การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic Amines) ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาด้วย UHPLC-UVD

เอกปุณณดา เย็นอุทก ศิริชัย สัญญะ ปิยะวัฒน์ แปงพั๊วะ วรพงศ์ พรหมณา และ ปุษยา แสงวิรุฬห์
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

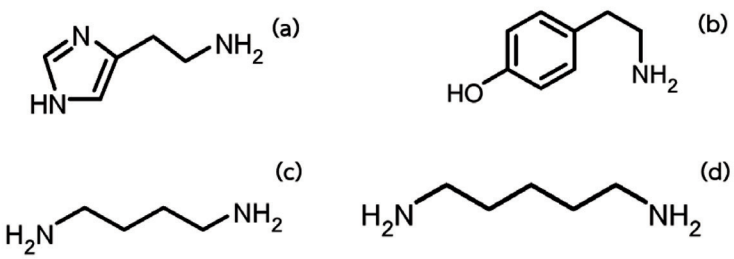
บทคัดย่อ ฮีสตามีน คาร์ดาเวอรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน เป็นสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน พบได้ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก หลายประเทศรวมถึงประเทศไทยมีข้อกำหนดเพื่อควบคุมปริมาณการปนเปื้อนสารฮีสตามีน การศึกษานี้ได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิดข้างต้น ในปลาและผลิตภัณฑ์ (น้ำปลา) โดยพัฒนาจากวิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017 ซึ่งตรวจสารฮีสตามีนเพียงชนิดเดียวด้วยเทคนิค HPLC-UVD เป็นการตรวจแบบ multi compounds และวัดปริมาณด้วยเครื่อง UHPLC-UVD เพื่อลดเวลาการวัดปริมาณจาก 30 นาที เป็น 7 นาที ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจงสูง ความเป็นเส้นตรงของช่วงใช้งานที่ความเข้มข้นระหว่าง 0-500 mg/kg ในปลา (ยกเว้นสารไทรามีน 0-250 mg/kg) และในน้ำปลา 0-1,000 mg/kg ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 5 และ 20 mg/kg ตามลำดับ ความแม่นและความเที่ยงทั้งสี่ระดับความเข้มข้น มี %Recovery ในช่วง 80.0-108.6% และค่า HORRAT < 2 ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการในปี ค.ศ. 2021 และ 2022 โดยวิเคราะห์ปริมาณสารฮีสตามีนในปลากระป๋อง อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($-2 \leq z\text{-score} \leq 2$) และจากการสำรวจการปนเปื้อนเบื้องต้นในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปลารวม 30 ตัวอย่าง ไม่พบตัวอย่างที่มีสารฮีสตามีนเกินมาตรฐานทั้งของประเทศไทยและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามสารอีก 3 ชนิด ยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานควบคุมการปนเปื้อน วิธีที่พัฒนานี้จึงเหมาะสมและน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน และไทรามีนในปลาและผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ: ไบโอจีนิกเอมีน, ปลา, ผลิตภัณฑ์จากปลา, UHPLC-UVD

Corresponding author E-mail: aekgphoonnada.y@dmsc.mail.go.th
Received: 15 October 2025 *Revised: 12 March 2026* *Accepted: 17 March 2026*

บทนำ

สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine, BAs) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยา Decarboxylation ระหว่างกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) และเอนไซม์ Decarboxylase ที่สร้างขึ้นโดยกิจกรรมของแบคทีเรียบางชนิด เช่น Enterobacter, Proteus, Klebsiella, Acinetobacter[1] สารกลุ่มนี้แบ่งออกเป็นชนิดย่อย ๆ ตามจำนวนหมู่เอมีน ได้แก่ Monoamines (เช่น Histamine, Tyramine, Phenylethylamine), Diamines (เช่น Cadaverine, Putrescine) และ Polyamines (เช่น Spermidine, Spermine) ดังแสดงในภาพที่ 1[2] สารกลุ่มนี้มักพบในอาหารประเภทสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ทำจากสัตว์น้ำ เช่น น้ำปลาและปลาร้าที่มีการปนเปื้อนสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน โดยเฉพาะสาร Histamine ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ รวมไปถึงอาหารหมักบางชนิด เช่น ไวน์ ไส้กรอกตากแห้ง (Salami) และชีสบางชนิดที่อาจพบการปนเปื้อนของ Tyramine ได้เช่นเดียวกัน[2] ทั้งนี้อาการและความรุนแรงของโรคจะมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความไวของร่างกายแต่ละบุคคล เช่น ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีผื่นขึ้นตามร่างกาย หายใจติดขัด ความดันโลหิตสูงผิดปกติ เป็นต้น[3] หากอาการนั้นมีสาเหตุหลักมาจากสาร Histamine จะเรียกว่าโรคอาหารเป็นพิษจากสารพิษสคอมบรอยด์ (Scombroid fish poisoning) เนื่องจากเป็นสารที่มักพบในปลาที่มีกรดอะมิโน Histidine อิสระปริมาณสูง ตัวอย่างปลาในวงศ์ Scombridae เช่น ปลาทู ปลาทูน่า ปลาแมกเคอเรล ปลาอินทรี ปลาซาร์ดีน[4] ในส่วนของสาร Cadaverine และ Putrescine จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Histamine-N-methyltransferase (HMT) และ Diamine oxidase (DAO) ทำหน้าที่ย่อยสลายสาร Histamine ให้อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษน้อยลง ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสาร Histamine ออกจากร่างกายมนุษย์[3]



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ (a) Histamine, (b) Tyramine, (c) Putrescine และ (d) Cadaverine

หน่วยงานตรวจสอบความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (The European Food Safety Authority, EFSA) ระบุว่าสารกลุ่ม BAs เหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยากับสาร Nitrite ซึ่งถูกใช้อย่างผิดวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาปลาทูน่าให้เนื้อปลามีสีแดงที่คงตัวทำให้เกิดเป็นสาร Nitrosamines ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง[5] สารกลุ่มนี้อาจก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น ในปี ค.ศ. 2017 หน่วยงาน EFSA ได้รายงานจำนวนครั้งในการเกิดอาการอาหารเป็นพิษจากสารพิษสคอมบรอยด์มากถึง 117 ครั้ง[6] เช่นเดียวกับประเทศไต้หวัน พบผู้ป่วยอาหารเป็นพิษจากการบริโภคลูกชิ้นปลาที่มีสาร Histamine ปนเปื้อนสูงถึง 910 mg/kg[7] และเมื่อปี พ.ศ. 2550 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้เผยแพร่ข้อมูลการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษในกลุ่มพนักงานโรงงานผลิตอาหารทะเลแช่แข็งแห่งหนึ่ง ในจังหวัดสมุทรปราการ พบผู้ป่วย จำนวน 28 ราย มีอาการถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน หน้าแดง ปากชา และผื่นคัน หลังรับประทานอาหารจากโรงอาหารของโรงงาน ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าปลาทูน่าส้มทอด มีการปนเปื้อนสาร Histamine สูงกว่า 440 mg/kg จึงเป็นสาเหตุในการเกิดโรคในครั้งนี้[8] ต่อมาในปี พ.ศ. 2566 มีข่าวการรับประทานแมลงทอดแล้วเกิดอาการแพ้อย่างรุนแรง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) จึงออกประกาศเตือนผู้บริโภคที่มีประวัติโรคภูมิแพ้หรือหอบหืด

ควรหลีกเลี่ยง พร้อมแนะรับประทานแมลงอย่างปลอดภัย เลือกซื้อจากแหล่งผลิตหรือจำหน่ายที่ถูกสุขลักษณะ และปรุงให้สุกก่อนรับประทาน[9] ดังนั้นจากความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ โดยเฉพาะสาร Histamine ที่มีรายงานความเป็นพิษมากกว่าสารอื่น ประเทศต่าง ๆ จึงมีการออกข้อกำหนดว่าด้วยปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค และปี ค.ศ. 2005 สหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนด EC No 2073/2005 ที่กำหนดให้ตรวจพบสาร Histamine ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์น้ำที่มีกรดอะมิโน Histidine สูง ได้ไม่เกิน 200 mg/kg และสำหรับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยน้ำเกลือ (น้ำปลา) ตรวจพบได้ไม่เกิน 400 mg/kg[10] และคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (CODEX) กำหนดให้ตรวจพบสาร Histamine ในปลาและผลิตภัณฑ์ได้ไม่เกิน 200 mg/kg[11] ขณะที่ประเทศไทยมีการกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร ในผลิตภัณฑ์ปลาแล่เยือกแข็งจากปลาในวงศ์ Clupeidae, Scombridae, Scombresocidae, Pomatomidae และ Coryphaenedae ทุกชนิด ให้ตรวจพบสาร Histamine ได้ไม่เกิน 200 mg/kg (มกษ. 7014-2548)[12] ในผลิตภัณฑ์ปลาทูน่าและปลาโบนิโตในภาชนะบรรจุปิดสนิทกำหนดเกณฑ์การเสื่อมคุณภาพไว้ที่ไม่เกิน 100 mg/kg (มกษ. 7015-2549)[13] อย่างไรก็ตามสำหรับสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ ยังไม่มีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ทั้งของประเทศไทยและนานาชาติ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลความเป็นพิษเพียงพอ แต่จากการประชุมคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO (Codex Alimentarius Commission) ปี ค.ศ. 2014 ได้มีคำแนะนำจากผู้เข้าร่วมประชุมเสนอให้มีการศึกษาความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้เพิ่มเติม ได้แก่ Putrescine, Cadaverine และ Tyramine[14] เพื่อเป็นข้อมูลนำเข้าในการกำหนดมาตรฐานของสารทั้ง 3 ชนิดนี้ ทั้งนี้สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเน่าเสียได้จากการคำนวณค่า Biological amines index (BAI) ที่มาจากผลรวมความเข้มข้นของสาร Histamine, Putrescine, Cadaverine และ Tyramine[15] ขณะที่การใช้ประสาทสัมผัสของร่างกายอย่างการดมกลิ่นเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการพิจารณาความสดของสัตว์น้ำได้[3] แต่ไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ที่จะตัดสินสุดท้ายในกระบวนการคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับกระบวนการผลิตได้ เนื่องจากกลิ่นของสัตว์น้ำที่เริ่มเกิดการเน่าเสียไม่มีความสัมพันธ์กันกับปริมาณสารกลุ่ม BAs ที่ตรวจพบ[15,16]

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม BAs สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค Ion chromatography เทคนิค Colorimetry เทคนิค Spectrophotometry และเทคนิค High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) โดยเมื่อปี ค.ศ. 1987 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ได้เผยแพร่วิธีอ้างอิง AOAC 977.13[17] เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สาร Histamine ในอาหารทะเลด้วยวิธี Fluorometric ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาน้อยในการตรวจวัด และแม่นยำ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น มีความจำเพาะเจาะจงน้อยกว่าวิธีอื่น เช่น HPLC เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสารอื่นในตัวอย่างที่มีโครงสร้างคล้าย Histamine[18] สารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีความไม่เสถียร สามารถสลายตัวได้ในระยะเวลาอันสั้น[19,20] และตรวจวิเคราะห์สารได้เพียงครั้งละหนึ่งชนิดเท่านั้น อีกทั้งไม่สามารถเปิดเครื่องไว้แล้วตรวจวัดแบบอัตโนมัติได้ นักวิเคราะห์จะต้องทำการวัดด้วยตัวเองครั้งละ 1 ตัวอย่าง จึงเป็นการเสียเวลาหากมีตัวอย่างจำนวนมาก เทคนิค HPLC เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและใช้ในวิธีมาตรฐาน เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจง ความถูกต้อง และแม่นยำสูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน และมีรายงานวิจัยหลายฉบับเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม BAs ในปลาและผลิตภัณฑ์ โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย reagent ชนิดต่าง ๆ เช่น o-Phthaldialdehyde, Benzoyl chloride และ Dansyl chloride เป็นต้น ประกอบกับ ปี ค.ศ. 2005 ที่ผ่านมา EU ได้ออกประกาศ Commission Regulation (EU) No 2073/2005 และระบุให้ใช้เทคนิค HPLC เป็นวิธีวิเคราะห์อ้างอิง[10] และปี ค.ศ. 2017 องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization: ISO) ได้ประกาศวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณ

Histamine ในปลาและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำด้วยวิธี HPLC (ISO 19343:2017)[21] ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวผ่านกระบวนการสกัดด้วยสารละลายกรด perchloric ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างสาร Histamine กับ dansyl chloride โดยการให้ความร้อนตามอุณหภูมิที่กำหนด เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของสารให้เหมาะสมกับการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-UV detector

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน จำนวน 4 ชนิด ประกอบด้วย Histamine (HIS), Cadaverine (CAD), Putrescine (PUT) และ Tyramine (TYR) ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาด้วยเครื่อง UHPLC-UVD โดยนำวิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017 มาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำ เหมาะสม น่าเชื่อถือ และสามารถเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ได้ ตลอดจนการสำรวจการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าวในผลิตภัณฑ์จากปลาที่จำหน่ายอยู่ในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานครและนนทบุรี เพื่อให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนเบื้องต้น รวมถึงอาจนำไปสู่การขยายขอบข่ายสู่การตรวจวิเคราะห์ในอาหารชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคได้อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetone, acetonitrile และ toluene (HPLC grade: Burdick & Jackson, USA), perchloric acid (purity ≥ 65%, Fisher Chemicals, USA), sodium carbonate (purity ≥ 99%, Merck, Germany), L-proline (HPLC reagent plus grade, purity ≥ 99%) และ dansyl chloride (HPLC derivatization grade, purity ≥ 99.0%) ของ Sigma-Aldrich สหรัฐอเมริกา, nitrogen gas (N_2) ความบริสุทธิ์ 99.5% และน้ำปราศจากไอออน (Type I มีค่า resistivity >18 MΩ/cm)

สารมาตรฐาน: Histamine dihydrochloride (TLC grade, purity ≥ 99%), Cadaverine dihydrochloride (Analytical grade, purity ≥ 99.0%), Putrescine dihydrochloride (TLC grade, Purity ≥ 98%), 1,7-diaminoheptane (Analytical grade, purity ≥ 98.0%) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich สหรัฐอเมริกา และ Tyramine hydrochloride (Analytical grade, Purity ≥ 98%) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Toronto Research Chemicals ประเทศแคนาดา

การเตรียมสารมาตรฐานและสารละลาย

เตรียมสารละลายมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีน (Stock standard solution) โดยละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิด ได้แก่ Histamine dihydrochloride, Cadaverine dihydrochloride, Putrescine dihydrochloride และ Tyramine hydrochloride ในน้ำปราศจากไอออน โดยคำนวณย้อนกลับให้มีความเข้มข้นในรูปของสาร Histamine, Cadaverine, Putrescine และ Tyramine อิสระ เท่ากับ 12.5 mg/mL และเจือจางให้เป็น Intermediate mixed standard solution โดยปิเปตสารละลาย Stock standard แต่ละชนิดลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 mL ชนิดละประมาณ 2.5 mL ให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 3.125 mg/mL และเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานทุกชนิดที่อุณหภูมิ -20°C (Mitsubishi Electric, Japan) ได้เป็นเวลา 1 ปี

เตรียมสารละลาย Internal standard (IS) โดยละลาย 1,7-diaminoheptane ในน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 6.4 mg/mL และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C (Mitsubishi Electric, Japan) ได้เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เตรียมสารละลาย Derivatizing agent โดยละลาย dansyl chloride ใน acetone ให้มีความเข้มข้น 7.5 mg/mL และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ได้เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เตรียมสารละลาย L-proline โดยละลายในน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 100 mg/mL และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ได้เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เตรียมสารละลายกรด perchloric โดยละลาย perchloric acid 65% ในน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 0.2 M และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลา 6 เดือน

เตรียมสารละลาย Na_2CO_3 อิ่มตัว โดยละลาย sodium carbonate ประมาณ 110 g ในน้ำปราศจากไอออน 150 ml และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ได้เป็นเวลา 3 เดือน

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น JB4002-L-G (Mettler Toledo, USA), เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB204-S, Mettler Toledo, USA), อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert GmbH, Germany), เครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (Ultra turrax®) (IKA, China), เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) (Kubota, Japan), เครื่องผสมสาร (vortex mixer) (Vortex-2Genie, USA), อ่างน้ำความถี่สูง (sonicate bath) (Thermo Scientific, UK), เครื่องระเหยแบบหลายหลอดแก้ว (TurboVap®) (Biotage, Sweden), micro pipette ขนาด 1–10, 20–200, 30–300 และ 100–1000 µL, หลอดทดลองพลาสติกสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge tube) ขนาด 50 mL, หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 4 mL (reaction vial) syringe filter ชนิด PTFE 0.2 µm ขนาด 13 mm และ บีกเกอร์ขนาด 100 และ 250 mL

เครื่อง UHPLC (AZURA, KNAUER, Germany) ที่มี detector ชนิด UV visible และ Analytical Column ชนิด C18 ขนาด 3.0 × 100 mm × 2.5 µm (XSelect HSS, Waters, USA)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ เนื้อปลาแพนกาเซียส (*Pangasius hypophthalmus*) เป็นตัวแทนของปลา และน้ำปลาผสมเป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์จากปลา โดยซื้อเนื้อปลาแพนกาเซียสแล่ไม่มีหนัง แช่แข็งบรรจุถุงพลาสติกชนิดสุญญากาศ ปริมาณ 1 กิโลกรัม จากห้างสรรพสินค้าในจังหวัดนนทบุรี ซึ่งได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อให้ทราบว่าตัวอย่างที่นำมาใช้นั้นพบสัญญาณสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิด ที่อ่านได้จากเครื่อง UHPLC-UVD หรือไม่ ตัวอย่างที่นำมาใช้เป็น Sample blank พบค่าความเข้มข้นของ BAs ทั้ง 4 ชนิด แต่น้อยกว่า 1/10 เท่าของค่า Maximum Limit (ML) อ้างอิงหรือน้อยกว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เนื่องจากในธรรมชาติมักพบการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าวปริมาณเล็กน้อยในอาหาร จึงอาจเป็นการยากที่จะเลือกตัวอย่างที่ไม่พบการปนเปื้อนของสารทั้ง 4 ชนิด ในตัวอย่างเดียวกัน

ตัวอย่างที่ใช้ในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อนเบื้องต้นของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ปลาทูน่ากระป๋อง 5 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง (ปลาแห้ง/ปลากรอบ) 10 ตัวอย่าง และน้ำปลา 15 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีกนิกเอมีน ได้แก่ Histamine (HIS), Cadaverine (CAD), Putrescine (PUT) และ Tyramine (TYR) ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาด้วย UHPLC-UVD ซึ่งพัฒนามาจากวิธีมาตรฐาน EN ISO 19343:2017[21] โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ก่อนการแยกด้วยคอลัมน์ที่เหมาะสม (Pre-column derivatization) เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิด และวัดปริมาณสารดังกล่าวด้วยเครื่อง UHPLC-UVD โดยเทียบกับสาร 1,7-diaminoheptane ซึ่งใช้เป็น Internal standard

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

กรณีของเนื้อปลา ชั่งตัวอย่างปลาที่บดแล้ว 5.0±0.1 กรัม เติมสารละลายกรด perchloric ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 10 mL ในกรณีผลิตภัณฑ์จากปลา (น้ำปลา) ชั่งตัวอย่าง 2.5±0.05 กรัม และปรับปริมาตรเป็น 10 mL ด้วยกรด perchloric 0.2 M จากนั้นเติมสารละลาย IS ปริมาตร 200 µL ปั่นผสมตัวอย่างโดยใช้เครื่องปั่นผสมความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที นำไปแยกชั้นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

ดูดสารละลายส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 100 µL ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 2 mL เติมสารละลาย sodium carbonate อิ่มตัว ปริมาตร 300 µL และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 10 วินาที เติมสารละลาย dansyl chloride ปริมาตร 400 µL เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร และทำปฏิกิริยาอนุพันธ์โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลานำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้หายร้อนที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย L-proline ปริมาตร 100 µL เขย่าด้วยเครื่องผสมสารและวางไว้ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม toluene ปริมาตร 500 µL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (เพื่อหยุดปฏิกิริยาและกำจัด dansyl chloride ส่วนเกิน) แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C (Mitsubishi Electric, Japan) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที และดูดสารละลายอินทรีย์ส่วนบนใส่ลงใน vial ขนาด 4 mL นำไประเหยที่อุณหภูมิห้องภายใต้แก๊สไนโตรเจน จนแห้งสนิทแล้วเติมสารละลาย 60% acetonitrile ในน้ำ ปริมาตร 200 µL ทันที เขย่าเบา ๆ ด้วยเครื่องผสมสาร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน syringe filter ชนิด PTFE 0.2 µm และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC-UVD

การพัฒนาสภาวะของระบบ UHPLC-UVD

นำวิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017 ในขั้นตอนของการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC มาปรับเปลี่ยนโดยใช้เครื่อง UHPLC-UVD ทดสอบสภาวะของเครื่องมือ ประกอบด้วย ขั้นตอนการเปรียบเทียบ UHPLC column ชนิด C18 ต่างยี่ห้อ การปรับสัดส่วนและ flow rate ของ mobile phase และอุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ (column oven)

การคำนวณความเข้มข้นของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน

คำนวณความเข้มข้นที่ตรวจพบและรายงานในหน่วย mg/kg โดยใช้ความเข้มข้น (mg/mL) จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิด ดังสมการต่อไปนี้

$$CBAs = conc._{BAs} \times \frac{10}{Wt}$$

เมื่อ CBAs คือ ความเข้มข้นของสารกลุ่มไอโบจีนิก-เอมีนแต่ละชนิดที่สกัดได้ (mg/kg)

$conc._{BAs}$ คือ ความเข้มข้น (mg/mL) จากสมการเส้นตรง (mg/mL)

10 คือ ปริมาตรตัวอย่างที่เตรียมในขั้นตอนการสกัด (10 mL)

Wt คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (kg)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

ความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ทดสอบโดยการวิเคราะห์สารละลาย Reagent blank ที่เตรียมโดยการเติม Internal standard ปริมาตร 200 µL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 mL และปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรด perchloric 0.2 M สารละลาย Sample blank เตรียมโดยดำเนินการตามหัวข้อการเตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายตัวอย่างซึ่งเติมสารมาตรฐาน PUT, CAD, HIS และ TYR (Spiked sample) ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg รวมถึง IS จากนั้นนำสารละลายทั้ง 3 ชนิด ผ่านปฏิกิริยาอนุพันธ์และฉีดเข้าเครื่อง UHPLC-UVD ภายใต้สภาวะที่กำหนด เพื่อพิจารณาว่าสัญญาณทั้งหมดที่เกิดขึ้นเป็นสัญญาณจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ไม่ใช่จาก reagent สิ่งปนเปื้อนหรือจากสิ่งอื่น และเพื่อพิจารณาว่าพีคของสาร BAs ทุกชนิดที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างออกมาที่ Retention time (RT) ต่างกันและแยกจากกันอย่างอิสระ

ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการใช้งานกราฟมาตรฐาน (Linearity and working range)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ที่เตรียมขึ้นโดยเติมสารละลายมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 4 ชนิด จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.0025, 0.005, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 และ 0.25 mg/mL และเติม Internal

standard ให้มีความเข้มข้น 0.128 mg/mL ระดับละ 3 ซ้ำ ซึ่งครอบคลุมค่า ML ของสาร Histamine ตามข้อกำหนด EC No 2073/2005[10] วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC-UVD สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (Concentration) ของสารที่สนใจ (แกน X) กับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (Area ratio) ของสารที่สนใจต่อสาร IS (แกน Y) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ คือ $R^2 > 0.990$ และทำกราฟ Residual plot เพื่อดูการกระจายตัวของค่า y-residuals รอบ ๆ แกน X

ช่วงของการใช้งานและ Matrix effect

ทดสอบ Matrix effect โดยการเติมสารมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนลงใน Sample blank ให้มีความเข้มข้นในช่วงของการใช้งาน (Working range) ระดับละ 3 ซ้ำ เพื่อพิจารณาว่าสัญญาณที่ได้จากเครื่อง UHPLC-UVD ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงนั้นเป็นผลมาจากส่วนประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่างหรือไม่ โดยการพลอตกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิด (แกน X) และความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ใน Spiked matrix (แกน Y) เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (Confidence interval, CI)[22] ของ Slope ว่าคลุม 1 หรือไม่ ถ้าคลุมแสดงว่าไม่มี Matrix effect โดยหาค่า CI ดังนี้

$$CI_{slope} = b \pm t_{(0.05,\, n-2)} S_b$$

เมื่อ b คือ Slope

$t_{(0.05,\, n-2)}$ คือ t-distribution (two-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, degree of freedom = n-2

S_b คือ standard deviation ของ slope หาได้จาก $S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$

เมื่อ x_i คือ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน BAs (แกน x)

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน BAs

$S_{y/x}$ หาได้จาก $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$

เมื่อ y_i คือ ความเข้มข้นของ Spiked matrix แต่ละระดับ (แกน y)

$\hat{y}$ คือ $y_{predicted}$ ได้จากการแทนค่าในสมการ linear regression line

n คือ degree of freedom ของ linear regression line

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยนำตัวอย่างปลาและน้ำปลามาวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไบโอจีนิกทั้ง 4 ชนิด จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น ความเข้มข้นเฉลี่ยที่พบใน Sample blank ($\bar{x}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) ของตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด จากนั้นคำนวณค่า LOD ด้วยสูตร $LOD = \bar{x} + 3S$[22] แล้วยืนยันค่า LOD โดยการเติมสารมาตรฐาน BAs ทั้ง 4 ชนิด ลงใน Sample blank ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ LOD ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง UHPLC-UV จำนวน 3 ซ้ำ และหาค่า Signal to Noise (S/N) ซึ่งค่าของ Noise คำนวณด้วยวิธี Root-mean square (RMS) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ $S/N \geq 3$

ประมาณค่า LOQ โดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) และความเข้มข้นเฉลี่ย ($\bar{x}$) จากการทดสอบ LOD ด้วยสูตร $LOQ_{(estimated)} = (\bar{x}) + 10S$[22] และยืนยันค่า LOQ ที่คำนวณได้ โดยวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับค่า $LOQ_{(est.)}$ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิดที่ตรวจพบ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เพื่อประเมินความแม่นและความเที่ยง โดยใช้เกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานอ้างอิงจาก Codex Alimentarius Commission (CODEX) – Procedural Manual 2019[23] ดังนี้ %Recovery อยู่ที่ 80-110%, %RSD ≤ 6.8 และ HorRat < 2

ความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ทดสอบความแม่นโดยการตรวจวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนที่ระดับความเข้มข้นในช่วง working range จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ ระดับ LOQ, ½×ML, 1×ML และที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าจุดสูงสุดของกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้จะต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานก่อนทำการวิเคราะห์โดยค่า ML ที่ใช้อ้างอิงเป็นของสาร Histamine เพียงชนิดเดียวตามข้อกำหนดของ EU (EC No 2073/2005) และนำไปประยุกต์ใช้กับสารอีก 3 ชนิดด้วย ทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน นำความเข้มข้นที่ตรวจวิเคราะห์ได้มาคำนวณค่า %Recovery เพื่อประเมินความแม่น และคำนวณค่า %RSD เพื่อประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ด้วย Horwitz's equation modifed by Thomson และ HorRat โดยใช้เกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานอ้างอิงจาก CODEX – Procedural Manual 2019[23] โดยใช้สมการในการคำนวณ $\%RSD_r$ ดังนี้

$$\%RSD_r = 0.66 \times \%RSD_r$$

เมื่อ $\%RSD_r$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทำซ้ำต่างวัน (Reproducebility)
โดย $\%RSD_r$ หาได้จาก $\%RSD_r = 2^{(1-0.5 \log C)}$

เมื่อ C คือ Concentration ratio[23]

ทดสอบ Intermediate precision โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋องและน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐาน BAs ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 และ 400 mg/kg ตามลำดับ จำนวน 2 ซ้ำ/ตัวอย่าง ต่างวัน จำนวน 7 วัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน และทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างนักวิเคราะห์ 3 คน โดยวิเคราะห์ Spiked sample (ปลาทูน่ากระป๋อง) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 200 mg/kg จำนวน 7 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย และค่า %RSD ประเมินค่าความเที่ยงของ Intermediate precision ด้วย Horwitz's equation modifed by Thomson และ HorRat เช่นเดียวกับการทดสอบ repeatability และประเมินผลการเปรียบเทียบนักวิเคราะห์โดยใช้วิธีทางสถิติ คือ One-Way ANOVA (ANOVA Single factor) ทั้งนี้หากค่า p-value > 0.05 แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่นักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน ตรวจวัดได้นั้น ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทำการควบคุมคุณภาพภายนอกโดยเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) ระหว่างห้องปฏิบัติการจากหน่วยงาน PT Provider ในระดับสากล คือ FAPAS® ด้วยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สาร Histamine ในปลาทูน่ากระป๋อง โดยเข้าร่วมในเดือนตุลาคม ถึง ธันวาคม ค.ศ. 2021 และ 2022 ประเมินผลการทดสอบโดยค่า $-2 \leq$ z-score ≤ 2

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยใช้ Bottom-up approach ตามแนวทางของ Eurachem[24] คำนวณโดยพิจารณาทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ ปริมาตร น้ำหนัก กราฟมาตรฐาน ความเที่ยง ความแม่น และรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า Coverage factor (k) เท่ากับ 2

การสำรวจการปนเปื้อนเบื้องต้นของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์จากปลา

ดำเนินการสำรวจการปนเปื้อนเบื้องต้น ในปี พ.ศ. 2567 มีเกณฑ์การเลือกชนิดตัวอย่างโดยพิจารณาจากฐานข้อมูลปริมาณอาหารที่คนไทยบริโภค (Database of Food Consumption of Thai People) พ.ศ. 2559[25] พบว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากปลาที่คนไทยบริโภคมากที่สุด 5 ลำดับแรก คือ น้ำปลา ปลากรอบ ปลาแห้ง ผลิตภัณฑ์ปลาแห้งปรุงรส และปลาทูน่ากระป๋อง จึงแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย น้ำปลา 15 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง 10 ตัวอย่าง และปลาทูน่ากระป๋อง 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้าและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพฯ และนนทบุรี และทำการวิเคราะห์สาร BAs จำนวน 4 ชนิด ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผล

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม BAs โดยอ้างอิงจากมาตรฐาน ISO 19343:2017[21] ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์สาร Histamine ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาด้วยวิธี HPLC และนำมาดัดแปลงในส่วนของการตรวจวัดปริมาณสารโดยใช้เครื่อง UHPLC-UVD ได้สภาวะที่เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม BAs เป้าหมายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Putrescine, Cadaverine, Histamine และ Tyramine โดยลดระยะเวลาในการวัดปริมาณจาก 30 นาที เหลือเพียง 7 นาที และลดปริมาณ injection volume จาก 20 µL เป็น 5 µL ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบสภาวะของการตรวจวัดปริมาณสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน

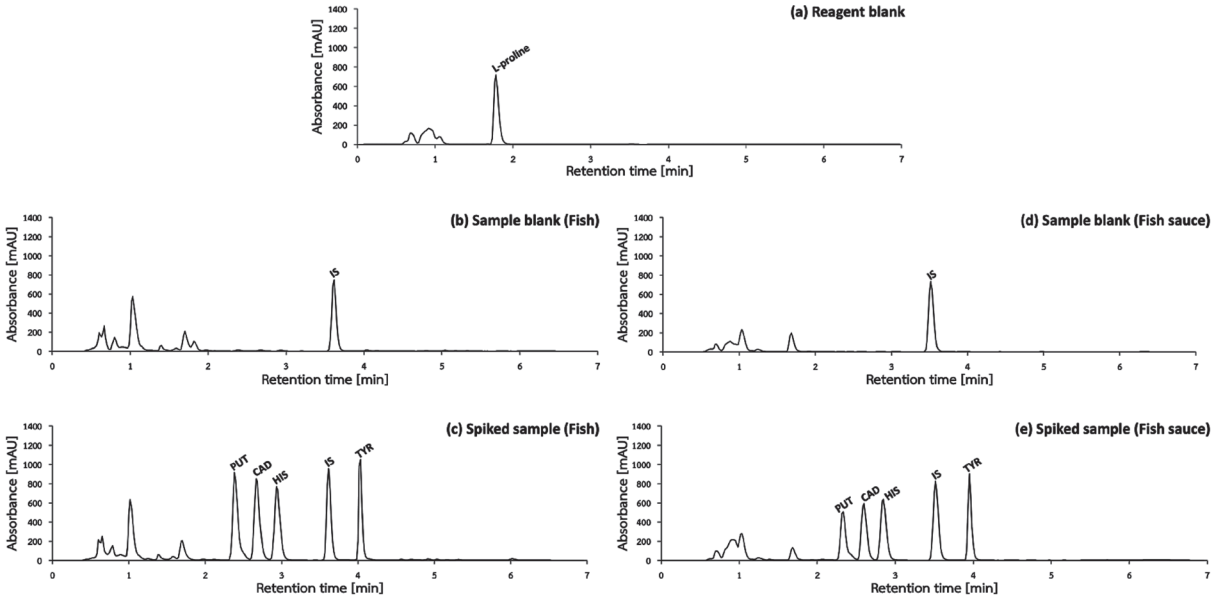
	วิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017	วิธีที่พัฒนา
analytical column:	Kromasil® C18 (4.6 × 250 mm × 5 µm)	XSelect HSS® C18 (3.0 × 100 mm × 2.5 µm)
column temperature (°C):	25	40
mobile phase A:	Acetonitrile	Acetonitrile
mobile phase B:	Deionized water Type I	Deionized water Type I
flow rate (mL/min):	1.0	0.6
injection volume (µL):	20	5
Total run time (min)	30.0	7.0

ตารางที่ 2 ผลการศึกษา Gradient elution program ของอัตราส่วนผสมของ mobile phase A และ B

	วิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017			วิธีที่พัฒนา		
	เวลา (min)	Acetonitrile (%)	Deionized water Type I (%)	เวลา (min)	Acetonitrile (%)	Deionized water Type I (%)
1	0	60	40	0	70	30
2	11.00	75	25	2.30	70	30
3	11.10	95	5	2.45	90	10
4	20.00	95	5	5.00	90	10
5	20.10	60	40	5.10	70	30
6	30.00	60	40	7.00	70	30

ความจำเพาะเจาะจง

จากโครมาโทแกรมของอนุพันธ์สาร PUT, CAD, HIS, TYR และ IS (1,7-diaminoheptane) ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปลาและน้ำปลาด้วยเครื่อง UHPLC-UVD พบว่าในสารละลาย reagent blank มีเพียงพีคของ L-proline ที่ RT ประมาณ 1.8 นาที ซึ่งเติมในขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาอนุพันธ์ และสารละลาย Sample blank ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับ RT ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด รวมถึงพีคของ IS ที่ปรากฏอยู่ในโครมาโทแกรมของ Spiked sample ดังแสดงในภาพที่ 2



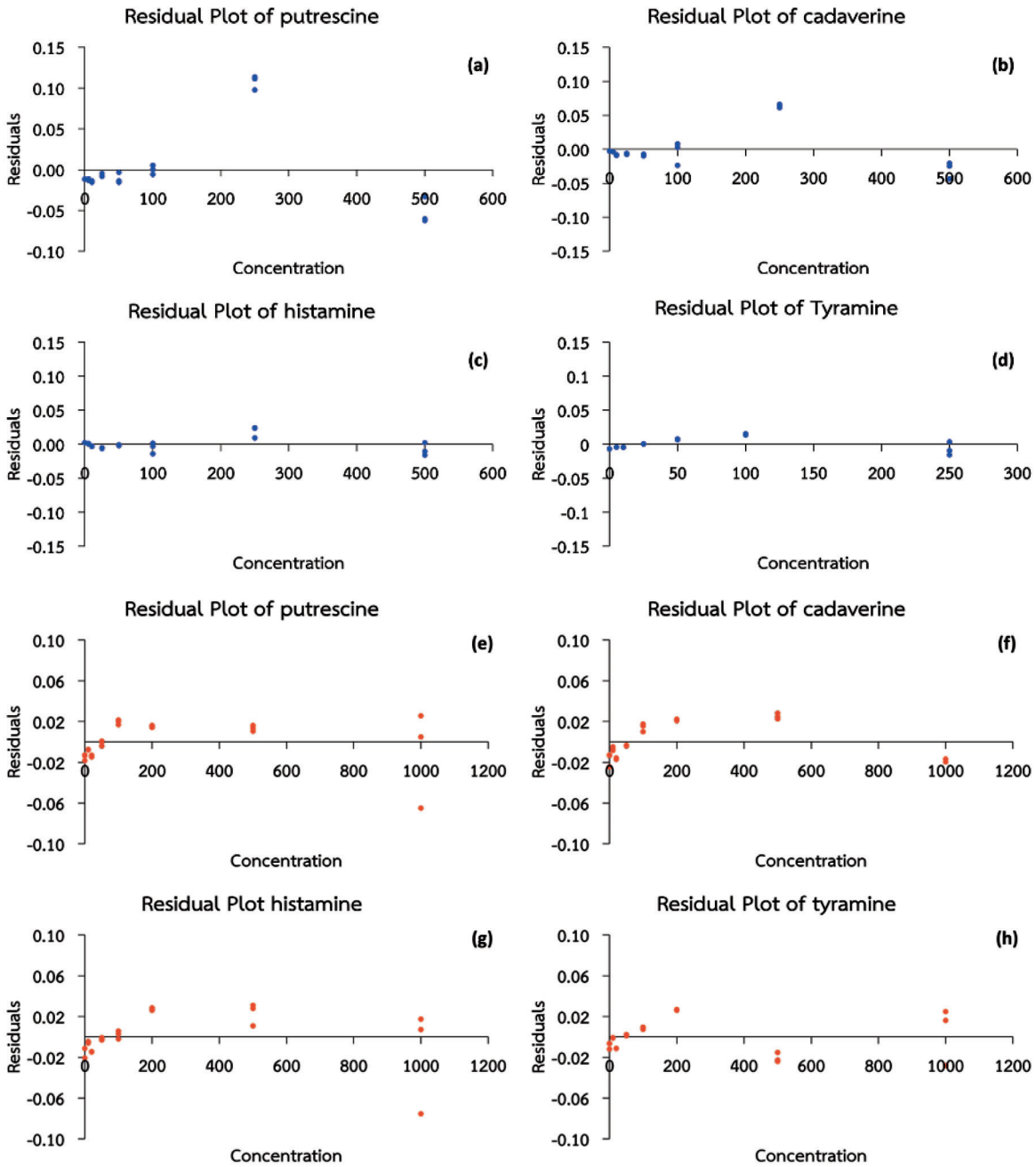
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของอนุพันธ์ Putrescine, Cadaverine, Histamine, Tyramine และ Internal standard (1,7-diaminoheptane) ที่ RT ต่าง ๆ (a) Reagent blank, (b) Sample blank (fish), (c) Spiked sample (fish) 250 mg/kg, (d) Sample blank (fish sauce) และ (e) Spiked sample (fish sauce) 250 mg/kg

ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการใช้งานกราฟมาตรฐาน

เมื่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโดยการวัดปริมาณด้วยเครื่อง UHPLC-UVD และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจ (แกน X) กับ Area ratio ของสารกลุ่ม BAs แต่ละชนิดและ Internal standard (แกน Y) จำนวน 8 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ในช่วง 0–0.25 mg/mL เมื่อประเมินด้วยสายตา พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง ค่า R^2 มีค่า > 0.990 ทั้งนี้กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปลามีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0–0.25 mg/mL (เทียบเท่า 0–500 mg/kg) ยกเว้นสาร TYR เท่ากับ 0–0.125 mg/mL (เทียบเท่า 0–250 mg/kg) ส่วนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำปลามีช่วงความเป็นเส้นตรงกับ 0–0.25 mg/mL (เทียบเท่า 0–1,000 mg/kg) สำหรับสารทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อนำข้อมูลทั้ง 3 ซ้ำ มาทำ residual plot ของสารทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นแต่ละระดับ พบว่าค่า y-residual มีการกระจายของรอบ ๆ ค่าศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา (น้ำปลา)

ชนิดสาร	ช่วงความเข้มข้น (mg/kg)		สมการเส้นตรง		สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2)	
	ปลา	น้ำปลา	ปลา	น้ำปลา	ปลา	น้ำปลา
Putrescine	0–500	0–1,000	y = 9.9774x+0.0115	y = 7.3049x+0.0148	0.9972	0.9990
Cadaverine	0–500	0–1,000	y = 9.7320x+0.0026	y = 7.4792x+0.0168	0.9989	0.9992
Histamine	0–500	0–1,000	y = 8.6783x–0.0026	y = 7.7270x+0.0193	0.9998	0.9984
Tyramine	0–250	0–1,000	y = 6.5686x+0.0066	y = 7.4908x+0.0082	0.9991	0.9994



ภาพที่ 3 กราฟ Residual Plot ของการตรวจวิเคราะห์สารละลายกราฟมาตรฐาน Putrescine, Cadaverine, Histamine ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 500 mg/kg และสาร (d) Tyramine ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 250 mg/kg สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในอย่างตัวอย่างปลา (a-d) และที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 1,000 mg/kg สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในอย่างตัวอย่างน้ำปลา (e-h)

จากผลการทดสอบ Matrix effect ที่ดำเนินการโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร BAs ทั้ง 4 ชนิด ที่เติมลงใน Sample blak ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0–0.25 mg/mL จำนวน 8 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ พบค่า CI ของ Slope ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ของสาร PUT, CAD และ TYR มีค่าไม่ครอบคลุม 1 ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างปลาและน้ำปลาส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิด แต่สำหรับสาร HIS มีค่า CI ครอบคลุม 1 แสดงว่าไม่มี Matrix effect จากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าช่วงของความเชื่อมั่นของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน

ชนิดสาร	ช่วงของการใช้งาน (mg/kg)		ค่าช่วงของความเชื่อมั่น (CI)		สรุป	
	ปลา	น้ำปลา	ปลา	น้ำปลา	ปลา	น้ำปลา
Putrescine	0–500	0–1,000	1.011–1.063	0.725–0.748	มี Matrix effect	มี Matrix effect
Cadavarine	0–500	0–1,000	0.996–1.029	0.767–0.787	ไม่มี Matrix effect	มี Matrix effect
Histamine	0–500	0–1,000	0.992–1.008	0.991–1.002	ไม่มี Matrix effect	ไม่มี Matrix effect
Tyramine	0–250	0–1,000	0.833–0.894	1.003–1.058	มี Matrix effect	มี Matrix effect

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาและน้ำปลา (Sample blank) จำนวน 10 ซ้ำ พบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) ของสาร PUT, CAD, HIS และ TYR อยู่ในช่วง 0.20–1.14 และ 0.07–0.28 mg/kg ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบ ด้วยสูตร LOD = $\bar{x}$+3S[22] จะได้ค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวในตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดสาร ดังนั้นจึงทำการปรับค่า LOD ของทุกสารให้มีค่าเท่ากัน คือ 5 mg/kg ตามหลักการของการกำหนดเกณฑ์สำหรับประเมินคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม (Numeric approach criteria)[26] และมีค่า S/N ของพีคอยู่ในช่วง 35.12–61.37 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของวิธีวิเคราะห์

ชนิดสาร	ชนิดตัวอย่าง							
	ปลา				น้ำปลา			
	Sample blank (mg/kg) Mean±S (n = 10)	calculated LOD (mg/kg)	พิสูจน์ LOD (mg/kg)	Signal to Noise (S/N) n = 3	Sample blank (mg/kg) Mean±S (n = 10)	calculated LOD (mg/kg)	พิสูจน์ LOD (mg/kg)	Signal to Noise (S/N) n = 3
Putrescine	0.43±0.21	1.06	5	50.19	2.61±0.28	3.45	5	36.58
Cadaverine	0.67±0.36	1.75	5	42.44	4.24±0.11	4.56	5	35.12
Histamine	0.09±0.20	0.69	5	36.33	3.90±0.15	4.33	5	35.71
Tyramine	1.59±1.14	5.01	5	61.37	1.60±0.07	1.81	5	53.91

ประมาณค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ด้วยสูตร $LOQ_{(est.)}$ $\bar{x}$+10S[22] (ค่า S จากการทดสอบ LOD ในตารางที่ 5) ได้ค่าอยู่ในช่วง 2.10–12.9 mg/kg แต่เพื่อเป็นการป้องกันการเสื่อมของเครื่อง UHPLC-UVD และคอลัมน์ที่ใช้ ซึ่งอาจทำให้การวิเคราะห์มีความไวต่ำลงจึงกำหนดค่า LOQ ในตัวอย่างปลาและน้ำปลา เท่ากับ 20 mg/kg ผลการยืนยันค่า LOQ พบค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ที่แสดงถึงความแม่นมีค่าอยู่ระหว่าง 92.0–97.3% และ 89.3–102.3% ตามลำดับ ในส่วนความเที่ยงพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าอยู่ระหว่าง 4.06–5.63% และ 2.52–6.75% ตามลำดับ และ HorRat มีค่าอยู่ระหว่าง 0.60–0.83 และ 0.38–0.99 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ความแม่นและความเที่ยง

การทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างปลาและน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐานBAsจำนวน4ชนิดประกอบด้วย PUT, CAD, HIS และ TYR ให้มีความเข้มข้นที่ระดับ LOQ, ½×ML, 1×ML และที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าจุดสูงสุดของกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้ค่า ML ที่นำมาใช้อ้างอิงเป็นของสาร Histamine เพียงชนิดเดียวตามข้อกำหนดของ EU (EC No 2073/2005) และนำไปประยุกต์ใช้กับสารอีก 3 ชนิดด้วย เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดของสารดังกล่าว ผลการทดสอบพบความแม่นของแต่ละระดับความเข้มข้นที่พิจารณาจากค่าเฉลี่ย %Recovery อยู่ในช่วง 92.4–100.9%, 92.0–102.3%, 92.8–101.9% และ 89.3–103.2% ตามลำดับ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) พิจารณาจากค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.61–5.63%, 1.65–4.79%, 1.21–4.06% และ 1.27–6.75% ตามลำดับ รวมถึงค่า HorRat ที่ทุกระดับความเข้มข้นมีค่าอยู่ในช่วง 0.41–0.90, 0.38–0.70, 0.33–0.60 และ 0.32–0.99 ตามลำดับ และการทดสอบ Intermediate precision ในระหว่างปี พ.ศ. 2567 ดำเนินการโดยวิเคราะห์ Spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/kg (ปลาทูน่ากระป๋อง) และ 400 mg/kg (น้ำปลา) พบว่า $\%RSD_i$ ของสาร PUT, CAD, HIS และ TYR มีค่าอยู่ในช่วง 3.49–5.96% และ 2.12–4.98% ตามลำดับ และค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.49–0.82 และ 0.33–0.77 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยง (accuracy and precision)

ชนิดสาร	ชนิดตัวอย่าง	Spiked level (mg/kg)	Accuracy (n = 10)		Precision			
					Repeatability (n = 10)		Intermediate precision (n = 14)	
			Mean±S (mg/kg)	Mean recovery (%)	$\%RSD_r$	HorRat	$\%RSD_i$	HorRat
Putrescine	ปลา	20 (LOQ)	19.1±1.08	95.7	5.63	0.83	–	–
		100	92.4±3.65	92.4	3.95	0.74	–	–
		200	199±8.54	99.6	4.29	0.90	3.49	0.49
		1200	1203±19.4	100.3	1.61	0.44	–	–
	น้ำปลา	20 (LOQ)	19.8±0.54	98.8	2.74	0.41	–	–
		200	196±6.33	97.9	3.23	0.68	–	–
		400	395±7.10	98.6	1.80	0.42	3.58	0.55
		1200	1210±38.49	100.9	3.18	0.88	–	–
Cadaverine	ปลา	20 (LOQ)	18.4±0.88	92.0	4.79	0.70	–	–
		100	94.8±2.61	94.8	2.75	0.52	–	–
		200	194±4.81	97.1	2.48	0.52	5.36	0.74
		1200	1213±22.5	101.1	1.86	0.51	–	–
	น้ำปลา	20 (LOQ)	20.5±0.52	102.3	2.52	0.38	–	–
		200	202±4.23	100.9	2.10	0.44	–	–
		400	406±6.69	101.5	1.65	0.39	3.32	0.51
		1200	1222.8±31.1	101.9	2.54	0.70	–	–

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยง (accuracy and precision) (ต่อ)

ชนิดสาร	ชนิดตัวอย่าง	Spiked level (mg/kg)	Accuracy (n = 10)		Precision			
					Repeatability (n = 10)		Intermediate precision (n = 14)	
			Mean±S (mg/kg)	Mean recovery (%)	%RSD_r	HorRat	%RSD_i	HorRat
Histamine	ปลา	20 (LOQ)	18.9±0.77	94.6	4.06	0.60	–	–
		100 (½×ML)	92.8±2.94	92.8	3.17	0.59	–	–
		200 (1×ML)	194±4.80	97.1	2.47	0.52	5.96	0.82
		1200 (6×ML)	1222±14.7	101.9	1.21	0.33	–	–
	น้ำปลา	20 (LOQ)	19.0±0.53	95.0	2.80	0.41	–	–
		200 (½×ML)	194±5.61	97.0	2.89	0.60	–	–
		400 (1×ML)	390±7.54	97.4	1.93	0.45	2.12	0.33
		1200 (3xML)	1190±21.4	99.1	1.80	0.50	–	–
Tyramin	ปลา	20 (LOQ)	19.1±1.04	95.3	5.44	0.80	–	–
		100	95.6±1.77	95.6	1.85	0.35	–	–
		200	189±8.32	94.4	4.41	0.92	4.43	0.61
		1200	1239±15.72	103.2	1.27	0.35	–	–
	น้ำปลา	20 (LOQ)	17.9±1.20	89.3	6.75	0.99	–	–
		200	199±3.06	99.5	1.54	0.32	–	–
		400	390±7.54	97.4	1.93	0.45	4.98	0.77
		1200	1180±23.04	98.3	1.95	0.54	–	–

หมายเหตุ: 1) จำนวน n = 14 ในการทดสอบ Intermediate precision มาจากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋องและน้ำปลา จำนวน 7 วัน วันละ 2 ซ้ำ

2) ค่า %RSD_r (Repeatability relative standard deviation) คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันที่วิเคราะห์ (Intra-day)

3) ค่า %RSD_i (Relative standard deviation of intermediate precision) คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวันที่วิเคราะห์ (Inter-day)

4) ML = Maximum limit ของสาร Histamine ตามข้อกำหนด EU (EC No 2073/2005)

การเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ระหว่างนักวิเคราะห์ 3 คน โดยวิเคราะห์ Spiked sample (ปลาทูน่ากระป๋อง) ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/kg พบค่า %Recovery และ HorRat อยู่ในช่วง 96.6–100.5% และ 0.22–1.67 ตามลำดับ โดยมีค่า *p*-value > 0.05 ซึ่งบ่งชี้ว่าค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์ระหว่างนักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 7 และผลการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญกับ FAPAS® ระหว่างรอบเดือนตุลาคม ถึง ธันวาคม ค.ศ. 2021 และ 2022 ด้วยการตรวจวิเคราะห์สาร Histamine ในตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋อง (PT-27309, PT-27340) โดยใช้วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเรียบร้อยแล้วและรายงานค่าที่ตรวจวัดได้ในแต่ละครั้ง เท่ากับ 281 และ 361.4 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งผล z-score ที่แสดงถึงความแม่นของการตรวจวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 1.8 และ -0.2 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างนักวิเคราะห์ของการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋องที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/kg (n = 7)

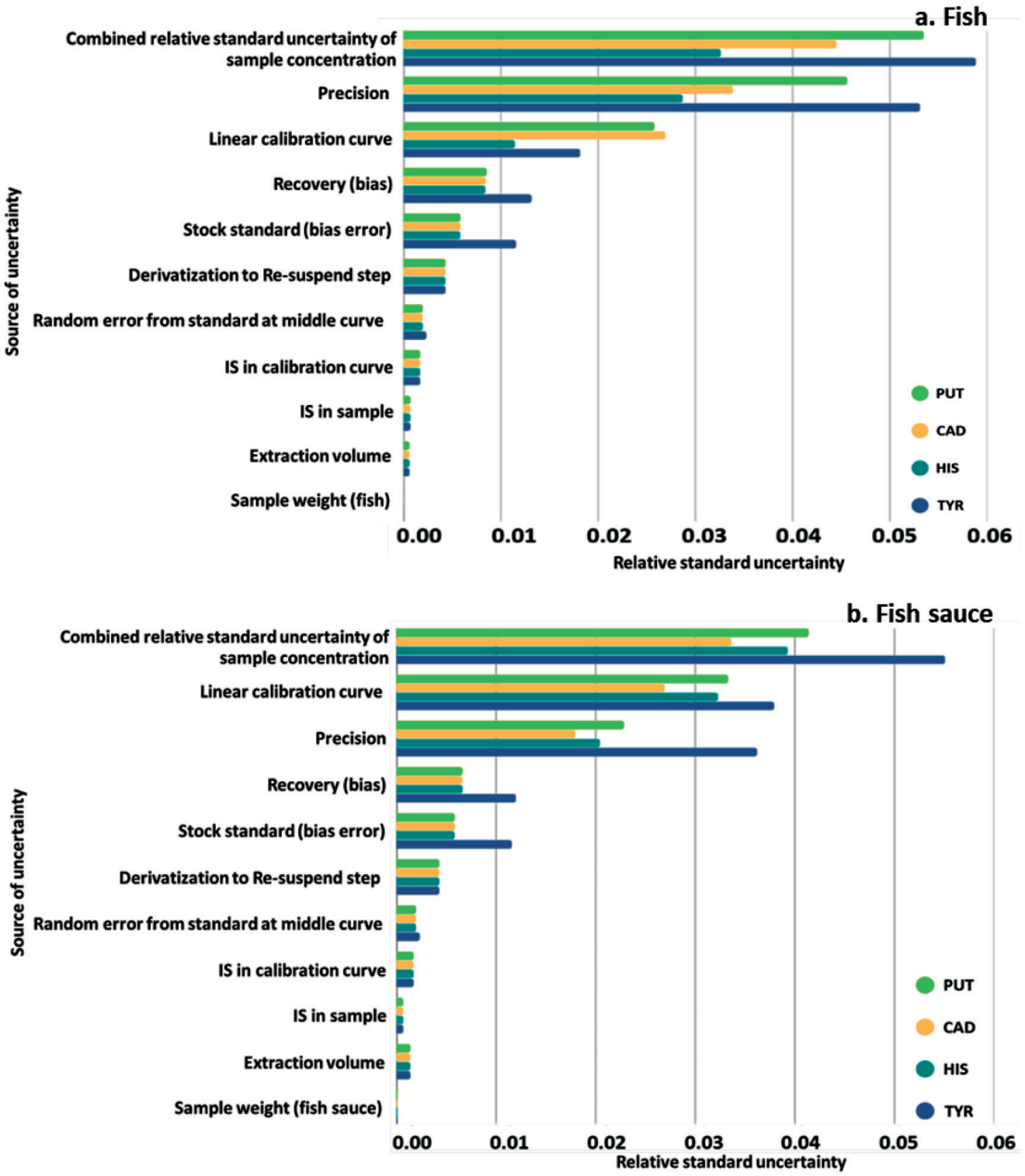
ชนิดสาร	ปริมาณ BAs (mg/kg) Mean±S			Recovery (%) min–max			%RSD (HorRat)			*p*-value
	นักวิเคราะห์ คนที่ 1	นักวิเคราะห์ คนที่ 2	นักวิเคราะห์ คนที่ 3	นักวิเคราะห์ คนที่ 1	นักวิเคราะห์ คนที่ 2	นักวิเคราะห์ คนที่ 3	นักวิเคราะห์ คนที่ 1	นักวิเคราะห์ คนที่ 2	นักวิเคราะห์ คนที่ 3	
Putrescine	200±6.10	200±3.55	198±12.9	93.7–102.8	97.3–102.4	88.7–109.9	3.07 (0.65)	1.77 (0.37)	6.52 (1.37)	0.857
Cadaverine	197±4.96	200±2.48	199±10.1	94.4–101.8	97.8–102.1	91.0–104.3	2.51 (0.53)	1.24 (0.26)	5.07 (1.07)	0.851
Histamine	200±2.72	201±2.08	195±8.58	98.3–102.3	99.3–102.2	90.8–102.7	1.36 (0.29)	1.04 (0.22)	4.40 (0.92)	0.161
Tyramine	193±15.4	198±13.9	196±6.22	83.4–106.8	85.5–105.9	94.8–104.9	7.98 (1.67)	7.01 (1.47)	3.17 (0.66)	0.800

ตารางที่ 8 ผลการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (PT) ในการวิเคราะห์สาร Histamine

ปี	ชนิดอาหาร	Assing value (mg/kg)	ค่าที่รายงาน (mg/kg)	z-score	สรุปผล
2021	Canned Tuna	249	281	1.8	อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ
2022	Canned Tuna	366	361.4	–0.2	อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน 4 ชนิด ในตัวอย่างปลาและน้ำปลา ประกอบด้วย PUT, CAD, HIS และ TYR โดยพิจารณาแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนต่าง ๆ ที่จะส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 4 พบแหล่งความไม่แน่นอนที่มีความสอดคล้องกันในทั้ง 2 ชนิดตัวอย่าง ได้แก่ Precision, ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน, Recovery (bias) ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ขั้นตอนทำปฏิกิริยา Derivatization และปริมาณ Internal standard ทั้งนี้เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty, U) ของสารแต่ละชนิดในตัวอย่างปลาที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า Coverage Factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่า U เท่ากับ 11.6%, 10.0%, 8.0% และ 12.5% ตามลำดับ เมื่อรายงานผลวิเคราะห์ร่วมกับค่าความไม่แน่นอนจะมีค่าเท่ากับ 199±25, 200±18, 200±13 และ201±24 mg/kg ตามลำดับ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างปลาและในตัวอย่างน้ำปลา ได้ค่า U เท่ากับ 9.4%, 8.0%, 8.9% และ 11.9% ตามลำดับ เมื่อรายงานผลวิเคราะห์ร่วมกับค่าความไม่แน่นอนมีค่าเท่ากับ 414±33, 399±27, 403±32 และ 405±57 mg/kg ตามลำดับ



ภาพที่ 4 Relative standard uncertainty ของการวิเคราะห์ Putrescine, Cadaverine, Histamine และ Tyramine ในตัวอย่าง (a) ปลา และ (b) น้ำปลา จากแหล่งความไม่แน่นอนต่าง ๆ

การสำรวจการปนเปื้อนเบื้องต้นของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์จากปลา

ผลการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีกนิกเอมีน ได้แก่ PUT, CAD, HIS และ TYR ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปลา ประกอบด้วย น้ำปลา 15 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง 10 ตัวอย่าง และปลาทูน่ากระป๋อง 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้าและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพฯ และปริมณฑลตรวจพบ PUT 19 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วงน้อยกว่า 20.0–198 mg/kg, CAD 21 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วงน้อยกว่า 20.0–745 mg/kg, HIS 18 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วงน้อยกว่า 20.0–244 mg/kg และ TYR 22 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วงน้อยกว่า 20.0–148 mg/kg ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปลา

ประเภทตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณที่พบ (mg/kg)			
		Putrescine	**Cadaverine**	**Histamine**	**Tyramine**
น้ำปลา	No. 1	150	372	244	114
	No. 2	126	153	89.3	25.1
	No. 3	137	254	122	ไม่พบ
	No. 4	40.3	51.1	น้อยกว่า 20.0	86.6
	No. 5	148	221	117	21.2
	No. 6	151	274	171	น้อยกว่า 20.0
	No. 7	21.8	33.3	น้อยกว่า 20.0	82.1
	No. 8	198	307	149	27.4
	No. 9	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	No. 10	57.9	91.4	49.1	31.9
	No. 11	57.5	107	92.6	25.5
	No. 12	38.8	47.6	น้อยกว่า 20.0	148
	No. 13	23.5	25.1	น้อยกว่า 20.0	น้อยกว่า 20.0
	No. 14	น้อยกว่า 20.0	27.7	22.9	45.5
	No. 15	181	247	137	46.1
	Mean	102.37	157.94	119.39	59.36
	min–max	ไม่พบ–198	ไม่พบ–372	ไม่พบ–244	ไม่พบ–148
	จำนวนรวม	15	15	15	15
	พบ (ร้อยละ)	14 (93.3)	14 (93.3)	14 (93.3)	13 (86.7)
ปลาทูน่ากระป๋อง	No. 1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	No. 2	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	No. 3	ไม่พบ	น้อยกว่า 20.0	น้อยกว่า 20.0	32.2
	No. 4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	24.1
	No. 5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	43.8
	Mean	-	-	-	33.37
	min–max	ไม่พบ	ไม่พบ–น้อยกว่า 20.0	ไม่พบ–น้อยกว่า 20.0	ไม่พบ–43.80
	จำนวนรวม	5	5	5	5
	พบ (ร้อยละ)	0	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)
ผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง/ปลากรอบ	No. 1	21.5	158	ไม่พบ	92.93
	No. 2	65.6	36.0	ไม่พบ	ไม่พบ
	No. 3	128	745	ไม่พบ	38.31
	No. 4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	No. 5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	25.2
	No. 6	น้อยกว่า 20.0	125	88.0	ไม่พบ
	No. 7	34.0	86.8	90.4	น้อยกว่า 20.0
	No. 8	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	No. 9	ไม่พบ	56.7	ไม่พบ	111
	No. 10	ไม่พบ	ไม่พบ	น้อยกว่า 20.0	77.4
	Mean	62.28	201.25	89.20	68.97
	min–max	ไม่พบ–128	ไม่พบ–745	ไม่พบ–90.4	ไม่พบ–111
	จำนวนรวม	10	10	10	10
	พบ (ร้อยละ)	5 (50.0)	6 (60.0)	3 (30.0)	6 (60.0)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปลา (ต่อ)

ประเภทตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณที่พบ (mg/kg)			
		Putrescine	**Cadaverine**	**Histamine**	**Tyramine**
	จำนวนตัวอย่างรวมทั้งสิ้น	30			
	min–max	ไม่พบ–198	ไม่พบ–745	ไม่พบ–244	ไม่พบ–148
	พบรวม (ร้อยละ)	19 (63.3)	21 (70.0)	18 (60.0)	22 (73.3)

หมายเหตุ: 1) มาตรฐานสหภาพยุโรป (EC No 2073/2005) ตรวจพบสาร Histamine ในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์น้ำที่มีกรดอะมิโน Histidine สูง ได้ไม่เกิน 200 mg/kg และสำหรับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยน้ำเกลือ (น้ำปลา) ตรวจพบได้ไม่เกิน 400 mg/kg

2) ข้อกำหนด มกษ. 7015-2549 กำหนดเกณฑ์การเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ปลาทูน่าและโบนิโตในภาชนะบรรจุปิดสนิท ให้ตรวจพบสาร Histamine ได้ไม่เกิน 100 mg/kg

วิจารณ์

สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน (BAs) เป็นสารที่มีเอกสารการศึกษาวิทยาศาสตร์ที่บ่งชี้ว่า สารบางชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์โดยเฉพาะสาร Histamine ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ[27] ทั้งนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม BAs ได้โดยใช้เทคนิค Fluorometry ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่เผยแพร่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 และสามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม BAs ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ Histamine[17] ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนแบบ Multi-compound ประกอบด้วย สาร PUT, CAD, HIS และ TYR ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาด้วยเทคนิค HPLC โดยนำวิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017[21] ที่เผยแพร่เมื่อปี พ.ศ. 2560 มาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และวัดปริมาณด้วยเครื่อง UHPLC-UVD เปรียบเทียบกับสาร IS (1,7-diaminoheptane)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม BAs ในตัวอย่างปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่สนใจได้แก่ PUT, CAD, HIS และ TYR สามารถแยกพีคของสารทั้งหมดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สารละลาย Reagent blank พบพีคขนาดใหญ่ของ L-proline ที่ RT ประมาณ 1.8 นาที เนื่องจากไม่ถูกใช้ไปในขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาอนุพันธ์ของสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน ทั้งนี้การวัดปริมาณด้วยเครื่อง UHPLC-UVD ใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 7 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017 ที่ใช้เวลานานถึง 30 นาที เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัด ลดพลังงานไฟฟ้า และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อปลามีความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ใช้งานอยู่ในช่วง 0–500 mg/kg ยกเว้นสาร Tyramine อยู่ในช่วง 0–250 mg/kg ส่วนการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำปลามีความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ใช้งานอยู่ในช่วง 0–1,000 mg/kg โดยสารทุกชนิดมีค่า R^2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ ≥ 0.990 และการพิสูจน์ Matrix effect พบว่าองค์ประกอบในตัวอย่าง (matrix) ส่งผลกระทบต่อการตรวจวัดสาร Putrescine, Cadaverine และ Tyramine ทั้งในตัวอย่างปลาและน้ำปลาจึงต้องเตรียมสารละลายที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Matrix matched โดยการใช้สารสกัดmatrix blank เป็นตัวทำละลายแทนสารละลายกรด perchloric 0.2 M ตามคำแนะนำของ Duflos G และคณะ ที่ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีมาตรฐาน ISO 19343:2017 และเผยแพร่ไว้ในปี ค.ศ. 2018[28] ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) สารทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ 5 mg/kg โดยมีค่า S/N มากกว่า 3 และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 20 mg/kg คิดเป็นหนึ่งส่วนสี่สิบและหนึ่งส่วนสิบเท่าของค่า ML ของสาร Histamine ในเนื้อปลา

รวมถึงคิดเป็นหนึ่งส่วนแปดสิบและหนึ่งส่วนยี่สิบเท่าของค่า ML ของสาร Histamine ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยน้ำเกลือ (น้ำปลา) ตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป[10] ทั้งนี้ได้นำค่ากำหนดดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับสารอีก 3 ชนิดด้วย เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดของสารเหล่านั้นจึงถือว่าทั้ง LOD และ LOQ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน CODEX[23] ที่กำหนดให้ LOD และ LOQ จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับหนึ่งในสิบเท่าและหนึ่งในห้าเท่าของค่า ML (เมื่อค่า ML > 0.1 mg/kg) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า LOD และ LOQ ของวิธีที่พัฒนามีความเหมาะสม นอกจากนี้ผลการศึกษาความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างปลาและน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐาน BAs ทั้ง 4 ชนิด จำนวน 4 ระดับความเข้มข้น ในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน พบว่าวิธีวิเคราะห์มีความแม่น ความเที่ยง และค่า HorRat อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ CODEX กำหนด โดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 90–107, %RSDr ≤ 16 และ HorRat < 2 ตามลำดับ และการศึกษา Intermediate precision โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋องและน้ำปลาที่เติมสารมาตรฐาน BAs ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 mg/kg และ 400 mg/kg ตามลำดับ พบว่าค่า %RSD ≤ 16 และ HorRat < 2 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ทั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋องแทนปลาแพนกาเซียสในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างนักวิเคราะห์ จำนวน 3 คน ซึ่งดำเนินการในปี พ.ศ. 2567 พร้อมกับการสำรวจการปนเปื้อนเบื้องต้น พบว่า *p*-value มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่นักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน ตรวจวัดได้นั้นไม่มีความแตกต่างกัน รวมถึงได้เข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในตัวอย่างปลาทูน่ากระป๋องซึ่งจัดโดย FAPAS® เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพภายนอก (External quality control) พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($-2 \leq$ z-score ≤ 2)

เมื่อทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ Bottom-up approach และพิจารณาจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสาร BAs ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k = 2) พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนมีความสอดคล้องกันในทั้ง 2 ชนิดตัวอย่าง คือ ความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ โดยค่าความไม่แน่นอนขยาย (U) ของการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างปลาและน้ำปลา อยู่ในช่วง 8.0–12.5% และ 8.0–11.9% ตามลำดับ ซึ่งค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's RSD_r ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเหมาะสม และสอดคล้องตามเกณฑ์การพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน

จากผลการสำรวจการปนเปื้อนสารกลุ่ม BAs เบื้องต้นในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปลาทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง ไม่พบตัวอย่างใดที่มีปริมาณการปนเปื้อนเกินกว่าค่า ML ซึ่งมีเพียงสาร Histamine เท่านั้นมีค่าปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ ตามข้อกำหนดสหภาพยุโรป EC No 2073/2005[10] คณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (CODEX)[11] รวมถึงมาตรฐานของประเทศไทย[13] แต่สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนอีก 3 ชนิด ยังไม่มีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลความเป็นพิษเพียงพอในมนุษย์[29] อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างในการสำรวจครั้งนี้อาจมีจำนวนน้อยเกินไป และเป็นการเก็บตัวอย่างที่ยังไม่ครอบคลุมทั่วทุกภาคของประเทศ ทำให้ไม่เป็นตัวแทนที่ดีของผลิตภัณฑ์จากปลาที่จำหน่ายภายในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนสำรวจการปนเปื้อนสารกลุ่ม BAs ที่มีความครอบคลุมทั่วประเทศและสอดคล้องกับการบริโภคของคนไทยอย่างแท้จริง

สรุป

วิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาได้มีความจำเพาะเจาะจง ความแม่น และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์การยอมรับและน่าเชื่อถือสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Putrescine, Cadaverine, Histamine และ Tyramine ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ลดลง สามารถตรวจวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้มากขึ้น

ประหยัดสารเคมี ต้นทุนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีให้ผลอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ และใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่สามารถเปิดให้บริการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2565 ทดแทนวิธีเดิมซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้เพียงสาร Histamine เพียงชนิดเดียว จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังสามารถใช้ผลการสำรวจเบื้องต้นของการปนเปื้อนสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์จากปลาที่ดำเนินการในปี พ.ศ. 2567 เป็นแนวทางการวางแผนการตรวจติดตาม เฝ้าระวังปริมาณการปนเปื้อนสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในอาหารต่างๆ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและอาจใช้เป็นข้อมูลนำเข้าพื้นฐาน (Baseline data) ของประเทศไทยในการพิจารณากำหนดค่า Maximum limit ของอาหารประเภทอื่นๆ ในประเทศไทยได้อีกด้วย

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ไม่มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ (Artificial Intelligence: AI) ช่วยในการเขียนหรือจัดทำต้นฉบับบทความ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินโครงการ ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะ และขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินโครงการ ตลอดจนเครื่องมือ และอำนวยความสะดวก ซึ่งทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Yoshinaga DH, Frank HA. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Appl Environ Microbiol 1982; 44(2): 447–52.
2. Özogul Y, Özogul F. Biogenic amines formation, toxicity, regulations in food. In: Saad B, Tofalo R, editors. Food chemistry, function and analysis. [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2019. [cited 2025 Mar 21]; [17 screens]. Available from: URL: https://books.rsc.org/books/monograph/796/chapter-abstract/535686.
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations, editor. Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. Rome: Food and Agriculture Association of the United Nations; 2013.
4. Hwang DF, Chang SH, Shiua CY, Chai T. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 693(1): 23–9.
5. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel); Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, et al. Risk assessment of N-nitrosamines in food. EFSA J 2023; 21(3): e07884. (278 pages).
6. European Food Safety Authority (EFSA). Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. EFSA Support Publ 2017; 14(9): EN-1301. (37 pages).
7. Hwang CC, Kung HF, Lee YC, Wen SY, Chen PY, Tseng DI, et al. Histamine fish poisoning and histamine production by *Raoultella ornithinolytica* in milkfish surimi. J Food Prot 2020; 83(5): 874–80.
8. นลินี หงษ์ชุมพล, ธราวิทย์ อุปพงษ์, จิระวรรณ พึ่งสกุล, อมรรัตน์ หาญตั๊ะ, วิชาญ ปาวัน, มุทิตะ ชลามาตย์ และคณะ. การสอบสวนการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากสารฮิสตามีนในปลาทูน่า โรงงานผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง จังหวัดสมุทรปราการ กรกฎาคม 2550. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 2550; 38(36): 629–36.
9. กองอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. อย. เตือนรับประทานแมลงทอดด้วยความระวัง ผู้มีประวัติโรคภูมิแพ้ หอบหืด ควรหลีกเลี่ยง. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 1 ธ.ค. 2568]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://food.fda.moph.go.th/consumer-alertnews/food-safety-news-124.

10. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. [online]. 2005; [cited 2025 Mar 21]. Available from: URL: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073.
11. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Revision of the code of practice for fish and fishery products (cxc 52-3002) and revisions of the section on sampling, examination and analyses related to histamine food safety. [online]. Panama; 2018 Nov. Report No.: CX/FH 18/50/6. [cited 2025 Mar 21]. Available from: URL: https://www.fao.org/fao-who-codex-alimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-712-50%252FWD%252Ffh50_06e.pdf.
12. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ 7014-2548 ปลาแล่เยือกแข็ง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 11 ง. (วันที่ 25 มกราคม 2549).
13. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ 7015-2549 ปลาทูน่าและโบนิโตในภาชนะบรรจุปิดสนิท. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนที่ 131 ง. (วันที่ 21 ธันวาคม 2549).
14. JOINT FAO/WHO Food Standards Programme. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX committee on fish and fishery products. [online]. Bergen, Norway; 2014 Feb. Report No.: CX/FFP 14/33/12. [cited 2025 Mar 21]. Available from: URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news_events/Histamine_Final_Report.pdf.
15. Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna: relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. J Agric Food Chem 1997; 45(6): 2036-41.
16. Fücker K, Meyer R, Pietsch HP. Dünnschichtelektrophoretische Bestimmung biogener Amine in Fisch und Fischprodukten im Zusammenhang mit Lebensmittelintoxikationen. Nahrung 1974; 18(6): 663-9.
17. AOAC 977.13: Histamine in seafood--fluorometric method. In: Official methods of analysis of AOAC International. 19th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2012.
18. Lieber ER, Taylor SL. Specificity and sensitivity of seven histamine detection methods. J Food Sci 1977; 42(6): 1584-6.
19. Tomkins BA, Ostrum VH, Ho C h. Derivatization of primary aromatic amines with fluorescamine. Anal Lett 1980; 13(7): 589-602.
20. Aminot A, Kérouel R. The determination of total dissolved free primary amines in seawater: critical factors, optimized procedure and artefact correction. Mar Chem 2006; 98(2): 223-40.
21. ISO 19343:2017 Microbiology of the food chain - Detection and quantification of histamine in fish and fishery products - HPLC method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
22. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
23. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Codex Alimentarius Commission: procedural manual. 27th ed. [online]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2019. [cited 2025 Mar 21]. Available from: URL: http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca2329en.
24. Ellison SLR, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2012.

25. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ฐานข้อมูลปริมาณอาหารที่คนไทยบริโภค. [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 12 พ.ย. 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.acfs.go.th /files/files/attach-files/867_20190606145951_625162.pdf.
26. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1 (Standard methods for food analysis volume I). [ออนไลน์]. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2554. [สืบค้น 21 มี.ค. 2568]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/standard-methods-1.
27. Roe AL, Boyte ME, Elkins CA, Goldman VS, Heimbach J, Madden E, et al. Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. Regul Toxicol Pharmacol 2022; 136: 105266. (36 pages).
28. Duflos G, Inglebert G, Himber C, Degremont S, Lombard B, Brisabois A. Validation of standard method EN ISO 19343 for the detection and quantification of histamine in fish and fishery products using high-performance liquid chromatography. Int J Food Microbiol 2019; 288: 97–101.
29. Ladero V, Calles-Enríquez M, Fernández M, Álvarez MA. Toxicological effects of dietary biogenic amines. Curr Nutr Food Sci 2010; 6: 145–56.

Development and Validation of the Analytical Method of Biogenic Amines in Fish and Fishery Products using UHPLC-UVD

Aekgphoonnada Yenuthok, Sirichai Sunya, Piyawat Paengphua, Vorapong Prommana, and Pusaya Sangvirun

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Histamine, cadaverine, putrescine and tyramine are most common biogenic amines (BAs), found in aquatic animals and fermented fishery products. Many countries, including Thailand, have set regulations to control histamine contamination. The objectives of this study were to develop and validate an analytical method for determination of histamine, cadaverine, putrescine and tyramine in fish and fishery products, based on ISO 19343:2017, which analyse only histamine by HPLC-UVD. The method was further developed to analyse multi-compounds and to quantify using UHPLC-UVD in order to reduce run time from 30 to 7 minutes. The results of method validation showed high specificity. The linear working range of the method in fish was 0–500 mg/kg (except for Tyramine, 0–250 mg/kg) while the linear working range in fish source was 0–1,000 mg/kg. The developed method has a limit of detection of 5 mg/kg and a limit of quantitation of 20 mg/kg. Accuracy and precision evaluated at four concentration levels showed recoveries in the range of 80.0–108.6%, with HORRAT values < 2. All performance characteristics of the method met the acceptance criteria. In addition, participation in proficiency testing in 2021 and 2022 for histamine in canned fish which obtained an acceptable z-score ($-2 \leq$ z-score ≤ 2). A preliminary survey of 30 fishery products revealed no histamine levels exceeding both Thai and international standards. However, no regulatory limits of cadaverine, putrescine, and tyramine currently exist. In conclusion, the developed method is suitable and reliable for the quantitative analysis of histamine, cadaverine, putrescine and tyramine in fish and fishery products using UHPLC-UVD.

Keywords: Biogenic amines, Fish, Fish products, UHPLC-UVD