

การตรวจหาปริมาณสารไพมารีอะโรมาติกเอมีนใน วัสดุสัมผัสอาหารด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

Determination of primary aromatic amines in food contact materials by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข¹, พัฒนนิภา วงศ์พิชัย¹, สมภพ ลาภวิบูลย์สุข¹

Jutathip Lapviboonsuk¹, Patnipa Wongpichai¹, Sompop Lapviboonsuk¹

รับบทความ 22 ธันวาคม 2566 แก้ไขบทความ 4 มีนาคม 2567 ยอมรับตีพิมพ์ 4 มีนาคม 2567

บทคัดย่อ

การตรวจวัดสาร Primary aromatic amines (PAAs) ในวัสดุสัมผัสอาหาร จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ Aniline (ANL), o-Anisidine (o-ASD), 4-chloro-aniline (4-CA), 4-chloro-o-toluidine (4-CoT), 2,6-dimethylaniline (2,6-DMA), 4,4'-methylenedianiline (4,4'-MDA), 4,4'-methylenedi-o-toluidine (4,4'-MDoT), 2-methoxy-5-methylaniline (2-M-5-MA), m-phenylenediamine (m-PDA) และ o-toluidine (o-T) ได้ดำเนินการโดยสกัดสาร PAAs ด้วยสารละลายตัวแทนอาหารเป็นกรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตาม Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods, 2014 แสดงค่าการตรวจวัดต่ำสุด (Limit of detection; LOD) และค่าการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ) เท่ากับ 2 และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การพิสูจน์ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.00 - 20.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สาร PAAs ทุกชนิดมีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดมากกว่า 0.995 นอกจากนี้ได้ตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีความถูกต้องและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตาม 2002/657/EC ดังนั้นวิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ทดสอบสาร PAAs ดังกล่าวได้

คำสำคัญ: ไพมารีอะโรมาติกเอมีน วัสดุสัมผัสอาหาร โพลีเอไมด์ ไนลอนสีด้า ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

¹กองผลิตภัณฑ์อาหารและวัสดุสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Abstract

The determination of primary aromatic amines (PAAs) in food contact materials involved the examination of ten specific types of PAAs: Aniline (ANL), o-Anisidine (o-ASD), 4-chloro-aniline (4-CA), 4-chloro-o-toluidine (4-CoT), 2,6-dimethylaniline (2,6-DMA), 4,4'-methylenedianiline (4,4'-MDA), 4,4'-methylenedi-o-toluidine (4,4'-MDoT), 2-methoxy-5-methylaniline (2-M-5-MA), m-phenylenediamine (m-PDA) and o-toluidine (o-T). The extraction solution for PAAs, known as food simulant, was 3% (w/v) acetic acid at 100 °C, which analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The method validation according to Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2014, limit of detection and limit of quantitation were 2 and 10 microgram per kilogram, respectively. To prove linearity within the range of 2.00 - 20.0 nanograms per milliliter, each type of PAA was assessed, yielding a coefficient of determination above 0.995. Moreover, accuracy and precision were investigated at 3 concentration levels: 10, 25 and 50 micrograms per kilogram which met the requirement of 2002/657/EC. Therefore, this test method fit in the application of PAAs testing.

Keywords: Primary aromatic amine, Food contact materials, Polyamide, Black nylon, Liquid chromatography - tandem mass spectrometry

¹Division of Food Products and Food Contact Material, Department of Science Service

^{*}Corresponding author e-mail address: jutathip@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

การปนเปื้อนของสารไพรมารีอะโรมาติกเอมีน (Primary aromatic amines; PAAs) พบในวัสดุสัมผัสอาหาร (Food contact materials, FCMs) จำพวกพลาสติก เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องครัวที่ผลิตจากพลาสติกชนิดโพลีเอไมด์ (Polyamide) หรือไนลอน (Nylon) ที่ผลิตไม่ได้มาตรฐานและสีจากหมึกพิมพ์ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของสาร PAAs เช่น บรรจุภัณฑ์อาหารที่เคลือบด้วยโพลีเอทีเรน และอุปกรณ์เครื่องครัวที่ผลิตจากโพลีเอไมด์หรือไนลอน ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง ราคาถูกและไม่ทำให้เกิดรอยกับผิวภาชนะอื่น โดยในกระบวนการผลิตพลาสติกมีการใส่สีเช่น สีเอโซ (Azo dyes) ซึ่งใช้สาร PAAs เป็นสารตั้งต้นในการผลิตและการผลิตโพลีเอทีเรนที่มีการเติมสีและเคลือบเงาจึงทำให้สารไอโซไซยานเอทอิสระ (Free isocyanates) อาจหลงเหลือจากกระบวนการผลิตโมโนเมอร์ที่ใช้ในการผลิต เมื่อพลาสติกสัมผัสกับน้ำที่อยู่ในอาหาร สารไอโซไซยานเอทจะเปลี่ยนเป็นสาร PAAs และเคลื่อนย้ายจากพลาสติกไปสู่อาหารได้ โดย Aniline (อนิลีน; ANL) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุดและจัดเป็นโครงสร้างหน่วยย่อยในกลุ่ม PAAs [1-2] สาร PAAs จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง รวมทั้งเป็นสารที่เป็นต้นเหตุของการกลายพันธุ์และสารก่อภูมิแพ้ นอกจากนี้สารกลุ่ม PAAs เช่น 4,4'-methylenedianiline (4,4'-MDA) เป็นสารซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [3] และอนิลีนทำให้เกิดอาการ ที่เลือดไม่สามารถนำออกซิเจนไปเลี้ยงร่างกายได้ตามปกติหรือเรียกว่า Methemoglobinemia [4] จากการศึกษาทางนิเวศวิทยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสารกลุ่ม PAAs ในสหภาพยุโรป พบว่า มีการรายงานการปนเปื้อนของสาร PAAs ในตัวอย่างวัสดุสัมผัสอาหารจำนวนมาก เช่น การเคลื่อนย้ายของอนิลีนจากเครื่องครัวชนิดไนลอนสีดำ (Black nylon) ที่ผลิตหรือมีส่วนประกอบของโพลีเอไมด์ เมื่อต้มในน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เนื่องจากความร้อนจะละลายสีในโพลีเมอร์พลาสติกออกมา [1] นอกจากนี้ ในปี 2547-2552 ผลการสุ่มตัวอย่างเครื่องครัวจำนวน 136 ตัวอย่าง แล้วสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวน 30 ตัวอย่างที่พบปริมาณ PAAs เกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนดและส่วนใหญ่ผลิตจากประเทศจีน [3] การปนเปื้อนของ PAAs ในปี 2552 พบมีจำนวน 33 ตัวอย่างที่ปริมาณเกินเกณฑ์มาตรฐาน จากทั้งหมด 84 ตัวอย่าง โดย 4,4'-MDA มีการเคลื่อนย้ายมากที่สุด รองลงมา คือ อนิลีน และ 3,3'-Dimethylbenzidine (3,3'-DMB) ตามลำดับ [5] การตรวจพบการปนเปื้อนของสาร PAAs ทำให้สหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบเกี่ยวกับวัสดุและสิ่งของที่ทำจากพลาสติกที่สัมผัสอาหารโดยตรง ใน Annex I ของ Regulation 10/2011 ซึ่งระบุว่าสารจำพวก PAAs ต้องไม่ถ่ายเทจากวัสดุสัมผัสอาหารไปสู่อาหารในปริมาณไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม [6] ถือเป็นค่า Specific migration limit (SML) ที่อนุญาตให้อาหารสัมผัส PAAs ได้ ต่อมาในปี 2554 สหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบเพิ่มเติมตาม Regulation 284/2011 เกี่ยวกับการนำเข้าอุปกรณ์เครื่องครัวโพลีเอไมด์และเมลามีนจากประเทศจีนและเขตปกครองพิเศษฮ่องกง รายงานการวิเคราะห์อุปกรณ์เครื่องครัวโพลีเอไมด์สีดำในปี 2557 ยังคงพบการเคลื่อนย้ายของ PAAs จำนวน 11 ตัวอย่างจาก 25 ตัวอย่างในปริมาณที่เกินมาตรฐาน [7] นอกจากนี้การปนเปื้อนของ PAAs ยังพบได้ในเครื่องครัวสีน้ำตาลที่เก็บตรวจในปี 2548 และ 2550 จำนวน 8 ตัวอย่าง จาก 21 ตัวอย่างที่เกินมาตรฐาน [2] และในปี พ.ศ. 2563-2565 สหภาพยุโรปมีการแจ้งเตือน 77 ครั้ง เกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารไพรมารีอะโรมาติกเอมีนในวัสดุสัมผัสอาหาร โดยส่วนใหญ่ตรวจพบในวัสดุสัมผัสอาหารจากประเทศจีน [8] สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกา มีการตรวจสอบปริมาณ PAAs ในอุปกรณ์ครัวที่ทำจากพลาสติกหลายชนิดและหลายสี จำนวน 45 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน 8 ตัวอย่างที่ PAAs เกินค่ามาตรฐานทั้งในพลาสติกสีดำ สีส้ม และสีน้ำเงิน สาเหตุมาจากการเติมสีในกระบวนการผลิต และทั้งพลาสติกที่ผลิตจากประเทศจีนและสหรัฐอเมริกาเอง มีการพบ PAAs ในการเคลื่อนย้ายครั้งแรก (first migration) [9] นอกจากนี้ในปี 2564 ได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบโดยใช้เทคนิค Capillary zone electrophoresis (CE) ร่วมกับ tandem mass spectrometry (MS/MS) และช่วงการวัดได้ต่ำที่ 0.2 - 1.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม การปนเปื้อนของ PAAs ในตัวอย่างโพลีเอไมด์ ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานสูงถึงร้อยละ 38 ซึ่งผลิตจากประเทศจีนคิดเป็นร้อยละ 25 และประเทศบราซิลคิดเป็นร้อยละ 13 [10] และในปี 2564 เช่นกันได้มีการพัฒนาวิธีหาสาร PAAs จำนวน 24 ชนิดในสารละลายตัวแทนอาหารโดยเทคนิค Solid phase extraction (SPE) และ LC-MS/MS พบว่ามีประสิทธิภาพตามเกณฑ์ Commission Regulation No. 10/2011 มีค่าช่วงการวัดที่ต่ำที่สุด 0.15 ไมโครกรัมต่อลิตร [11] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อหาปริมาณการเคลื่อนย้ายของสาร PAAs จากวัสดุสัมผัสอาหารประเภทเครื่องครัว เช่น ทัพพี

และตะหลิว โดยครอบคลุมการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดด้วยเทคนิค MS/MS ที่ทำให้สามารถวัดปริมาณสาร PAAs ได้จำนวน 10 ชนิดในคราวเดียวกัน ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก EUR 24815 EN 2011 [12]

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์

สารมาตรฐาน มีความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99 จำนวน 10 ชนิด โดยแสดงชนิดของสารมาตรฐานและ CAS No. ดังตารางที่ 1 และกรดเพนตะฟลูออโรโพรพิโอนิก (Pentafluoropropionic acid (PFPA)) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 97 ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ AR ผลิตโดย Sigma - Aldrich เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน เมทานอลชั้นคุณภาพวิเคราะห์ HPLC หรือ LC ผลิตโดย Merck และกรดอะซิติก ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ GR ผลิตโดย Merck การเตรียมสารละลายต่าง ๆ ใช้น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่าความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ•cm

ตารางที่ 1 ชนิดของสารมาตรฐานและ CAS No.

ลำดับที่	ชนิดสารมาตรฐาน	คำย่อ	CAS No.
1	m-Phenylenediamine	m-PDA	108-45-2
2	Aniline	ANL	62-53-3
3	o-Anisidine	o-ASD	90-04-0
4	o-Toluidine	o-T	95-53-4
5	4-Chloro-aniline	4-CA	106-47-8
6	2,6-Dimethylaniline	2,6-DMA	87-62-7
7	2-Methoxy-5-methylaniline	2-M-5-MA	120-71-8
8	4,4'-Methylenedianiline	4,4'-MDA	101-77-9
9	4-Chloro-o-toluidine	4-CoT	95-69-2
10	4,4'-Methylenedi-o-toluidine	4,4'-MDoT	838-88-0

2.2 สารละลายและวิธีเตรียม

- 2.2.1 สารละลายกรดเพนตะฟลูออโรโพรพิโอนิกในน้ำ ความเข้มข้น 4.7 มิลลิโมลาร์ (เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase))
เติมกรดเพนตะฟลูออโรโพรพิโอนิก 0.504 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
- 2.2.2 สารละลายกรดเพนตะฟลูออโรโพรพิโอนิกในเมทานอล ความเข้มข้น 4.7 มิลลิโมลาร์ (เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase))
เติมกรดเพนตะฟลูออโรโพรพิโอนิก 0.504 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 1000 มิลลิลิตร
- 2.2.3 สารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 3 น้ำหนักโดยปริมาตร
ชั่งแก๊สอะซิติก จำนวน 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
- 2.2.4 สารมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีน (Stock standard solution) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ชั่งสารมาตรฐานเอมีน จำนวน 25 ± 0.1 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) 50 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นของสารละลายในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารมาตรฐานอื่นๆ เช่นเดียวกันดังนี้ ANL, o-ASD, 4-CA, 4-CoT, 2,6-DMA, 4,4'-MDA, 4,4'-MDoT, 2-M-5-MA m-PDA และ o-T
- 2.2.5 สารละลายมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีนผสม (Mixed standard solution) ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายในข้อ 2.2.4 (Stock standard solution) มาสารมาตรฐานละ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

2.2.6 สารละลายมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีนผสมแบบเจือจาง (Diluted mix solution) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายในข้อ 2.2.5 (Mixed standard solution) จำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติก ร้อยละ 3

2.2.7 สารละลายมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีน ความเข้มข้น 0 - 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (0, 2, 5, 10, 15 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

เติมสารละลายตัวแทนอาหารจำลอง (Food simulant) คือ กรดอะซิติก ร้อยละ 3 จำนวน 4 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายในข้อ 2.2.6 ที่ปริมาตร 0, 200, 500, 1000, 1500 และ 2000 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติก ร้อยละ 3 จากนั้นกรองสารละลายเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยสร้างกราฟมาตรฐานแบบถ่วงน้ำหนัก ($1/x$)

2.3 การเตรียมตัวอย่าง ดำเนินการตาม EUR 24815 EN 2011 [12]

การเตรียมกรดอะซิติกร้อยละ 3 โดยให้ความร้อนจนอุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส แล้วถ่ายสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 3 ที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใส่ลงบีกเกอร์แก้วที่มีตัวอย่าง (วัสดุสัมผัสอาหารประเภทเครื่องครัว คือ ทัพพี) จำนวน 3 ชิ้นหรือ 3 ชุดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงเทสารละลายที่ได้เก็บไว้โดยนับเป็นสารละลายตัวแทนอาหารครั้งที่ 1 แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS หากไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานไม่ต้องทำการทดสอบต่อ แต่ถ้าเกินเกณฑ์ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จะได้สารละลายตัวแทนอาหารครั้งที่ 2 และสารละลายตัวแทนอาหารครั้งที่ 3 ทำการทดสอบโดยแยกทดสอบเป็นชิ้นหรือชุดตัวอย่าง แล้วนำสารละลายตัวแทนอาหารครั้งที่ 3 ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

2.4 การควบคุมคุณภาพ

การเตรียม Standard check สารละลายมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีน โดยเลือกเตรียมที่ระดับความเข้มข้น 1 ระดับ จาก 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมเช่นเดียวกันกับข้อ 2.2.7 และกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 0.20 หรือ 0.22 ไมโครเมตรลงในขวดขนาดเล็กสำหรับฉีดเข้ากับเครื่อง LC-MS/MS

2.5 การตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

2.5.1 นำสารละลายมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีนผสม ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลที่กรองผ่านแผ่นเมมเบรน ขนาด 0.20 หรือ 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดขนาดเล็กสี่ขา ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS ตามสภาวะเครื่อง LC-MS/MS ที่เหมาะสมในการทดสอบ โดยพัฒนาวิธีการตรวจวัดให้เหมาะสมกับสาร PAAs จำนวน 10 ชนิด ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก EUR 24815 EN 2011 [12] ดังนี้

คอลัมน์:	คอลัมน์ LC-MS/MS ชนิด stainless steel ขนาด 2.1×150 และการ์ดคอลัมน์ 2.1×5 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Zorbax SB-C3 ขนาดอนุภาค 5.0 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์:	40 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด:	3 ไมโครลิตร
วัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหล:	ตามตารางที่ 2
เครื่องตรวจวัด:	MS detector ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 เฟสเคลื่อนที่และอัตราการไหล

เวลา (นาที)	A, % PFPA 4.7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ	B, % PFPA 4.7 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)
0.00	95	5	0.200
3.00	80	20	0.200
7.50	20	80	0.500
8.00	20	80	0.500
11.0	95	5	0.500
14.0	95	5	0.200

ตารางที่ 3 สภาวะของเครื่อง MS detector

No.	Analytes	Retention time (RT; min)	MRM traces		Fragment energy (Frag; V)	Collision energy (CE; V)
			Precursor ion (MS1)	Product ion (MS2)		
1	m-PDA	8.611	109.1	92.1	90	22
			109.1	65.1	90	22
2	ANL	10.938	94.1	77.1	20	17
			94.1	51.0	20	30
3	o-ASD	14.224	124.1	109.1	100	17
			124.1	80.1	100	29
4	o-T	14.450	108.2	91.1	120	17
			108.2	65.1	120	29
5	4-CA	14.664	128.1	93.1	80	18
			128.1	111.2	80	18
6	2,6-DMA	15.098	122.2	105.1	110	18
			122.2	107.1	110	14
7	2-M-5-MA	15.165	138.2	123.1	100	17
			138.2	106.0	100	25
8	4,4'-MDA	15.239	199.1	106.2	130	22
			199.1	77.2	140	50
9	4-CoT	15.287	142.0	107.2	110	18
			142.0	125.2	110	18
10	4,4'-MDoT	15.608	227.2	120.2	150	22
			227.2	178.2	150	22

2.5.2 ตรวจสอบสมรรถนะของเครื่อง LC-MS/MS โดยการฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 1 ระดับออกจาก 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างน้อย 3 ซ้ำ เพื่อกำหนดค่า System suitability ตาม US Pharmacopoeia โดยมีเกณฑ์การยอมรับดังนี้

- Relative standard deviation (RSD) of area < 2%
- RSD of RT < 2%

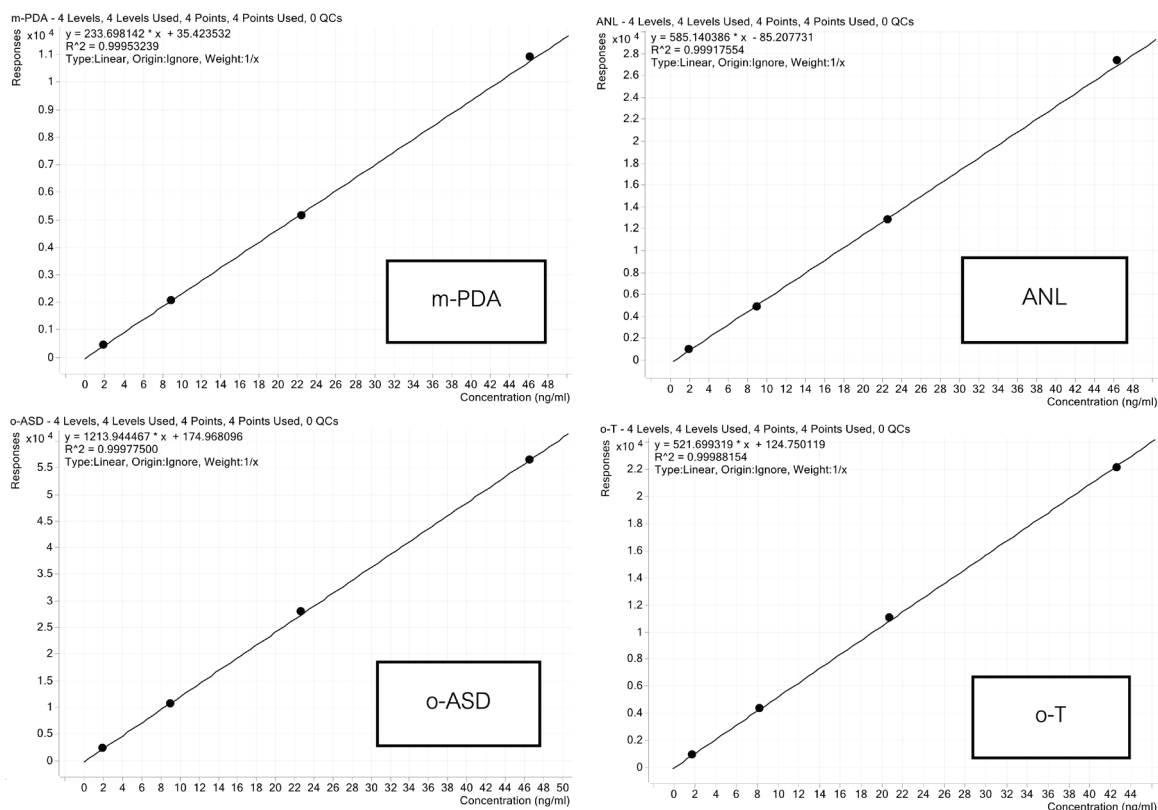
2.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การทดสอบตัวอย่างแบบลงค์และตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือใกล้เคียงศูนย์จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อประมาณค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ ซึ่งในที่นี้ทำการเติมที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอีก 2 ระดับความเข้มข้น คือ 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบความเข้มข้นที่ระดับกลางและสูงของช่วงการวัด แล้วคำนวณร้อยละการคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีทดสอบ นอกจากนี้ ได้ดำเนินการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ 0, 2.00, 5.00, 10.0, 15.0 และ 20.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

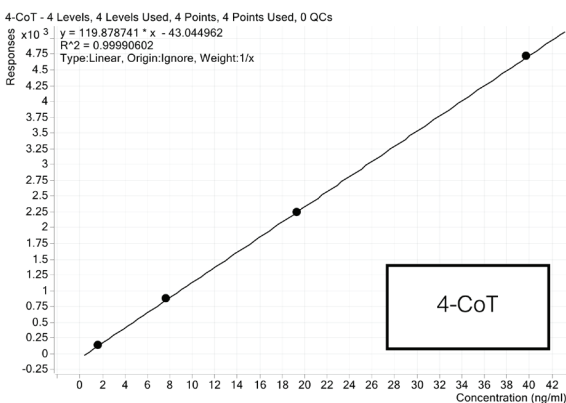
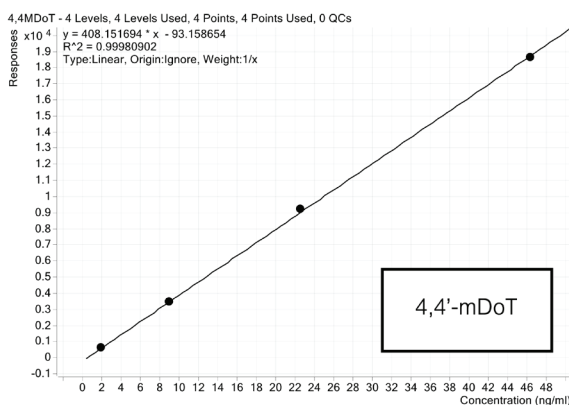
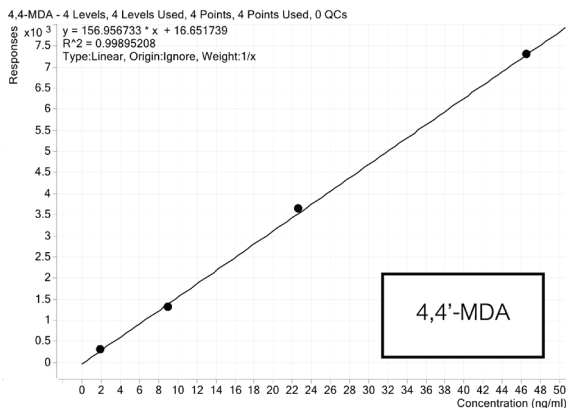
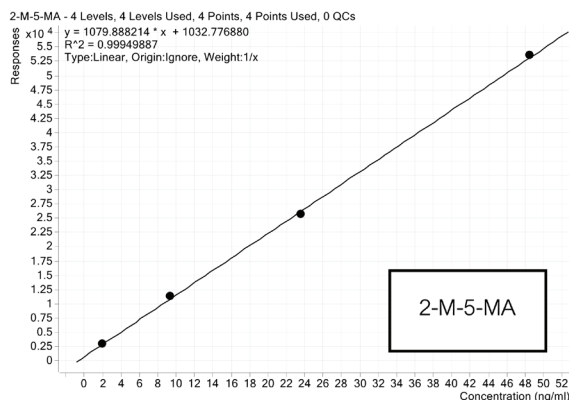
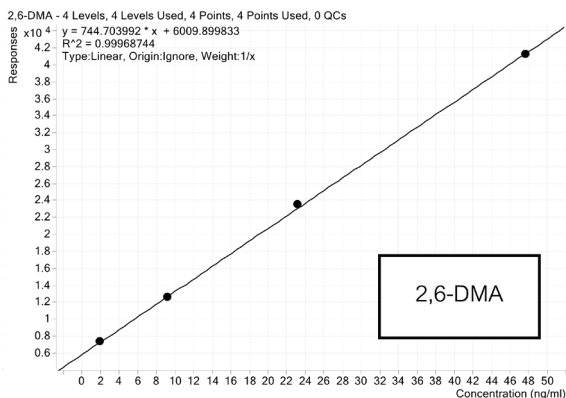
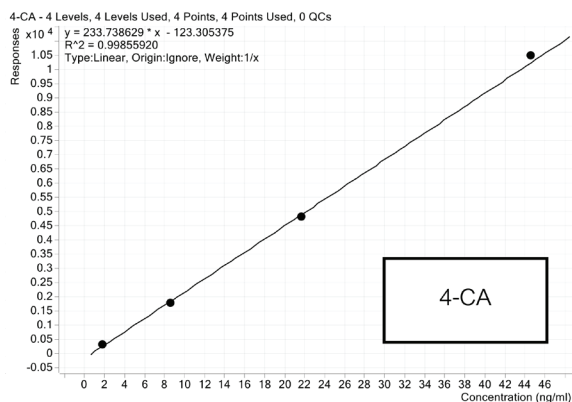
3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของสารมาตรฐานไพรมารีอะโรมาติกเอมีน

ศึกษาโดยการทดสอบสารมาตรฐานที่ 5 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0, 2.00, 5.00, 10.0, 15.0 และ 20.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และรูปแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจและพื้นที่ใต้กราฟซึ่งตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ชนิด MS detector ดังรูปที่ 1 และตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟด้วยค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination, R^2) โดยสาร PAAs ทุกชนิดให้ค่า R^2 มากกว่า 0.99 ตามมาตรฐานวิธีกำหนด [12] ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.99856 - 0.99991



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Primary aromatic amine จำนวน 10 ชนิด และพื้นที่ใต้กราฟซึ่งตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ ชนิด MS detector



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Primary aromatic amine จำนวน 10 ชนิด และพื้นที่ใต้กราฟซึ่งตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ ชนิด MS detector (ต่อ)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของ Primary aromatic amine

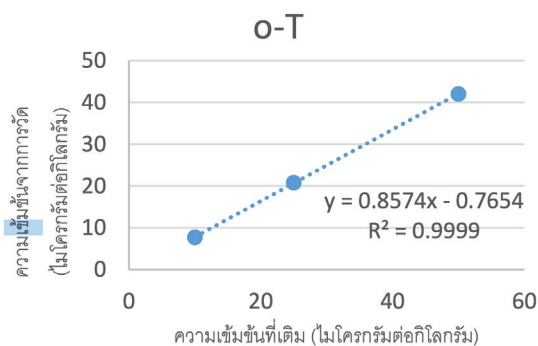
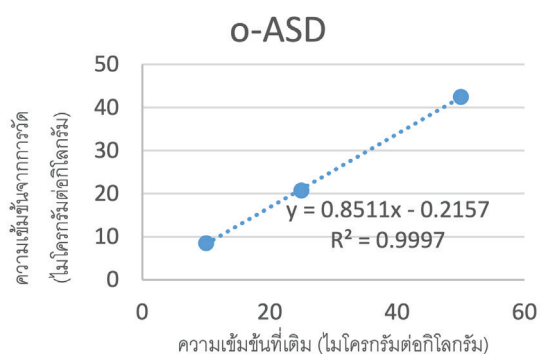
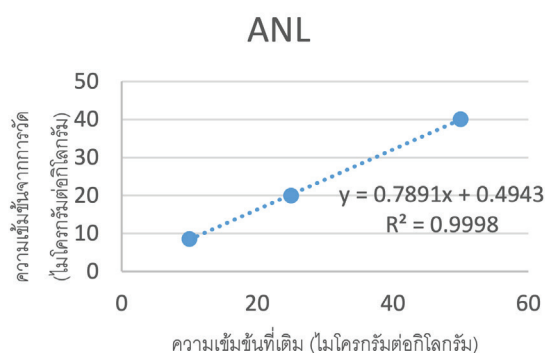
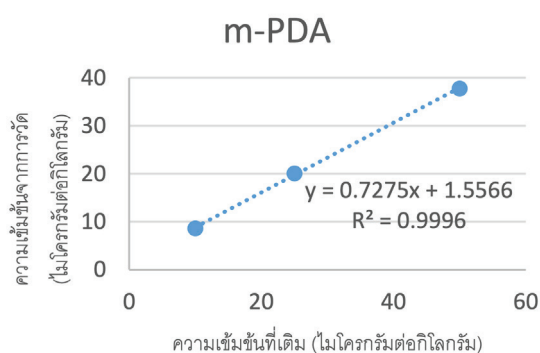
ลำดับที่	ชนิดของสาร	สัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination, R^2)
1	m-PDA	0.99953
2	ANL	0.99918
3	o-ASD	0.99978
4	o-T	0.99988
5	4-CA	0.99856

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของ Primary aromatic amine (ต่อ)

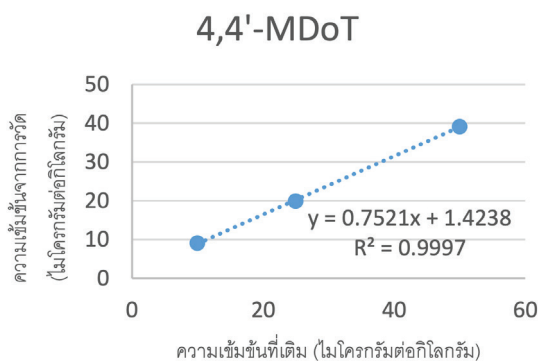
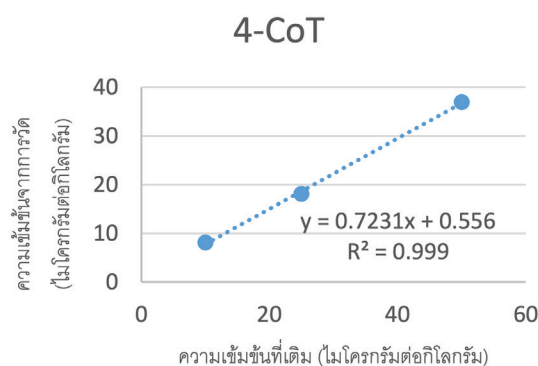
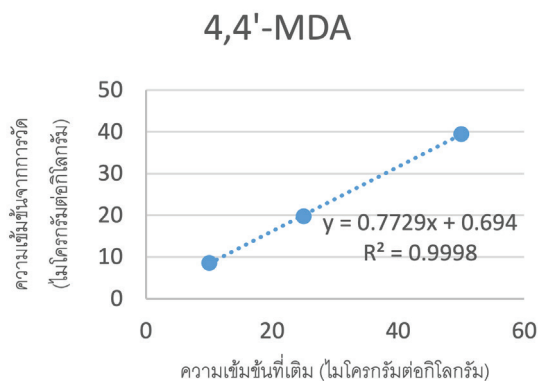
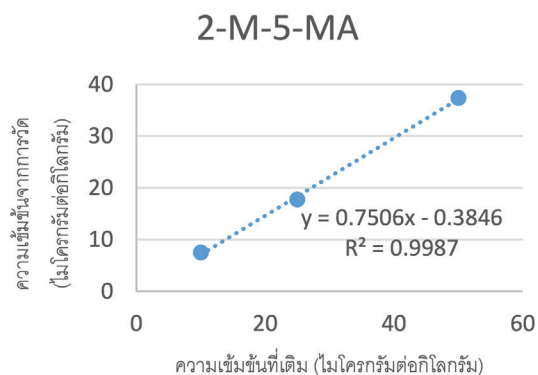
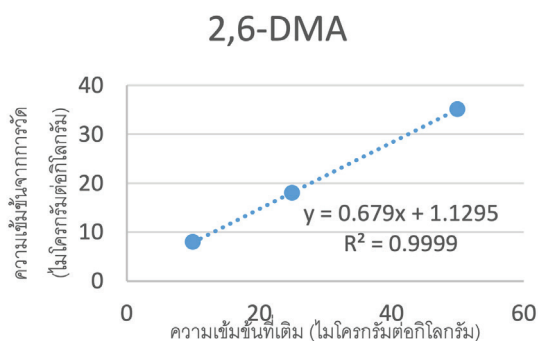
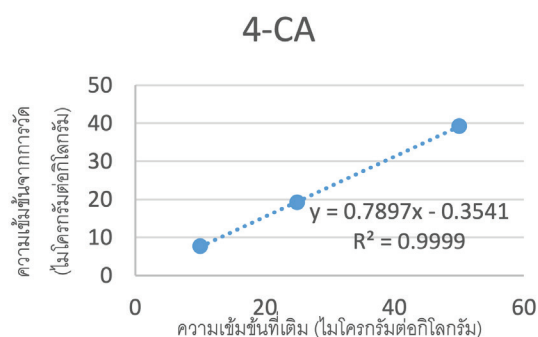
ลำดับที่	ชนิดของสาร	สัมประสิทธิ์การกำหนด (Coefficient of determination, R^2)
6	2,6-DMA	0.99968
7	2-M-5-MA	0.99950
8	4,4'-MDA	0.99895
9	4-CoT	0.99991
10	4,4'-MDoT	0.99981

3.2 การทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range) ในวัสดุสัมผัสอาหาร

ศึกษาโดยทดสอบตัวอย่างแบบลบล้าง (Blank sample) และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spiked sample) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10.0, 25.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับตาม 2002/657/EC คือ 70 - 110% ที่ระดับ 1 - 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 80 - 110% ที่ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แสดงช่วงการใช้งานของการตรวจวัดสารที่สนใจระหว่างความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่เติมและค่าที่วัดได้ในหน่วยไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังในรูปที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าช่วงการใช้งาน มีค่าอยู่ในช่วง 50.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว



รูปที่ 2 ช่วงการใช้งานของการตรวจวัด Primary aromatic amines
ระหว่างความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่เติมและค่าที่วัดได้ ในหน่วย ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 2 ช่วงการใช้งานของการตรวจวัด Primary aromatic amines
ระหว่างความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่เติมและค่าที่วัดได้ ในหน่วย ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ต่อ)

3.3 การหาขีดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ศึกษาโดยทดสอบตัวอย่างแบบลบล้างจำนวน 6 ซ้ำตามหลักเกณฑ์ของ Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2014 [13] และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ คือ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 6 ซ้ำ ดังตารางที่ 5-6

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Primary aromatic amines ของตัวอย่างแบบลงค์และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ ที่	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)										
	ตัวอย่าง แบบลงค์	m-PDA	ANL	o-ASD	o-T	4-CA	2,6-DMA	2-M-5-MA	4,4'-MDA	4-CoT	4,4'-MDoT
1	ไม่พบ	7.98	8.4	8.39	7.48	7.37	8.91	7.38	9.55	9.94	8.68
2	ไม่พบ	8.45	8.39	8.75	7.56	7.51	7.73	8.28	8.46	7.99	8.35
3	ไม่พบ	8.94	8.82	9.20	7.62	7.76	8.80	7.60	8.42	8.17	10.9
4	ไม่พบ	8.84	9.07	8.77	7.46	7.84	7.51	7.68	8.39	7.13	9.18
5	ไม่พบ	8.52	8.53	8.42	8.18	7.59	7.30	7.17	8.18	8.22	9.13
6	ไม่พบ	8.94	8.11	7.53	8.02	7.85	7.68	6.95	8.54	7.29	8.55
	ค่าเฉลี่ย	8.61	8.55	8.51	7.72	7.65	7.99	7.51	8.59	8.12	9.13
	SD	0.37	0.34	0.56	0.3	0.19	0.69	0.47	0.48	1.00	0.92
	S ₀	0.22	0.20	0.32	0.18	0.11	0.40	0.27	0.28	0.58	0.53
	LOD	0.65	0.60	0.97	0.53	0.34	1.19	0.81	0.84	1.73	1.59
	LOQ	2.16	1.99	3.25	1.76	1.12	3.97	2.69	2.8	5.78	5.29

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Primary aromatic amines แสดงร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ ที่	ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)									
	m-PDA	ANL	o-ASD	o-T	4-CA	2,6-DMA	2-M-5-MA	4,4'-MDA	4-CoT	4,4'-MDoT
1	79.5	84.0	83.9	73.5	73.7	89.1	72.6	95.5	99.4	86.8
2	84.5	83.7	86.2	74.3	75.1	77.3	81.5	84.6	79.9	83.5
3	89.4	88.1	90.6	74.8	76.8	88	74.8	84.2	81.7	108.6
4	88.4	90.6	86.4	73.3	77.7	74.7	75.6	83.9	71.3	91.6
5	85.2	85.2	83.0	85.5	78.1	72.6	74.1	94.5	86.8	91.2
6	89.4	84.2	78.0	84.3	81.2	76.3	72.2	99.2	77.3	92.2
ค่าเฉลี่ย	86.1	86.0	84.7	77.6	77.1	79.7	75.2	90.3	82.7	92.3
SD	3.85	2.77	4.20	5.66	2.58	7.06	3.38	6.82	9.62	8.66

จากการคำนวณตามสูตร Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2014 [13] และตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยง พบว่าค่า LOD มีระดับความเข้มข้นที่ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ ที่ระดับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 71.3 - 108.6 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ 70-110% ตาม Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC) [14]

3.4 ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

การตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง และสูง) ดังนี้ 10, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 6 ซ้ำ ตามที่ระบุไว้ใน Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2014 [13] จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า ที่ระดับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง

75.1 - 92.3 และ $\%RSD_R$ อยู่ระหว่าง 2.54 - 12.3 และที่ระดับ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 80.0 - 97.0 และ $\%RSD_R$ มีค่าอยู่ระหว่าง 3.24 - 11.2 และที่ระดับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 85.3 - 98.3 และ $\%RSD_R$ มีค่าอยู่ระหว่าง 2.96 - 15.4 ดังนั้นค่าร้อยละการคืนกลับหรือ $\%recovery$ มีค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ คือ 70 - 110% ที่ระดับ 1 - 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 80 - 110% ที่ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ $\%RSD_R$ ไม่เกิน 23% ตาม 2002/657/EC [14] ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี EUR 24815 EN 2011 [12] พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดสาร PAAs จำนวน 10 ชนิดได้อย่างมีความถูกต้องและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับเช่นเดียวกัน และมีช่วงการใช้งานกว้างขึ้นที่ 50.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่า SD ของการทดสอบนี้ในตัวอย่างเครื่องครัวด้วยสารละลายตัวแทนอาหาร มีความแปรปรวนอยู่ในระดับที่มากกว่าการทดสอบสาร PAAs ในตัวอย่างลามิเนต โดยค่า SD สูงสุดอยู่ที่ 13.4 [15]

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Primary aromatic amines ของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 10.0, 25.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (n=6)

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นที่เติม (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ (\pm SD) (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ค่าร้อยละการคืนกลับ (\pm SD) (%Recovery)	$\%RSD_R$ ของปริมาณที่ตรวจ วัดได้
m-PDA	10.0	8.61 \pm 0.37	86.1 \pm 3.85	4.34
	25.0	20.1 \pm 2.25	85.6 \pm 7.40	11.2
	50.0	37.8 \pm 5.81	86.1 \pm 13.4	15.4
ANL	10.0	8.55 \pm 0.34	86.0 \pm 2.77	4.02
	25.0	20.0 \pm 0.87	97.0 \pm 4.33	4.38
	50.0	40.0 \pm 1.18	98.3 \pm 3.25	2.96
o-ASD	10.0	8.51 \pm 0.56	84.7 \pm 4.20	6.61
	25.0	20.7 \pm 0.75	91.7 \pm 1.68	3.64
	50.0	42.5 \pm 2.58	94.8 \pm 3.64	6.08
o-T	10.0	7.72 \pm 0.30	77.6 \pm 5.66	3.94
	25.0	20.8 \pm 1.29	94.5 \pm 4.95	6.20
	50.0	42.0 \pm 2.82	96.2 \pm 5.57	6.71
4-CA	10.0	7.65 \pm 0.19	77.1 \pm 2.58	2.54
	25.0	19.2 \pm 0.67	87.6 \pm 3.17	3.48
	50.0	39.2 \pm 1.33	90.2 \pm 3.37	3.39
2,6-DMA	10.0	7.99 \pm 0.69	79.7 \pm 7.06	8.61
	25.0	18.0 \pm 0.68	85.9 \pm 6.73	3.77
	50.0	35.1 \pm 1.03	86.3 \pm 5.82	2.94
2-M-5-MA	10.0	7.51 \pm 0.46	75.1 \pm 3.38	6.20
	25.0	17.8 \pm 1.05	80.9 \pm 3.74	5.90
	50.0	37.4 \pm 2.63	85.8 \pm 3.89	7.04

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Primary aromatic amines ของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 10.0, 25.0 และ 50.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (n=6) (ต่อ)

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นที่เติม (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ (\pm SD) (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ค่าร้อยละการคืนกลับ (\pm SD) (%Recovery)	%RSD _R ของปริมาณที่ตรวจ วัดได้
4,4'-MDA	10.0	8.59 \pm 0.48	90.3 \pm 6.82	5.64
	25.0	19.7 \pm 0.89	89.1 \pm 5.94	4.52
	50.0	39.4 \pm 1.99	88.0 \pm 4.95	5.05
4-CoT	10.0	8.12 \pm 1.00	82.7 \pm 9.62	12.3
	25.0	18.1 \pm 0.57	80.0 \pm 2.78	3.24
	50.0	36.9 \pm 1.04	85.3 \pm 2.24	2.83
4,4'-MDoT	10.0	9.13 \pm 0.92	92.3 \pm 8.66	10.0
	25.0	19.9 \pm 0.96	88.9 \pm 2.62	4.81
	50.0	39.1 \pm 2.30	90.0 \pm 5.96	5.88

3.5 การทดสอบในตัวอย่างเครื่องครัว

การสุ่มเก็บตัวอย่างเครื่องครัว (ทัพพี) จากร้านค้า จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อยืนยันวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้น พบว่า วิธีการทดสอบนี้สามารถนำมาใช้กับการทดสอบสาร PAAs จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ m-PDA, ANL, o-ASD, o-T, 4-CA, 2,6-DMA, 2-M-5-MA, 4,4'-MDA, 4-CoT และ 4,4'-MDoT

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ Primary aromatic amines ของตัวอย่างเครื่องครัว จำนวน 5 ตัวอย่าง

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) (\pm SD) (n = 3)									
	m-PDA	ANL	o-ASD	o-T	4-CA	2,6-DMA	2-M-5-MA	4,4'-MDA	4-CoT	4,4'-MDoT
ตัวอย่าง 1	ไม่พบ	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ
ตัวอย่าง 2	ไม่พบ	< 10	ไม่พบ	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	41.9 \pm 2.0	ไม่พบ	ไม่พบ
ตัวอย่าง 3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	< 10	ไม่พบ	ไม่พบ
ตัวอย่าง 4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ตัวอย่าง 5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	<10	ไม่พบ	ไม่พบ

4. สรุป (Conclusion)

การพัฒนาวิธีทดสอบสาร Primary aromatic amines ในวัสดุสัมผัสอาหาร ได้ดำเนินการตาม Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2014 [13] โดยศึกษาสาร PAAs จำนวน 10 ชนิด ดังนี้ m-PDA, ANL, o-ASD, o-T, 4-CA, 2,6-DMA, 2-M-5-MA, 4,4'-MDA, 4-CoT และ 4,4'-MDoT ซึ่งแสดงค่าการตรวจวัดต่ำสุด (LOD) 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมและค่าการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.00 - 20.0 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่า สาร PAAs ทุกชนิดมีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดมากกว่า 0.995 นอกจากนี้ ได้ตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีความถูกต้องเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตาม 2002/657/EC [14] ดังนั้น วิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้ในการทดสอบสาร PAAs ดังกล่าวได้

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Brede C, Skjevrak I. Migration of aniline from polyamide cooking utensils into food simulant. Food Addit. Contam. 2004;21:1115-1124.
- [2] Sendón R, Bustos J, Sánchez JJ, Paseiro P, Cirugeda ME. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of primary aromatic amines migrating from cooking utensils, and its application to real samples. Food Addit. Contam.: Part A. 2010;27(1): 107-117.
- [3] Trier X, Okholm B, Foverskov A, Binderup ML, Petersen JH. Primary aromatic amines (PAAs) in black nylon and other food-contact materials, 2004 - 2009. Food Addit. Contam.: Part A. 2010;27(9):1325-1335.
- [4] Kiroška-Petreska E, Memeti S, Kostik V. Health safety on plastic materials that come into contact with food - migration of primary aromatic amines. J. Hygien. Eng. Des. 2014; 6:152-156.
- [5] McCall E, Keegan J, Foley B. Primary aromatic amine migration from polyamide kitchen utensils: method development and product testing. Food Addit. Contam.: Part A. 2012;29(1):149-160.
- [6] European Commission. Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Off. J. Eur. Union. 2011 Jan 14;12:1-89.
- [7] Trier X, Granby K. Analysis of primary aromatic amines (PAA) in black nylon kitchenware 2014: Selected samples from the Norwegian Market. Denmark: National Food Institute, Technical University of Denmark; 2015.
- [8] European Commission. RASFF Window. [Internet]. [cited 2022 Dec 13]. Available from: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>
- [9] Paseiro-Cerrato R, Noonan GO, Begley TH. Development of a rapid screening method to determine primary aromatic amines in kitchen utensils using direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS). Food Addit. Contam.: Part A. 2014;31(3):537 - 545.
- [10] Favaro Perez MÂ, Daniel D, Padula M, Lago CL, Grespan Bottoli CB. Determination of primary aromatic amines from cooking utensils by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. Food Chem. 2021;362:129902. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129902.

- [11] Szabó BS, Jakab PP, Hegedűs J, Kirchkeszner C, Petrovics N, Nyiri Z, et al. Determination of 24 primary aromatic amines in aqueous food simulants by combining solid phase extraction and salting-out assisted liquid-liquid extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* 2021;164:105927. doi: 10.1016/j.microc.2021.105927.
- [12] Simoneau C, Hoekstra E, Bradley E, Bustos J, Golja V, Kappenstein O, et al. Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware 1st ed. EUR 24815 EN 2011, JRC Scientific and Technical Reports. 2011.
- [13] Magnusson B, Örnemark U. editors. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics [Internet]. 2nd ed. 2014 [cited 2022 Dec 13]. Available from: www.eurachem.org
- [14] Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). *Off J Eur Comm.* [Internet]. 2002 [cited 2022 Dec 19]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN>
- [15] Mortensen SK, Trier XT, Foverskov A, Petersen JH. Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005;1091:40-50.