

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้า ด้วยเทคนิค HPLC

กนกวรรณ มงคล สุนีย์ คณาพิพัฒน์ พงษ์พิพัฒน์ สุวพัฒน์

วราภรณ์ ยุบลโชติ จันทรพิมพ์ ไทรทอง

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 (ไรโบฟลาวิน) ในสารผสมล่วงหน้า ช่วงการทดสอบ 0.5 – 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเทคนิค HPLC-FLD ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ acetonitrile: 0.1M ammonium acetate แบบ isocratic elution (20:80, v/v) ในคอลัมน์ Inertsil ODS-3 C18 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที โดยใช้ส่วนตรวจวัดสารแบบฟลูออเรสเซนส์ที่ค่า excitation 454 นาโนเมตร และ ค่า emission 540 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่า ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.01 - 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า $R^2 = 1$ ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบได้มีค่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าต่ำสุดที่หาปริมาณได้มีค่าเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการคืนกลับเฉลี่ยอยู่ในช่วง 90.46 - 98.70% ความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้อยู่ในช่วง 1.04 - 1.14 %RSD ความเที่ยงแบบทำซ้ำได้อยู่ในช่วง 1.31 - 5.66 %RSD ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยงสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าได้

คำสำคัญ : วิตามินบี 2, ไรโบฟลาวิน, HPLC-FLD, สารผสมล่วงหน้า, การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for Determination of Vitamin B2 in Premix by HPLC-FLD

Kanokwan Mongkol Sunee Kanapipat Phongpipat Suwapat

Varaporn Yubolchote Chanpim Saitong

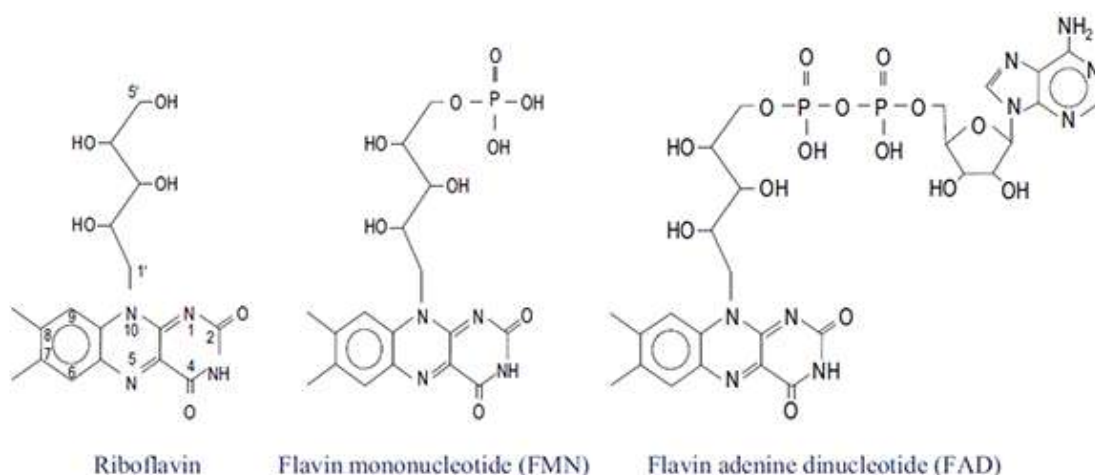
In this study, High performance liquid chromatography with fluorescence detection was validated for determination of Vitamin B2 (Riboflavin) in premixes. This method was successfully tested in the range of 0.5 to 500 mg/kg. Riboflavin was analyzed by HPLC-FLD at excitation and emission wavelengths of 454 and 540 nm, respectively. The chromatographic separation of riboflavin was carried out at 40 °C temperature on a reversed-phase Inertsil ODS-3 C18 column with isocratic mobile phases composed of acetonitrile and 0.1M ammonium acetate (20:80, v/v). The flow rate was 0.7 mL/min and the total run time was 10 minutes. The linearity of calibration curve was excellent ($R^2 = 1$) and the range of linearity this method was 0.01 - 1.00 mg/L. The limit of detection and the limit of quantification values were 0.10 and 0.50 mg/kg. The mean percent recovery ranged from 90.46% to 98.70%. Repeatability and within-laboratory reproducibility were 1.04 – 1.14 %RSD_r and 1.31 – 5.66 %RSD_R. The results showed that the method is accurate and precise for determination of Vitamin B2 in Premix.

Keyword: Vitamin B2, Riboflavin, HPLC-FLD, premix, Method validation

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products.
Department of Livestock Development

บทนำ

วิตามินบี2 หรือไรโบฟลาวิน (vitamin B₂; riboflavin) เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในร่างกายสัตว์ และมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาสันดาป (oxidation) ของไขมัน โดยเป็นองค์ประกอบหลักของ Flavin adenine dinucleotide (FAD) และ Flavin mononucleotide (FMN) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารฟลาโวโปรตีน



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Riboflavin, Flavin mononucleotide และ Flavin adenine dinucleotide (Combs and McClung, 2022)

การขาดไรโบฟลาวินในสัตว์มีผลทำให้การใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตและไขมันได้อย่างไม่เต็มที่ สัตว์จะแสดงอาการเบื่ออาหาร เติบโตช้า มีการอักเสบของลิ้นและริมฝีปาก ทำให้กลืนอาหารไม่สะดวก และซูบผอม (emaciation) ในสุกรจะมีการผิวหนังหยาบ (skin lesions) ตามีอาการผิดปกติ ลูกคลอดก่อนกำหนดและมักตายหมด ในม้าพบว่าถ้าขาดจะแสดงตาบอดในเวลากลางคืน (moon blindness) ส่วนในสัตว์ปีกไข่จะมีเปอร์เซ็นต์การฟักออกลดลงในลูกไก่จะมีนิ้วเท้างอแงเข้าข้างใน ต้องเดินด้วยเข่า (curled toe paralysis) อย่างไรก็ตาม ความผิดปกติเหล่านี้ไม่ได้เป็นลักษณะจำเพาะของการขาดไรโบฟลาวินเท่านั้น อาจพบได้ในภาวะอื่น เช่น สัตว์ที่ได้รับยาต้านจุลชีพ เนื่องจากมีผลไปลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถสังเคราะห์ไรโบฟลาวินได้ แหล่งของวิตามินบี 2 พบได้ทั่วไปในอาหารและสามารถสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์ในรูเมน มีมากในยีสต์ ตับ นมผง หางเนย (whey) และฟีสสด (วรรณพร, 2560; อุทัย, 2559) ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 ได้กำหนดปริมาณไรโบฟลาวินต่ำสุดที่กำหนดให้มีในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ประเภทต่าง ๆ ดังนี้ ไก่เนื้อ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไก่ไข่ 1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสุกร 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ราชกิจจานุเบกษา, 2559)

ห้องปฏิบัติการงานเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้า โดยใช้หลักการโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence detector; FLD) เนื่องจากไรโบฟลาวินมีโครงสร้างส่วนที่เป็นวงมีพันธะคู่สลับพันธะเดี่ยว (conjugated cyclic) ที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงแล้วปล่อยคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นที่มากขึ้น (ศุภลักษณ์, 2552)

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อตรวจสอบความพร้อมของเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี สารมาตรฐาน วัสดุวิทยาศาสตร์ และตัวอย่างที่ใช้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

1.2 เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC ตามพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ความแม่นยำ และความเที่ยง เป็นต้น

1.3 เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC เป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานและผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC-FLD ดังนี้

2.1 หาสถานะของเครื่อง HPLC-FLD ที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบ

2.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity)

2.3 ทดสอบความจำเพาะของวิธี (selectivity)

2.4 ทดสอบหา limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

2.5 ทดสอบ matrix effect

2.6 ความแม่นยำ (accuracy)

2.7 ความเที่ยง (precision)

4.5.1 แบบทวนซ้ำได้ (repeatability)

4.5.2 แบบทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 เพื่อใช้เป็นวิธีสำหรับทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC-FLD

3.2 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC-FLD

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 Infinity

4.1.2 เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.1.3 เครื่อง Ultrasonic bath

4.1.4 เครื่อง Shaker

4.1.5 เครื่อง Vacuum pump

4.1.6 เครื่อง Centrifuge

4.1.7 Micropipette ขนาด 100-1000 µl

4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

4.2.1 Methanol, HPLC grade

4.2.2 Acetonitrile, HPLC grade

4.2.3 Glacial acetic acid, AR grade

4.2.4 Ammonium acetate, AR grade

4.2.5 วิตามินบี 2 (Riboflavin)

4.2.6 น้ำขจัดไอออน (deionized water,DI) ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18 MΩ·cm

4.3 อุปกรณ์

4.3.1 Volumetric flask สีชา ขนาด 50, 100 และ 2000 ml

4.3.2 Volumetric pipette ขนาด 1, 5 และ 10 ml

4.3.3 Syringe พลาสติกขนาด 3 µl ชนิดไม่มีหัวเข็ม

4.3.4 Vial สีชา พร้อมฝาและ Septum ขนาด 2 ml

4.3.5 Nylon membrane filters 0.45 µm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm

4.3.6 Nylon syringe filters Holder 0.45 µm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm

4.3.7 Cylinder ขนาด 50 และ 250 ml

4.3.8 กระดาษชั่งสาร

4.3.9 ช้อนตักสาร

5. วิธีดำเนินการ

5.1 ศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และวางแผนการทดลอง

5.2 จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี สารละลายมาตรฐาน และเตรียมตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าเพื่อใช้ในการทดสอบ

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพเครื่อง HPLC-FLD

5.3.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารวิตามินบี 2 ด้วยเครื่อง HPLC-FLD

5.3.2 การหาค่า Instrument Detection Limit (IDL)

5.3.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/L

5.3.2.2 ตรวจวัดสารวิตามินบี 2 ด้วยเครื่อง HPLC-FLD จำนวน 10 ซ้ำ

5.3.2.3 คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และ Standard deviation (SD) ของความเข้มข้นสารที่วัดได้

5.3.2.4 คำนวณค่า IDL จากสูตร $IDL = 3SD$

5.3.2.5 นำสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้นระดับ IDL ทำการตรวจวัด 3 ซ้ำ

5.3.2.6 ตรวจสอบสัญญาณฟีดแบ็กสารวิตามินบี 2 เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise, S/N) โดยใช้โปรแกรมประมวลผล Chemstation เกณฑ์การยอมรับคือ S/N ไม่น้อยกว่า 3 หรือ $S/N \geq 3$

5.4 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity)

5.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 จำนวน 5 ความเข้มข้น คือ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L

5.4.2 ตรวจวัดสารวิตามินบี 2 ด้วยเครื่อง HPLC-FLD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

5.4.3 หาค่าเฉลี่ยสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น นำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานวิตามินบี 2 โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินบี 2 และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า coefficient of determination (R^2) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.995 หรือ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC, 2019)

5.5 ทดสอบความจำเพาะของวิธี (selectivity)

5.5.1 เตรียมตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าปลอดสาร (sample blank) จำนวน 3 ซ้ำ

5.5.2 เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg โดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ความเข้มข้น 1 mg/L ปริมาตร 0.5 mL ลงใน sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

5.5.3 นำตัวอย่างข้อ (5.5.1-5.5.2) ทำตามวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้า ด้วยเทคนิค HPLC-FLD

5.5.4 เปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank กับ spiked sample หากวิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อสารวิตามินบี 2 จะต้องไม่พบสัญญาณรบกวน (interference peaks) บริเวณ Retention Time ของสารวิตามินบี 2

แผนผังวิธีทดสอบสารวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้า ด้วยเทคนิค HPLC-FLD ดังนี้

ชั่งตัวอย่าง $1.0000 \text{ g} \pm 0.0010 \text{ g}$ ลงใน Volumetric flask สีชา ขนาด 50 ml

↓
เติม 1 M Acetic acid 5 ml เขย่าเบาๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

↓ - Sonicate 25 °C นาน 30 นาที

↓ - Centrifuge 2,000 rpm, 25 °C นาน 10 นาที

↓
วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD

5.6 หาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

5.6.1 เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/kg โดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ความเข้มข้น 5 mg/L ปริมาตร 0.5 mL ลงใน sample blank ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ

5.6.2 วิเคราะห์หาความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่าง หาค่า mean และ SD (S_0) นำค่า S_0 ไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังนี้

$$\text{LOD} = 3S_0'$$

$$\text{LOQ} = 10S_0' \text{ หรือมากกว่า LOD หรือมากกว่า } 10S_0' \text{ แต่ต้องมีความแม่นยำและความเที่ยง}$$

โดยที่ $S'_0 = S_0/\sqrt{n}$

เมื่อ S'_0 = standard deviation ที่ใช้ในการคำนวณค่า LOD และ LOQ

S_0 = standard deviation ของความเข้มข้นที่วัดได้

n = จำนวนการทำซ้ำของตัวอย่างตามวิธีทดสอบ, $n=2$

5.6.3 การยืนยัน LOD ของการทดสอบ

เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ที่คำนวณได้ ทำตามวิธีทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบให้ดูระดับสัญญาณฟิค โดยต้องมีค่า $S/N \geq 3$

5.6.4 การยืนยัน LOQ ของการทดสอบ

เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ที่คำนวณได้ ทำตามวิธีทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า $\bar{x}$, SD, %Recovery, %RSD_r และ %PRSD_r โดยพิจารณาความแม่นยำจากค่า %Recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016) ตามตารางที่ 1 และพิจารณาความเที่ยงแบบ repeatability จากค่า %RSD_r ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจาก Horwitz's equation

ตารางที่ 1 เกณฑ์การยอมรับ % recovery ของ AOAC

Concentration	% recovery
≥ 10 g/100 g	98-102
≥ 1 g/100 g	97-103
≥ 0.1 g/100 g	95-105
100 mg/kg	90-107
10 mg/kg	80-110
1 mg/kg	80-110
100 µg/kg	80-110
10 µg/kg	60-115
1 µg/kg	40-120

5.7 ทดสอบ matrix effect

หาความแตกต่างระหว่างปริมาณวิตามินบี 2 ในสารละลายมาตรฐานและปริมาณวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้า โดยใช้การคำนวณทางสถิติ Pair t-test

โดยที่ $t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{SD}$

เมื่อ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

n = จำนวนตัวอย่าง = 5

5.8 ทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของการทดสอบ

ประเมินผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง โดยการทดสอบ spiked sample ประเมินความแม่นยำ (accuracy) จากค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับได้ของสารวิตามินบี 2 (%mean recovery) และความเที่ยง (precision) จากค่า %RSD_r และ %PRSD_r โดยผลที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังนี้

5.8.1 เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0.5 (ระดับ LOQ), 5, 50 และ 500 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียม spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 5, 50, 500 mg/kg

	ระดับความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 (mg/kg)				หมายเหตุ
	0.5	5	50	500	
Stock STD Conc. (mg/L)	1	5	50	50	
Volume (ml)	0.5	1	1	10	
Conc. In Solution (mg/L)	0.01	0.1	1	10*	*เจือจางสารละลาย 100 เท่า มีความเข้มข้น 0.1 mg/L ซึ่งอยู่ใน linear rang
Conc. In sample (mg/kg)	0.5	5	50	500	

5.8.2 ทำการทดสอบ spiked sample ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-FLD เทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L และทำการทดสอบอีก 2 ชุด โดยแต่ละชุดทดสอบห่างกัน 7 วัน

5.8.3 ประเมินความแม่นยำ (accuracy) โดยการคำนวณหาค่า %recovery ของแต่ละความเข้มข้น และพิจารณาค่า %mean recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) คือ ที่ปริมาณสารความเข้มข้น 0.5 และ 5 mg/kg ต้องอยู่ในเกณฑ์ 80-110 % ปริมาณสารความเข้มข้น 50 mg/kg ต้องอยู่ในเกณฑ์ 90-107 % และที่ปริมาณสารความเข้มข้น 500 mg/kg ต้องอยู่ในเกณฑ์ 95-105 % การคำนวณ % recovery ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ } \textit{spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของ } \textit{sample blank}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป}} \times 100$$

5.8.4 ประเมินความเที่ยง (precision)

5.8.4.1 ประเมินความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยคำนวณค่า %RSD_r ของแต่ละความเข้มข้นในชุดนั้นๆ ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจากสมการ Horwitz ดังสมการต่อไปนี้

$$\%RSD_r = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ *SD* คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้น

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น

สมการ Horwitz (repeatability) ; $\%PRSD_r = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$

เมื่อ C คือ Concentration ratio

5.8.4.2 ประเมินความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility)

โดยคำนวณค่า $\%RSD_R$ ของแต่ละชุดความเข้มข้นนั้น ต้องมีค่าน้อยกว่า $\%PRSD_R$ ที่คำนวณจากสมการ Horwitz ดังสมการต่อไปนี้

สมการ Horwitz ((within-laboratory reproducibility) ; $\%PRSD_R = 2C^{-0.1505}$

เมื่อ C คือ Concentration ratio

6. ผลการทดลอง

6.1 ได้ศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และวางแผนการทดลองเรียบร้อยแล้ว

6.2 ได้จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี สารละลายมาตรฐาน และเตรียมตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าเพื่อใช้ในการทดสอบเรียบร้อยแล้ว

6.3 การทดสอบประสิทธิภาพเครื่อง HPLC-FLD

6.3.1 จากการทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารวิตามินบี 2 ด้วยเทคนิค HPLC-FID แสดงผลได้ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดง HPLC Conditions สำหรับตรวจวัดสารวิตามินบี 2

Parameters	Conditions
Mobile phase line A : B	0.1 M Ammonium acetate in DI water : Acetonitrile (80:20)
Elution mode	Isocratic elution
Flow rate	0.70 mL/min
LC Column	Inertsil ODS-3 , 4.6 mm x 150 mm , 5 um
Temperature column	40 °C
Injection volume	10 µL
Run time	10.00 min
Fluorescence detector	Excitation Wavelength = 454, Emission Wavelength = 520

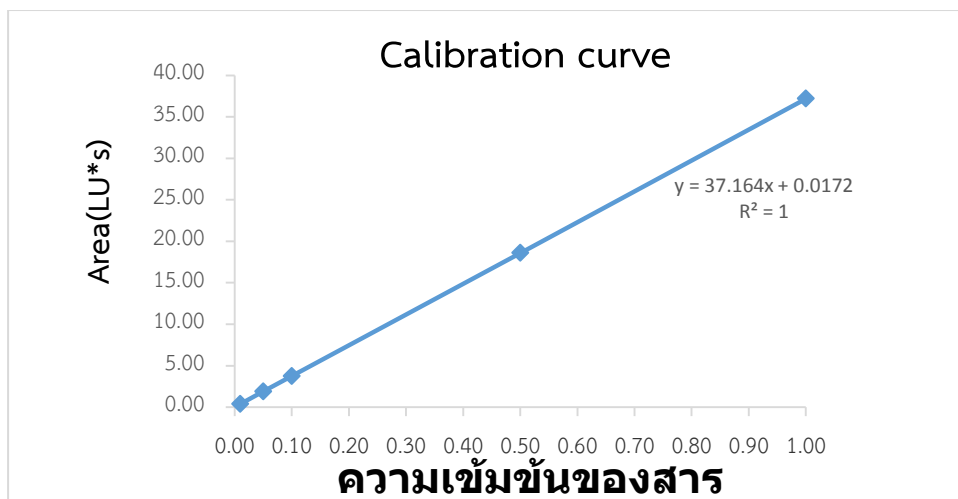
6.3.2 จากผลของการทดสอบการตรวจวัดสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/L จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า mean และ SD ของความเข้มข้นที่วัดได้ และคำนวณค่า IDL ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบค่า IDL ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/L

ลำดับ	ความเข้มข้นของสารละลายวิตามินบี 2 (mg/L)
1	0.050
2	0.050
3	0.050
4	0.050
5	0.050
6	0.050
7	0.050
8	0.050
9	0.050
10	0.050
mean	0.050
SD	0.00018
IDL	0.001

และผลจากการทดสอบการตรวจวัดสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.001 mg/L (ค่า IDL) จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจสอบค่า S/N ได้ผลเป็น 3.6, 4.6 และ 4.6 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า 3 แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารวิตามินบี 2 สามารถวัดได้โดยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ที่ระบุไว้ อยู่ในระดับ 0.001 mg/L

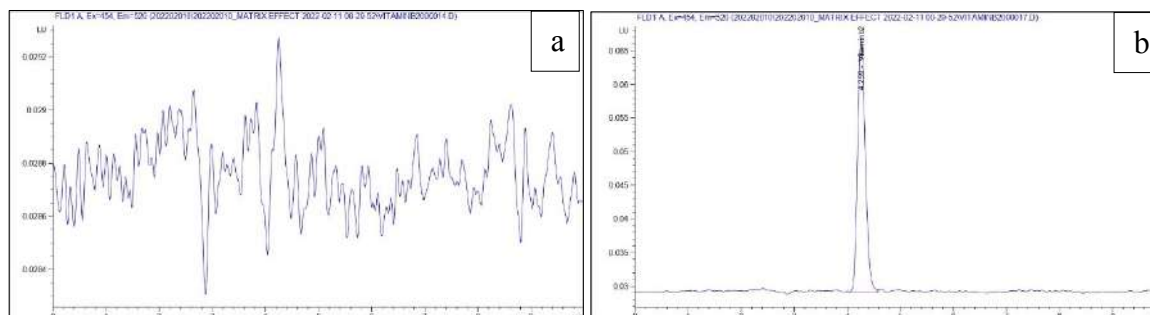
6.4 จากผลของการทดสอบการตรวจวัดสารมาตรฐานวิตามินบี 2 และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า coefficient of determination (R^2) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.995 พบว่า R^2 มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (AOAC , 2016) แสดงว่า สามารถวัดสารวิตามินบี 2 ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 1.0 mg/L แล้วให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area และ ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.01-1.0 mg/L

6.5 ผลการทดสอบ selectivity

จากการเปรียบเทียบสัญญาณพีคของ sample blank กับ spiked sample พบว่า sample blank ไม่พบสัญญาณพีคที่ตำแหน่ง Retention time ของสารวิตามินบี 2 แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของ sample blank (a) และ spiked sample (b)

6.6 ผลการทดสอบหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

6.6.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารวิตามินบี 2 โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ระดับ 2.5 mg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/L นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า SD (S_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S_0$ และค่า LOQ จาก $10S_0$ ให้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบสารวิตามินบี 2

ลำดับ	ความเข้มข้นของสาร วิตามินบี 2 (mg/kg)
1	2.48
2	2.49
3	2.52
4	2.51
5	2.51
6	2.56
7	2.50
8	2.50
9	2.50
10	2.54
mean	2.51
S_0	0.02
S_0'	0.03
LOD	0.10
LOQ	0.34

6.6.2 จากการทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ระดับ 0.1 mg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบให้ดูระดับสัญญาณของพีค โดย S/N ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 พบว่า มีค่ามากกว่า 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่า S/N ของการยืนยันค่า LOD ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg

ลำดับ	LOD (0.1 mg/kg)
	S/N
1	10.6
2	12.4
3	11.0
4	6.7
5	9.2
6	7.0
7	9.6
8	9.3
9	10.4
10	12.7
mean	9.89

6.6.3 จากการทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ระดับ 0.5 mg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า % Recovery, % RSD, และ %PRSD, พบว่า ทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของวิธีทดสอบวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg

ลำดับ	LOQ (0.50 mg/kg)	
	Conc. (mg/kg)	%Recovery
1	0.49	97.59
2	0.49	98.15
3	0.49	97.23
4	0.49	98.45
5	0.49	97.92
6	0.50	100.31
7	0.49	97.64
8	0.49	97.74
9	0.48	96.50
10	0.49	97.66
mean	0.49	97.92
SD	0.005	
%RSD _r	1.01	
%PRSD _r	11.76	

6.7 ผลการทดสอบ Matrix effect

จากการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 2 ในสารละลายมาตรฐานและปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างสารผสมล่วงหน้า โดยนำมาคำนวณทางสถิติ Pair t-test พบว่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า t_{critical} value (t_c=2.78 ที่ df = 4) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบ Matrix effect

STD	Premixes	d
0.01	0.010	0.0004
0.05	0.052	0.0023
0.1	0.099	-0.0012
0.5	0.491	-0.0088
1	0.998	-0.0016
$\bar{d}$		-0.0018
SD		0.0042
$\sqrt{5}$		2.24
t _{cal}		-0.94
t _{crit}		2.78

6.8 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ

6.8.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ทั้งหมด 4 ระดับคือ 0.5 (ระดับ LOQ), 5, 50 และ 500 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า % recovery พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ spiked sample ที่ความเข้มข้น 0.5, 5, 50 และ 500 mg/kg

ลำดับ	ความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 (mg/kg)			
	0.5	5	50	500
sample blank	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.44	4.85	48.51	489.31
2	0.46	4.91	49.13	497.08
3	0.45	4.83	47.42	492.58
4	0.46	4.93	48.72	502.20
5	0.45	4.80	48.01	488.97
6	0.45	4.88	48.50	498.66
7	0.46	4.79	48.46	483.58
8	0.45	4.86	49.05	495.15
9	0.45	4.85	47.65	489.80
10	0.45	4.94	48.33	497.74
mean	0.45	4.86	48.38	493.51
SD	0.005	0.05	0.55	5.65
%mean recovery	90.46	97.30	96.75	98.70
เกณฑ์การยอมรับ % recovery	80-110	80-110	90-107	95-105

6.8.2 จากการทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ทั้งหมด 4 ระดับคือ 0.5 (ระดับ LOQ), 5, 50 และ 500 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า % RSD_r และ %PRSD_r พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า % RSD_r น้อยกว่าค่า%PRSD_r ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้

ความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 (mg/kg)	%RSD _r (repeatability, n=10)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r
0.5	1.07	11.90
5	1.04	8.32
50	1.15	5.89
500	1.14	4.15

6.8.3 จากการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ทั้งหมด 4 ระดับคือ 0.5 (ระดับ LOQ), 5, 50 และ 500 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 ชุดการทดสอบ โดยต่างวันและต่างผู้ทดสอบ แล้วคำนวณหาค่า %RSD_R และ %PRSD_R พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า %RSD_R น้อยกว่า ค่า %PRSD_R ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่า วิธีทดสอบมีความเที่ยงแบบทำซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำได้

ความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 (mg/kg)	%RSD _R (within-laboratory reproducibility, n=30)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R
0.5	5.66	17.99
5	1.31	12.69
50	1.36	8.91
500	2.25	6.30

7. สรุปผลการทดลอง

7.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง HPLC-FLD พบว่า ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารวิตามินบี 2 ด้วยเทคนิค HPLC-FID และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารวิตามินบี 2 สามารถวัดได้โดยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ที่ระบุไว้ อยู่ที่ระดับ 0.001 mg/L

7.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานวิตามินบี 2 (linearity) พบว่าค่า Coefficient of determination (R^2) มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ R^2 ไม่น้อยกว่า 0.995 (AOAC, 2019) และมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01-1 mg/L

7.3 การทดสอบ selectivity จากการเปรียบเทียบสัญญาณฟิคของ sample blank กับ spiked sample พบว่า sample blank ไม่พบสัญญาณฟิคที่ตำแหน่ง Retention time ของสารวิตามินบี 2 แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน Matrix ของ Sample จึงไม่มีผลต่อการทดสอบ

9.4 ผลการทดสอบค่า LOD ของสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg พบว่า ระดับสัญญาณของฟิคมีค่า S/N เท่ากับ 9.89 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ $S/N \geq 3$

7.5 ผลการทดสอบค่า LOQ ของสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg พบว่า ค่าความแม่นยำจาก %recovery เท่ากับ 97.92 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 80-110 % และความเที่ยงแบบ repeatability อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ มีค่า $\%RSD_r < \%PRSD_r$

7.6 ผลการทดสอบ Matrix effect โดยใช้ Pair t-test พบว่า ปริมาณวิตามินบี 2 ในเมทริกซ์ที่ต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่า วิธีการทดสอบนี้ไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์

7.7 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ระดับ 0.5, 5, 50 และ 500 mg/kg มีค่า % mean recovery ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2016)

7.8 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ

7.8.1 ความเที่ยงแบบ repeatability จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ระดับ 0.5, 5, 50 และ 500 mg/kg มีค่า $\%RSD_r$ น้อยกว่า ค่า $\%PRSD_r$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

7.8.2 ความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 2 ระดับ 0.5, 5, 50 และ 500 mg/kg มีค่า $\%RSD_R$ น้อยกว่า ค่า $\%PRSD_R$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

7.9 การทดสอบวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้า สรุปได้ว่า วิธีทดสอบมีความแม่นยำและความเที่ยง แสดงว่าช่วงการวัดของวิธีทดสอบ (working range) คือ 0.5 – 500 mg/kg

8. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบีรวม และวิตามินต่างๆเพิ่มเติม เพื่อขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบ และควรมีการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Test) หรือการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter-laboratory) เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า การทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยงมากขึ้น

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้โอกาสและสนับสนุนการศึกษาทดลอง

10. เอกสารอ้างอิง

10.1 The United states Pharmacopeia 41 (USP 41–NF 36), United States Phamacopeial Convention, Inc Rockville: MD, 2018, p.3602.

10.2 Pei Chen Wayne R. Wolf. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. Anal Bioanal Chem (2007) 387, pp. 2441-2448

10.4 AOAC. 2016. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Association of Official Analytical Chemists. AOAC International.

10.5 Appendix F: AOAC Guidelines for standard Method Performance requirements. AOAC official method of analysis (2016).

10.6 Magnusson, B. and Örnemark. 2014. EURACHEM Guide, The fitness for purpose of analytical methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed.

10.7 ราชกิจจานุเบกษา. 2559. เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 306 ง, หน้า 18 - 26.

10.8 วรณพร ทะพิงค์แก. 2560. อาหารและการให้อาหารสัตว์ (Feeds and Feeding). ศูนย์บริหารงานวิจัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

10.9 อุทัย คั่นโธ. 2559. อาหารสุกรและสัตว์ปีกเชิงประยุกต์. ยู เค ที, ฉะเชิงเทรา.

10.10 ศุภลักษณ์ ศรีจรรย์. 2552. โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง High performance liquid chromatography. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

10.11 Combs, G.F. (Jr.) and J.P. McClung. 2022. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. 6th Eds. Academic Press, MA.