91.5)	2.7 (86.9)
SpNO	1.7 (88.0)	1.2 (86.3)	2.2 (88.1)	2.5 (85.6)	2.8 (86.1)	2.3 (78.1)	2.5 (86.8)	2.0 (86.2)	6.7 (83.1)
RtNO	1.9 (109.7)	1.7 (99.6)	2.2 (94.6)	2.8 (112.1)	0.8 (98.5)	1.4 (86.3)	2.5 (110.9)	1.4 (99.1)	5.2 (90.5)
Sv	6.1 (113.3)	1.3 (95.3)	0.8 (91.0)	2.1 (108.9)	2.7 (98.9)	2.5 (86.3)	4.8 (111.1)	2.8 (97.1)	3.3 (88.6)
Sn	1.5 (87.2)	1.1 (88.8)	1.1 (92.1)	1.9 (108.8)	2.3 (97.5)	2.0 (83.8)	11.7 (98.0)	5.2 (93.2)	5.2 (87.9)
SvNO	1.3 (112.9)	1.4 (90.6)	1.5 (87.6)	1.5 (108.1)	3.7 (93.6)	1.9 (78.3)	2.7 (110.5)	3.2 (92.1)	6.1 (82.9)
SnNO	2.8 (114.5)	1.3 (90.1)	1.2 (83.3)	2.0 (115.1)	1.0 (91.0)	3.3 (76.7)	2.3 (114.8)	1.2 (90.6)	4.9 (80.0)
Em	0.8 (95.5)	1.3 (96.0)	2.5 (98.0)	0.9 (90.6)	1.8 (93.5)	2.3 (89.0)	2.9 (93.0)	2.0 (94.8)	5.5 (93.5)
EmNO	0.9 (107.7)	1.0 (89.2)	0.4 (84.8)	1.9 (104.6)	0.8 (93.8)	2.4 (78.0)	2.1 (106.2)	2.8 (91.5)	4.7 (81.4)
Sk	3.1 (88.4)	2.6 (87.6)	3.4 (88.8)	1.9 (85.4)	1.5 (86.2)	1.5 (89.3)	3.0 (86.9)	2.2 (86.9)	2.5 (89.1)
Lc	1.8 (110.8)	1.6 (84.8)	1.5 (80.3)	3.6 (111.6)	1.8 (89.0)	2.7 (93.6)	2.7 (111.2)	3.0 (86.9)	8.3 (87.0)
LcNO	2.0 (104.3)	2.0 (78.3)	1.4 (74.8)	3.0 (94.7)	1.8 (78.5)	2.5 (86.6)	5.6 (99.5)	1.8 (78.4)	8.0 (80.8)

ตารางที่ 8 %RSD และ %MR ของการวิเคราะห์ PAs/PANOs ใน spiked sample (น้ำผึ้ง)

PAs/PANOs	%RSD (%MR)								
	Day 1, conc. (ug/kg), n = 5			Day 2, conc. (ug/kg), n = 5			Within-lab reproducibility, conc. (ug/kg), n=10		
	0.8	3.2	16	0.8	3.2	16	0.8	3.2	16
Im	6.2 (88.8)	5.9 (80.0)	1.5 (71.8)	6.9 (82.8)	2.3 (83.6)	3.9 (81.5)	7.2 (85.8)	4.7 (81.8)	7.2 (76.7)
Ly	5.3 (77.4)	3.0 (70.1)	4.5 (72.7)	4.2 (72.6)	3.3 (74.6)	2.4 (72.3)	5.7 (75.0)	4.5 (72.4)	3.4 (72.5)
Eu	6.3 (84.0)	2.8 (75.5)	2.0 (73.2)	6.4 (75.7)	1.7 (76.2)	3.1 (78.1)	8.1 (79.8)	2.2 (75.8)	4.2 (75.7)
EuNO	3.5 (78.1)	1.2 (70.0)	2.1 (70.5)	4.0 (95.4)	2.7 (86.4)	10.2 (85.6)	11.1 (86.8)	11.2 (78.2)	12.7 (78.1)
ImNO	4.6 (78.9)	4.0 (71.5)	1.9 (70.1)	4.7 (71.4)	1.6 (75.1)	4.2 (77.3)	6.8 (75.1)	3.8 (73.3)	6.1 (73.7)
LyNO	9.8 (70.2)	3.7 (78.5)	2.3 (79.7)	2.9 (72.7)	3.5 (100.0)	2.8 (107.4)	7.0 (71.4)	13.1 (89.2)	15.5 (95.1)
Rt	7.8 (73.9)	4.1 (71.8)	6.7 (71.2)	1.8 (83.6)	5.7 (74.9)	4.8 (75.6)	8.2 (78.7)	5.2 (73.4)	6.3 (73.4)
Ht	7.3 (77.2)	6.3 (70.3)	4.9 (76.1)	7.0 (78.0)	3.5 (74.3)	2.6 (74.5)	6.7 (77.6)	5.6 (72.3)	3.9 (75.3)
HtNO	2.1 (83.3)	2.3 (78.9)	2.1 (75.5)	4.5 (77.7)	1.9 (77.4)	0.4 (79.4)	4.8 (80.5)	2.2 (78.1)	3.0 (77.4)
Sp	10.6 (70.4)	6.3 (71.8)	7.1 (70.0)	1.3 (85.9)	7.0 (72.3)	6.2 (72.5)	12.3 (78.1)	6.3 (72.0)	6.5 (71.3)
SpNO	5.3 (83.2)	3.7 (75.7)	1.2 (75.6)	3.9 (75.5)	3.5 (75.8)	2.8 (77.4)	6.8 (79.3)	3.4 (75.8)	2.4 (76.5)
RtNO	1.2 (72.0)	3.3 (75.1)	2.7 (73.8)	8.1 (71.6)	3.1 (74.7)	3.0 (76.7)	5.5 (71.8)	3.1 (74.9)	3.4 (75.2)
Sv	9.9 (74.1)	5.9 (75.0)	7.4 (73.4)	3.1 (79.9)	6.6 (72.0)	6.0 (74.5)	7.8 (77.0)	6.3 (73.5)	6.4 (73.9)
Sn	10.7 (77.3)	5.3 (70.5)	4.9 (76.0)	1.9 (76.5)	8.7 (74.7)	2.9 (83.8)	7.3 (76.9)	7.6 (72.6)	6.3 (79.9)
SvNO	4.8 (80.7)	3.2 (74.0)	1.5 (73.3)	3.0 (75.9)	2.5 (76.1)	2.8 (75.6)	5.0 (78.3)	3.1 (75.0)	2.7 (74.4)
SnNO	5.7 (86.0)	4.3 (75.1)	1.7 (72.1)	7.9 (75.7)	2.2 (77.0)	3.1 (78.6)	9.2 (80.8)	3.5 (76.1)	5.2 (75.3)
Em	13.0 (81.2)	7.4 (73.5)	4.9 (76.0)	5.3 (92.9)	5.3 (70.5)	4.6 (89.8)	11.4 (87.0)	5.6 (74.4)	12.4 (79.7)
EmNO	1.9 (71.3)	2.6 (70.6)	2.2 (71.4)	3.8 (72.3)	1.9 (74.2)	2.7 (71.4)	3.0 (71.8)	3.4 (72.4)	2.3 (71.4)
Sk	6.9 (76.8)	8.7 (74.6)	3.6 (71.9)	4.9 (70.8)	1.5 (70.5)	5.8 (80.9)	7.1 (73.8)	7.0 (72.8)	7.7 (75.9)
Lc	4.9 (75.0)	5.8 (101.6)	6.9 (85.0)	6.2 (80.2)	7.3 (102.2)	3.1 (82.6)	6.3 (77.3)	6.2 (101.9)	5.1 (83.8)
LcNO	6.3 (81.5)	3.3 (73.7)	2.9 (74.5)	5.4 (79.8)	3.0 (74.4)	2.8 (74.8)	5.6 (80.7)	3.0 (74.1)	2.7 (74.7)

2.5 การประเมินค่าความไม่แน่นอน

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของ PAs/PANOs ที่ค่า LOQs ตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 จากนั้นคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U') จากค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard uncertainty, u') ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) = 2 ตามสมการที่ 3

$$U' = k \times u' \qquad \textbf{สมการที่ 3}$$

โดยเลือกแนวทางที่ 1 คือ การประมาณค่าความไม่แน่นอนจาก intra-laboratory validation ในการประมาณค่าความแน่นอนโดย ซึ่งคำนวณค่า u' (measurement uncertainty) จากค่า u'(bias) และ u'(precision) ตามสมการที่ 4

$$u' = \sqrt{u'(\text{bias})^2 + u'(\text{precision})^2} \qquad \textbf{สมการที่ 4}$$

- คำนวณค่า relative bias จากสมการที่ 5 และหาค่า $mean_{bias}$ของการทำซ้ำ (n = 10)

$$\text{relative bias} = \frac{\text{measured concentration - spiked concentration}}{\text{spiked concentration}} \times 100 \qquad \textbf{สมการที่ 5}$$

- คำนวณค่า u'(bias) จากสมการที่ 6

$$u'(\text{bias}) = u' = \sqrt{mean_{bias}{}^2 + SD.P_{bias}{}^2} \qquad \textbf{สมการที่ 6}$$

- คำนวณค่า u'(precision) จากสมการที่ 7

$$u'(\text{precision}) = RSD_{wR} \qquad \textbf{สมการที่ 7}$$

- คำนวณค่า u'(combined) จากสมการที่ 8

$$u'(\text{combined}) = u' = \sqrt{mean_{bias}{}^2 + SD.P_{bias}{}^2 + RSD_{wR}{}^2} \qquad \textbf{สมการที่ 8}$$

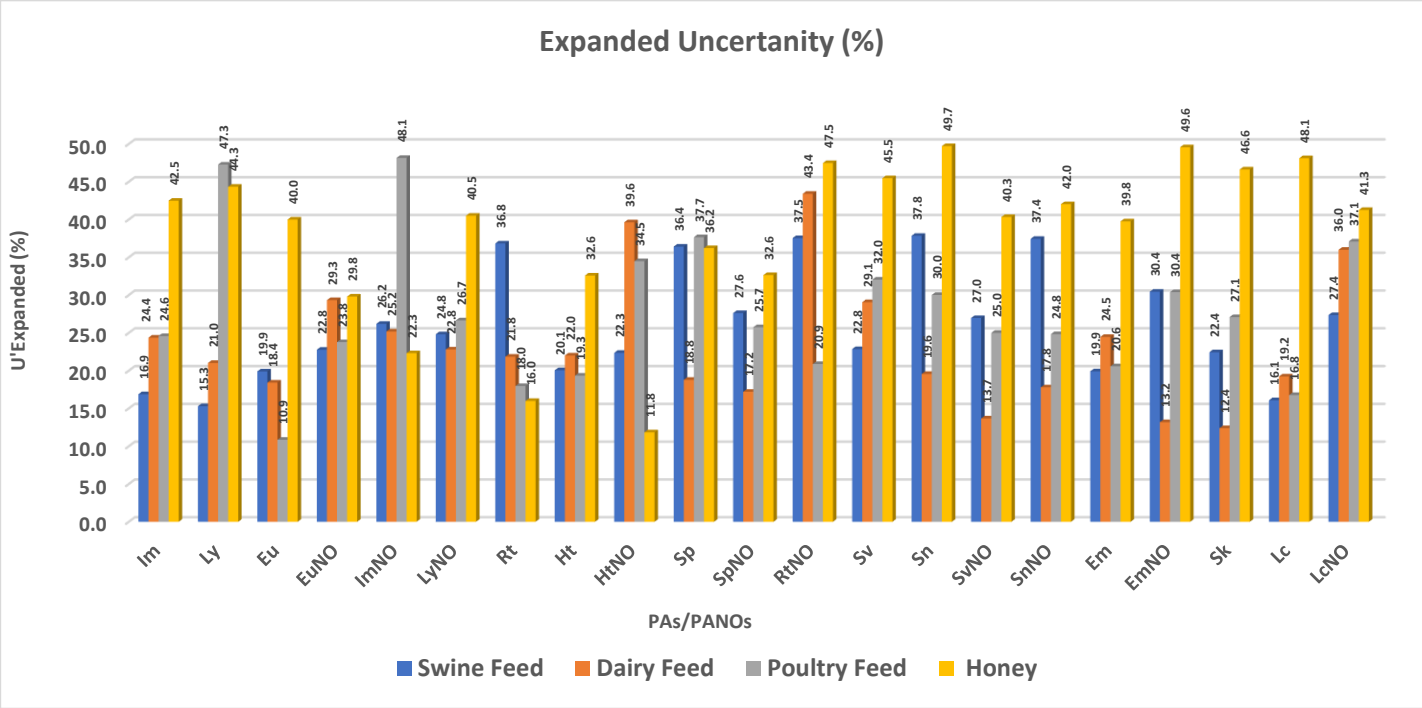
สำหรับน้ำผึ้งประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ความเข้มข้น 0.4 µg/kg พบค่าความไม่แน่นอน U'(expanded MU, %) อยู่ในช่วง 11.8 (HtNO) ถึง 49.7 (Sn) ขณะที่ตัวอย่างอาหารสัตว์ ได้แก่อาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีก ซึ่งประเมินค่าความไม่แน่นอนที่ความเข้มข้น 1.0 µg/kg พบว่าค่า U'(expanded MU, %) อยู่ในช่วง 15.3 (Ly)-37.8 (Sn), 12.4 (Sk) - 43.4 (RtNO), 10.9 (Eu) – 48.1 (ImNO) ตามลำดับ

ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนน้ำผึ้งมี PAs/PANOs มากกว่า 13 ชนิด (คิดเป็น 61.9%) มีค่า U' สูงกว่า 40% ในทางตรงกันข้ามในตัวอย่างอาหารสัตว์มีเพียงอาหารโคนมที่พบ RtNO (43.4) และอาหารสัตว์ปีกที่พบ Ly (47.3) และ ImNO (48.1) ที่มีค่า U' สูงกว่า 40% ส่วนอาหารสุกรไม่พบสารใดที่มีค่า U' เกินค่าดังกล่าว

โดยเมื่อพิจารณาจากการคำนวณตามสมการข้างต้นพบว่าการที่ค่า U' มีค่าสูงมีสาเหตุมาจากค่า bias (bias หมายถึง ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการวัด (mean measure value) กับค่าจริง (true value)) มากกว่าค่าความเที่ยงที่ประเมินจากค่า $\%RSD_{wR}$ โดยค่า bias สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายขั้นตอนในกระบวนการวิเคราะห์ เช่น การสูญเสียระหว่างขั้นตอนการสกัด (losses during extraction) การสูญเสียในขั้นตอนการ clean-up ตัวอย่าง (clean-up losses) ความคลาดเคลื่อนในการฉีดตัวอย่าง (injection error) รวมถึง matrix effect โดยแนวทางที่ใช้เพื่อเพิ่มความถูกต้องของผลการทดสอบโดยลดค่า bias จากสาเหตุข้างต้นมีได้หลายแนวทาง ได้แก่ matrix-matched calibration, procedural calibration, internal standard (IS), isotopically labeled internal standard (ILIS) และ standard addition method (European commission, 2024)

แม้ในบางสารจะพบค่า U' สูง แต่ยังคงอยู่ภายใต้เกณฑ์ที่กำหนดใน SANTE 11312/2021 V2 (European Commission, 2024) ซึ่งระบุว่าค่า U' ต้องไม่เกิน 50% ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่

พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ และสามารถใช้ยืนยันชนิดและปริมาณของ PAs/PANOs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ รายละเอียดค่าความไม่แน่นอนตาม**ภาพที่ 8**



ภาพที่ 8 ผลการประมาณค่า U' (expanded MU) ของ PAs/PANOs ในอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง

3. การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing)

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง pyrrolizidine alkaloids in honey รหัสตัวอย่าง 22238 จากหน่วยงานผู้จัด FAPAS โดยใช้วิธีที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้และประเมินด้วยค่า z-score $|z| \leq 2$ โดยตัวอย่างดังกล่าวมี assigned value ของ PAs 3 ชนิด ได้แก่ Ly, erucifoline (Er) และ monocrotaline (Mc) ซึ่ง Er และ Mc เป็นชนิด PAs ที่อยู่นอกขอบเขตการศึกษาในครั้งนี้ พบค่า z-score ที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $|z| \leq 2$ สำหรับ Ly (-0.1) และ Er (1.6) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ และขยายขอบข่ายสำหรับวิเคราะห์ Er หรือ PAs ชนิดอื่นเพิ่มได้ แต่อย่างไรก็ตามควรทำการพิสูจน์ความใช้ได้เพิ่มเติม เพื่อเป็นหลักฐานและสร้างความมั่นใจให้ผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ รายละเอียดผลการเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ ตาม**ตารางที่ 9**

ตารางที่ 9 ผลการเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ (proficiency testing)

PAs/PANOs	Assigned value (µg/kg)	Measured value (µg/kg)	z-score
Ly	4.4	4.31	-0.1
Er	34.2	46.5	1.6

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

อาหารสัตว์

จากการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษในกลุ่ม PAs/PANOs ในตัวอย่างอาหารสัตว์จำนวน 63 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งออกเป็นอาหารสัตว์ปีก 23 ตัวอย่าง อาหารสุกร 20 ตัวอย่าง และอาหารโคนม 20 ตัวอย่าง พบว่า 93.6% หรือ 59 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของ PAs อย่างน้อย 1 ชนิด โดยระดับการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.4–13.8 µg/kg ของค่าผลรวมของ PAs และ PANOs (Sum of PAs/PANOs) ซึ่งหากพิจารณาการปนเปื้อนในอาหารสัตว์แต่ละชนิดพบว่า อาหารสุกรและอาหารโคนมมีการปนเปื้อน 90%, อาหารสัตว์ปีกพบการปนเปื้อนทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ โดยชนิดที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด ได้แก่ Ly และ Im โดยพบ 88.9% และ 85.7% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานขององค์การความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป (EFSA, 2011) ที่ระบุว่า PAs ในกลุ่ม Ly มักปนเปื้อนในอาหารสัตว์ที่มีส่วนประกอบจากเมล็ดพืชน้ำมัน (oil seed) โดยเฉพาะถั่วเหลือง ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนหลักในการผลิตอาหารสัตว์ของประเทศไทย (สำนักพัฒนาอาหารสัตว์, 2560)

น้ำผึ้ง

ผลตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษในกลุ่ม PAs/PANOs ในน้ำผึ้งจำนวน 38 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสาร PAs อย่างน้อยหนึ่งชนิด โดยระดับการปนเปื้อนของค่าผลรวมของ PAs/PANOs อยู่ในช่วง 0.4–322 µg/kg โดยชนิดที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด ได้แก่ Ly 94.7% และ Em/Im 92.1% ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ EFSA (EFSA, 2011) ที่ได้ทำการสำรวจตัวอย่าง bulk honey และ retail honey มากกว่า 14,000 ตัวอย่าง พบว่า Ly และ Em เป็นสารที่มีการปนเปื้อนสูงที่สุดมากกว่า 80% นอกจากนี้ผลการศึกษายังสอดคล้องกับรายงานของ Yisheng *et al*. (2020) ซึ่งตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง retail honey จำนวน 255 ตัวอย่างจาก 17 ภูมิภาคของประเทศจีนและประเทศไต้หวัน พบการปนเปื้อนของ Ly และ Em มากกว่า 90.5% โดยที่ระดับค่าผลรวมของ PAs/PANOs อยู่ในช่วง 0.2–281.1 µg/kg

อย่างไรก็ตามระดับการปนเปื้อนของ PAs/PANOs ในน้ำผึ้งที่พบในประเทศไทยยังคงต่ำกว่าค่า ML ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรปซึ่งไม่เกิน 500 µg/kg (European Commission, 2023) รายละเอียดแสดงผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ PAs/PANOs ในตัวอย่างอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง แสดงตาม**ตารางที่ 10**

ตารางที่ 10 ระดับการปนเปื้อนของผลรวม PAs/PANOs ในตัวอย่างอาหารสัตว์และน้ำผึ้ง

Sample	No. Sample	Positive sample	%Positive sample	Range (µg/kg)	Mean (µg/kg)
Swine feed	20	18	90	0.7-12.3	3.4
Dairy feed	20	18	90	1.3-13.8	5.7
Poultry feed	23	23	100	0.4-2.2	1.4
Honey	38	38	100	0.4-322	18.1

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ PAs/PANOs 21 ชนิด โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค SPE ชนิด Prime HLB สำหรับอาหารสุกร อาหารโคนม และอาหารสัตว์ปีก และชนิด MCX สำหรับน้ำผึ้ง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS วิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้และประเมินค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจยืนยันชนิดและปริมาณของ PAs/PANOs 21 ชนิด โดยมีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.4-16 µg/kg ค่า LOD เท่ากับ 0.1 µg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 0.4 µg/kg สำหรับน้ำผึ้ง และช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1-40 µg/kg ค่า LOD เท่ากับ 0.5 µg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 1.0 µg/kg สำหรับอาหารสุกร อาหารโคนม และอาหารสัตว์ปีก ตามลำดับ

ความแม่นโดยค่า %MR อยู่ในช่วง 73.9 (LcNO)-114.6 (EuNO) สำหรับอาหารสุกร 76.5 (LcNO)-116.3 (Eu, SpNO) สำหรับอาหารโคนม 78.4 (LcNO)-114.8 (SnNO) สำหรับอาหารสัตว์ปีกและ 71.3 (Sp)-101.9 (Lc) สำหรับน้ำผึ้ง ตามลำดับ ความเที่ยงโดยค่า %RSD < 15.5% ผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด การศึกษา matrix effect โดยค่า %SSE พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 80-120% การประเมินค่าความไม่แน่นอนอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ U'(expanded MU) (%) ไม่เกิน 50% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันชนิดและปริมาณของ PAs/PANOs 21 ชนิด ในอาหารสุกร อาหารโคนม อาหารสัตว์ปีก และน้ำผึ้ง ทั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยประเมินจากค่า z-score พบว่าผลการวิเคราะห์ของ PAs/PANOs ที่อยู่ในขอบเขตการศึกษาครั้งนี้ คือ Ly (-0.1) และ Er (1.6) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $|z| \leq 2$

ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตควรพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์สาร PAs/PANOs ที่สามารถ co-elution และมีคุณสมบัติเป็นไอโซเมอร์กับ PAs/PANOs แต่ละชนิด เพื่อลดข้อจำกัดในการจำแนกชนิดและปริมาณ นอกจากนี้ควรนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากพืชกลุ่มอื่น เพื่อยกระดับขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษจากพืชให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากลและตอบสนองต่อสถานการณ์ในปัจจุบันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2560. วัตถุดิบอาหารสัตว์ ถั่วเหลือง. https://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/the-joomla-project/957-soybean-meal

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC. สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธี คัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

Anastassiades, M., Lehotay S., Stajnbaher, D. and Schenck, F. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int*. 86: 412-431.

Beales, K.A., Betteridge, K., Colegate, S.M. and Edgar, J.A. (2004). Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 6664–6672

Casado N., Morante-Zarcero S. and Sierra I. (2022). The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. *Trends in Food Science & Technology*. 120: 123-139.

Chambers, E., Wagrowski-Diehl D. M., Ziling L., Mazzeo J.R. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. J. Chromatography B. Vol. 852: 22-34.

Chen, Z. and Huo, J-R. (2010). Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. *Neth. J. Med*. 68: 252-260.

Chen, T., Mei N. and Fu, P.P. (2010). Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J. Appl. Toxicol*. 30: 183-196.

Dreolin, N., Stead, S., Hird, S. and Jenkins, T. (2021). Determination of regulated mycotoxins in cereals, nuts, figs and animal feeds using pass-through SPE and UHPLC-MS/MS. *Water application note* 720007377, September 2021.

Dreolin, N., Foddy H., Adams S., Hird S. and Hancock P. (2022) Method Development and Validation for the Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in a Range of Plant-Based Foods and Honey Using LC-MS/MS. Water Application Note 720007624, May 2022.

Dzuman, Z., Zachariasova, M., Veprikova, Z., Godula M. and Hajslova, J. (2015). Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Anal Chim Acta*, 863, 29-40.

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.

Edgar, J.A., Colegate, S.M., Boppre, M. and Molyneux, R.J. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in food: A spectrum of potential health consequences. *Food Addit. Contam. Part. A*, *28*, 308–324

European Commission (2023). Commission Regulation (EU) No 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing regulation (EC) No. 1881/2006 *Off. J. Eur. Union*, 119: 103-157.

European Commission (2024). Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. SANTE 11312/2021 V2, Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024.

European Food safety Authority (EFSA). (2007). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission related to Pyrrolizidine Alkaloids as undesirable substances in Animal Feeds. *The EFSA Journal*. 447: 1-51.

European Food safety Authority (EFSA). (2011). Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*. 9(11): 2406.

EURL-MP-method_002 v3. (2019). Determination of pyrrolizidine alkaloids in plant-based food and feed materials, including (herbal) teas, herbal food supplements, fodder and feedstuffs by LC-MS/MS, EURL for mycotoxins and plant toxins, Wageningen Food Safety Research, Wageningen University & Research.

Fountain J.K., Hewitson H.B., Iraneta P.C. and Morrison D. (2019) Practical Applications of Charged Surface Hybrid (CSH) Technology. Water Application Note 720003720, 2019.

Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G. and Chou, M.W. (2004). Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation and mechanisms. *Drug Metab. Rev*. 36: 1-55.

Greer, B., Chevallier, O., Quinn, B., Botana, L. M., and Elliott, C. T. (2021). Redefining dilute and shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem*. 141: 116284.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans.

Kempf, M., Wittig, M., Reinhard, A., Von der Ohe, K., Blacquière, T., K. Raezke, K.P., Michel, R., Schreier, P. and Beuerle T. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. *Food Additives and Contaminants* Vol. 28, No. 3, March 2011, 332–347

Kowalczyk E. and Kwiatek K. (2018). Pyrrolizidine alkaloids in honey: Determination with Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method. *Journal of Veterinary Research*. 62, 173–181.

Kowalczyk E. and Kwiatek K. (2018). Use of a new LC-MS methodfor the determination of pyrrolizidine alkaloids in feeds. *Journal of Veterinary Research*. 62, 183–191.

Machan, T., Korth, J., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., and Pyne, S. G. (2006). Composition and antituberculosis activity of the volatile oil of *Heliotropium indicum Linn*. growing in Phitsanulok, Thailand. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(1), 129-134.

Martinello, M., Cristofoli, C., Gallina, A. and Mutinelli F. (2014). Easy and rapid method for the quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids in honey by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry: An evaluation in commercial honey. *Food Control* 37 (2014) 146-152

Mol, H. G., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., de Rijk, T. C., Stolker, A. A., and Mulder, P. P. (2008). Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food Matrixes. *Anal. Chem.* 80 (24): 9450-9459.

Phenomenex (2022) SPE reference manual and user guide. Phenomenex GU24131221_W: 1-5.

Picron, J. F., Herman, M., Van Hoeck, E. and Goscinny, S. (2018). Analytical strategies for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant-based food and herbal products. Food Chemistry, 266, 514-523.

Putz, A., Hansen, D. and Baute, J. (2021) Analysis of pyrrolizidine alkaloids in herbal teas and honey using SPE and LC-MS/MS. Phenomenex application AN-1013: 1-5.

Smith, L.W. and Culvenor C.C. (1981). Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J. Nat. Prod*. 44: 129-152.

Souza, J. S. N., Machado, L. L., Pessoa, O. D. L., Braz-Filho, R., Overk, C. R., Yao, P., Cordell, G. A., and Lemos, T. L. G. (2005). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum. Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(7), 1443-1448.

Waters (2019) Oasis Sample Extraction Products:Chemistry and Formats. Water Application Note 720003678, September 2010

Waters (2024) Oasis HLB care and user manual. Waters Corporation February 24 23-12154 716001391EN Rev B

Wiedenfeld, H. and Edgar, J. (2011). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem Rev*. 10: 137-151.

Yisheng, H., Lin Z., Jiang M., Lailai W., Zhongzhen Z., Yang Y., Peter P. F. and Ge L. (2020). Comprehensive investigation and risk study on pyrrolizidine alkaloid contamination in Chinese retail honey. *Environmental Pollution* 267 (2020), 115542