

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินในกากถั่วเหลืองโดยวิธี High- Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector

สมฤดี ชูบัว¹ ณัฐธิดา เสือโภชน¹ ปิยมินทร์ เจ๊ะโซ๊ะ¹ ไกรวุฒิ นวลขาว¹

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และผ่านการทดสอบความใช้ได้สำหรับการวิเคราะห์ อะฟลาทอกซิน บี 1, บี2, จี1, จี2 ในกากถั่วเหลืองได้ถูกศึกษา โดยใช้เทคนิค Immunoaffinity column (IAC) ในการทำให้บริสุทธิ์ และเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมกับการตรวจวัดด้วยฟลูออโรเมทรี สารตัวอย่างถูกสกัดด้วย 80% อะซิโตไนไตรล์ กรองและเจือจางตัวอย่างด้วย PBS จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย IAC ก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมกับการตรวจวัดด้วยฟลูออโรเมทรี ที่มีความยาวคลื่นกระตุ้นและความยาวคลื่นการคาย คือ 360 และ 440 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้สภาวะการชะตัวอย่างแบบคงที่ด้วย อัตราส่วนของ น้ำปราศจากไอออน: เมทานอล: อะซิโตไนไตรล์, (55:45:5, v/v/v/) ซึ่งวิธีผ่านการทดสอบความใช้ได้ ตามแนวทางของ EURACHEM/2014 ที่ค่าความแม่นยำโดยค่าร้อยละการคืนกลับ อยู่ระหว่าง 72.99 -117.87% ค่าความเที่ยงโดยค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ต้องไม่เกิน 20% และค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ค่าขีดความสามารถของการตรวจพบอยู่ระหว่าง 0.2-0.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 1.0-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีทดสอบ โดยประมาณ จากค่าความไม่แน่นอนขยาย พบอยู่ระหว่าง 22.614 – 35.126% จากค่าพารามิเตอร์ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบ อะฟลาทอกซิน บี1, บี2, จี1, จี2 ในกากถั่วเหลือง

คำสำคัญ : อะฟลาทอกซิน, HPLC-FLD, กากถั่วเหลือง

¹ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

Method Validation of Aflatoxins in Soybean meal by High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector

Somruedee Chubua¹ Nattida Sueaphot¹ Piyamin Jesoh¹ Kraiwut Nualkaw¹

Abstract

Accurate and reliable method for determination of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) in soybean meal has been studied. This method used Immunoaffinity column (IAC) technique for purification and high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection (HPLC-FLD). Aflatoxins were extracted with 80% of acetonitrile, filtered and diluted with PBS. Then, the samples were purified with IAC before HPLC-FLD. The chromatographic condition for aflatoxins separation using isocratic elution with water: methanol: acetonitrile (55:45:5, v/v/v) and detected at the excitation and emission wavelength at 360 and 440 nm, respectively. The method was validated according EURACHEM/2014 validation guideline. The %recovery of method in the range of 72.99-117.87%. The precision by %relative standard deviation was less than 20 % and HORRAT was less than 2. The limit of detection values (LOD) was observed to be between 0.2-0.6 µg/kg and limit of quantitation (LOQ) were found to be 1.0-2.0 µg/kg. Estimated from the expanded uncertainty, it was found in between 22.614 – 35.126%. All acceptability requirements based on the validation parameters which suggests that the approach is appropriate for determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in soybean meal.

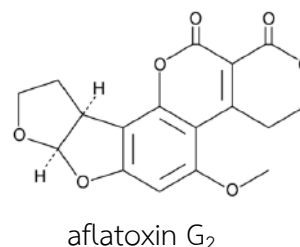
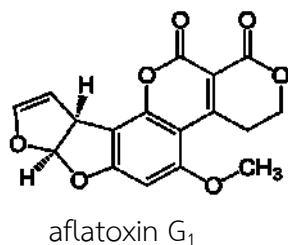
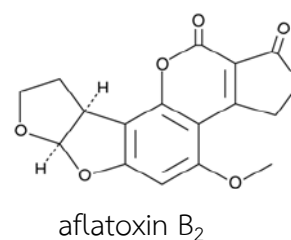
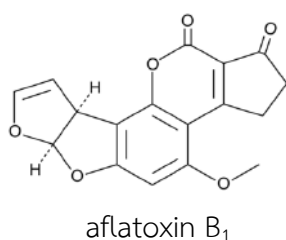
Keywords : Aflatoxins , HPLC-FLD , Soybean meal

¹ Feed Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Product

91 Moo 4 Tiwanon Rd., Bangkadi, Mueng, Pathumthani, 12000

บทนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin; AF) เป็นสารเมทาโบไลต์ ชนิดทุติยภูมิที่ซึ่งส่วนใหญ่มักสร้างจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยตามโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติการเรืองแสงจะแบ่งเป็น อะฟลาทอกซินบี 1 (AFB1), บี 2 (AFB2), จี 1 (AFG1) และจี 2 (AFG2) แสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์เกิดการตกค้างในห่วงโซ่อาหาร วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ เมล็ดธัญพืชที่มีโปรตีนสูง เช่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง พืชน้ำมัน เช่น กากเมล็ดฝ้าย กากมะพร้าว ธัญพืชที่ให้พลังงาน เช่น ข้าวเปลือก ข้าวโพด สารพิษพิษอะฟลาทอกซิน โดยชนิด B1 เป็นชนิดที่พบมากและเป็นอันตรายต่อสัตว์มากที่สุด ซึ่งทางองค์การวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) ได้จัดให้สารพิษ อะฟลาทอกซิน บี 1 อยู่ในกลุ่มของสารก่อมะเร็ง group 1 carcinogen เป็นสารที่สามารถก่อมะเร็งในมนุษย์ได้ อีกทั้งยังก่อดระบบภูมิคุ้มกันทำให้ตัวอ่อนผิดปกติและอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในมนุษย์และสัตว์ (Sasiprapa *et al.*, 2021)



ภาพที่ 1 ภาพโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซิน (D. Dhanasekaran *et al.*, 2011)

กลไกการเกิดความเป็นพิษในการก่อมะเร็งของ AFB1 เกิดขึ้นจากเกิดการสร้างสารเมทาโบไลต์ที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 และ 9 เกิดเป็น อีพอกไซด์ (epoxide form) (AFB1-8,9-epoxide form) โดยเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP450) ที่ตับ จากนั้น epoxide จะเกิดปฏิกิริยากับ DNA RNA หรือ โปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์ เกิดเป็น covalent adduct โดย covalent adduct ที่เกิดขึ้นจะรบกวนการทำงานของ tumor suppression gene p53 ทำให้เกิดการเจริญของเซลล์มะเร็ง แสดงดังภาพที่ 2

สัตว์ พบการนำเข้ารวมในปี 2563 ที่ปริมาณ 2,645,236 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,000.78 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ทั้งนี้ในเดือน ม.ค. 64 มีการนำเข้าในปริมาณ 103,053 ตัน คิดเป็น มูลค่า 48.08 ล้านดอลลาร์สหรัฐ

ในปัจจุบันมีการกำหนดระดับมาตรฐานการปนเปื้อนสูงสุด (maximum level) ที่ยอมรับได้ของอะฟลาทอกซินรวม (total aflatoxin) ในกากถั่วเหลือง โดยเกณฑ์มาตรฐานควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559) และ อะฟลาทอกซิน ปี1 ในวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์(กากถั่วเหลือง) โดยเกณฑ์ของมาตรฐาน EUROPEAN UNION (EU) (Official Journal of the European Union(2006) หน้า L0032/11) มีข้อกำหนดดังแสดงในตารางที่1

ตารางที่ 1 ค่ามาตรฐานการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินตามประกาศกระทรวงเกษตรฯ และสหภาพยุโรป ใน กากถั่วเหลือง และวัตถุดิบอาหารสัตว์

สารพิษจากเชื้อรา	ระดับมาตรฐานการปนเปื้อนสูงสุด	
	กระทรวงเกษตรฯ (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)	สหภาพยุโรป (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)
	กากถั่วเหลือง	วัตถุดิบอาหารสัตว์ (กากถั่วเหลือง)
อะฟลาทอกซิน	50	-
อะฟลาทอกซิน ปี1	-	20

การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในกากถั่วเหลืองด้วยเทคนิคทำให้บริสุทธิ์ (clean-up) โดยใช้ immunoaffinity column (IAC) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราหลายชนิดในอาหารและอาหารสัตว์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (AOAC Official Method 993.31 Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter Immunoaffinity column) โดยอาศัย monoclonal antibodies ในคอลัมน์ จะจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ antigen คือ อะฟลาทอกซิน ในตัวอย่างที่สนใจ จากนั้นจะทำการชะ (elution) อะฟลาทอกซิน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการตรวจวัด เช่น HPLC หรือ LC-MS/MS ต่อไป (บดินทร์, 2555) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ IAC ยี่ห้อ VICAM จากเดิมคือรุ่น AflaTest ที่มีขนาดคอลัมน์ปริมาตร 1 mL ปริมาณ binding capacity ของ antibody ที่บรรจุในคอลัมน์ 300 ng เป็นรุ่น AflaTest WB SR⁺ ซึ่งขนาดคอลัมน์เพิ่มเป็น 3 mL และ ปริมาณ binding capacity ของ antibody ที่บรรจุในคอลัมน์เป็น 800 ng และสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างได้เพิ่มขึ้นซึ่งขนาดของคอลัมน์ ปริมาณ binding capacity และความสามารถของคอลัมน์ในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เพิ่มความรวดเร็วและประสิทธิภาพในการเตรียมตัวอย่างให้ดียิ่งขึ้น

โดยการศึกษาในครั้งนี้จะใช้เทคนิคการ clean-up ด้วย immunoaffinity column ในการเตรียมตัวอย่าง และตรวจวัดด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) และตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ร่วมกับเทคนิคการเตรียมสารอนุพันธ์ (derivatization) แบบ post-column derivatization ด้วย Photochemical Reactor For Enhanced Detector (PHRED) เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดอะฟลาทอกซินชนิดปี1 และ จี1 (ณัฐสิทธิ์, 2557) มาทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ตามแนวทางของ EURACHEM Guide,

(2014) โดยทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ขีดจำกัดตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์การทำซ้ำได้ แบบ repeatability และ reproducibility และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ ตามแนวทางของ SANTE/12682/2019 เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบ aflatoxins ในกากถั่วเหลือง

1. ชื่อโครงการ

การพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ในกากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค HPLC-FLD

2. ผู้รับผิดชอบ

- | | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 1. นางสาวสมฤดี ชูบัว | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ |
| 2. นางณัฐธิดา เสือโภชน์ | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| 3. นายปิยมินทร์ เจ๊ะโซ๊ะ | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| 4. นายไกรวุฒิ นวลขาว | ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ |

3. วัตถุประสงค์

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ในกากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค HPLC-FLD เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

4. ขอบข่าย

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ในกากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค HPLC-FLD ตามแนวทางของ EURACHEM Guide, (2014)

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ในการวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ในกากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค HPLC-FLD

5.2 เพื่อใช้ยื่นขยายขอบข่ายในการขอการรับรอง ของวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ในกากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค HPLC-FLD

6. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Water รุ่น Alliance e2695
- 6.1.2 Photochemical reactor ยี่ห้อ Aura, USA
- 6.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG 603-S และ ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA623S-CW
- 6.1.4 Shaker ยี่ห้อ Gerhardt
- 6.1.5 Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2

- 6.1.6 MicroPipette ขนาด 0.5–10 μL , 10–100 μL , 100–1,000 μL และ 500–5,000 μL
- 6.1.7 Dispensor ขนาด 100 mL
- 6.1.8 เครื่องลดปริมาณสารละลาย ยี่ห้อ Organomation รุ่น OA-SYSTEM
- 6.1.9 Ultra sonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MFD
- 6.1.10 ป้อนสารละลาย ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S
- 6.1.11 UV Spectrophotometer ยี่ห้อ JENWAY รุ่น 6850
- 6.1.12 เครื่องสกัดสารด้วยระบบผ่านเฟสของแข็ง พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ Vertical รุ่น 24-Port

Manifold

6.2. สารเคมี/สารมาตรฐาน

- 6.2.1 สารมาตรฐาน Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ยี่ห้อ SIGMA-ALDRICH
- 6.2.2 Acetonitrile AR grade
- 6.2.3 Methanol HPLC grade
- 6.2.4 Acetonitrile HPLC grade
- 6.2.5 น้ำปราศจากไอออนมีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M Ω -cm (Deionized water)
- 6.2.6 Sodium Chloride AR grade
- 6.2.7 Phosphate Buffered Saline (PBS)
- 6.2.8 Potassium dicromate
- 6.2.9 Sulfuric acid AR grade
- 6.3.10 Nitrogen gas purity 99.99 %

6.3 อุปกรณ์

- 6.3.1 HPLC Column Inertsil C18 4.6 mm X 150 mm , 5 μm , ยี่ห้อ GL Science
- 6.3.2 Erlenmeyer Flask ขนาด 125 และ 250 mL
- 6.3.3 ข้อนตักสาร
- 6.3.4 กรวยกรองสารละลาย
- 6.3.5 หลอดเข็นตริฟิวซ์ชนิด Polypropylene ขนาด 50 mL
- 6.3.6 กระดาษกรอง Whatman no. 4 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18.5 cm.
- 6.3.7 Rack สำหรับวางหลอดเข็นตริฟิวซ์
- 6.3.8 Glass microfiber (GF/C) ขนาด 110 mm
- 6.3.9 Syringe พลาสติกขนาด 3 และ 10 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม
- 6.3.10 Syringe Filters ชนิด Nylon ขนาด 0.45 μm , 13 mm
- 6.3.11 Aluminium foil
- 6.3.12 Immunoaffinity column AflaTest WB SR⁺ (Lot no: P101WBSR⁺) ยี่ห้อ VICAM
- 6.3.13 HPLC Vial พร้อมฝาและ Septum

- 6.3.14 กระบอกตวงขนาด 1000 mL
- 6.3.15 ปีกเกอร์ขนาด 50 mL
- 6.3.16 Volumetric Flask ขนาด 100 mL
- 6.3.17 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase
- 6.3.18 Disposable Cuvettes

7. วิธีดำเนินการ

7.1 ศึกษาสภาวะเครื่อง HPLC-FLD ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂

7.2 ทำการตรวจสอบค่า Linearity และ Range โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Aflatoxin G₂ และ G₁ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0, 10 และ 20 µg/L Aflatoxin B₂ และ B₁ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 µg/L ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่า Peak Area และค่าความเข้มข้นไปสร้างความสัมพันธ์เชิงเส้น เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) และทดสอบช่วงของการทดสอบ (range) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.990 (AOAC, 2019)

7.3 ทดสอบผลของ matrix effect ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Aflatoxin G₂ และ G₁ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0, 10 และ 20 µg/L Aflatoxin B₂ และ B₁ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 µg/L ในตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับในเมทริกซ์ในช่วงความเข้มข้นระดับเดียวกัน ซึ่งสามารถคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ และความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย เพื่อคำนวณหา %SSE (Huang et al., 2014) ดังนี้

$$\%SSE = \frac{\text{slope (matrix-matched calibration curve)}}{\text{slope (standard calibration curve)}} \times 100$$

7.4 ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ของวิธีทดสอบ เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะกับ Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ สามารถแยกชนิดของสาร Aflatoxins ได้ ซึ่งดูได้จาก Retention time (RT) และใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ตามวิธีทดสอบ โดยเติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂ และ G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 2.4, 12.0 และ 120.0 µg/kg Aflatoxin B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 6.0 และ 60 µg/kg

7.5 ทดสอบเพื่อหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of Detection, LOD) และ ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ) โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂ และ G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1.2 µg/kg Aflatoxin B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 µg/kg ทำตามวิธีทดสอบ 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า Standard deviation (S₀) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก 3S₀ และค่า LOQ จาก 10S₀ (Eurachem, 2014)

7.6 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) โดยเติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ ความเข้มข้น 0.6, 0.6, 0.2 และ 0.2 µg/kg ตามลำดับ ลงในตัวอย่าง sample blank (กากถั่วเหลือง) จำนวน 10 ซ้ำ ทำตามวิธีทดสอบผลการทดสอบให้ดูระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3 (EU, 2002)

7.7 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ)

การทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ ความเข้มข้น 2.0, 2.0, 1.0 และ 1.0 µg/kg ตามลำดับ ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ระหว่าง 60-120%, ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) โดยเกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 20 % (AOAC, 2019)

7.8 การทดสอบความเที่ยง (precision)

วิเคราะห์ sample blank (กากถั่วเหลือง) ที่เติมสารมาตรฐาน aflatoxin G₂ และ G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 2.4, 12.0, และ 120.0 µg/kg aflatoxin B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 6.0, และ 60.0 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกันและวันเดียวกัน (Method Repeatability) แต่ถ้าต่างนักวิเคราะห์หรือต่างวันที่วิเคราะห์ (Method Reproducibility) แล้วคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) โดยเกณฑ์การยอมรับ ภายในวันที่วิเคราะห์ (intraday, %RSD_r) และระหว่างนักวิเคราะห์และระหว่างวันวิเคราะห์ (interday, %RSD_R) คือ %RSD ≤ 20 % จากนั้นคำนวณค่า HORRAT โดยเกณฑ์การยอมรับ HORRAT ที่ได้ต้องมีค่าไม่เกิน 2 (AOAC, 2019)

7.9 การทดสอบความแม่นยำของการทดสอบ (accuracy)

วิเคราะห์ sample blank (กากถั่วเหลือง) ที่เติมสารมาตรฐาน aflatoxin G₂ และ G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 2.4, 12.0, และ 120.0 µg/kg aflatoxin B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 6.0, และ 60.0 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ซึ่งเกณฑ์ % recovery ที่ยอมรับต้องอยู่ในช่วง 60 – 120% (AOAC, 2019)

7.10 การประมาณค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) สามารถประเมินความไม่แน่นอนได้จากข้อมูลจาก method validation ในส่วนของ intra-laboratory หรือ within-laboratory reproducibility โดยต้องคำนวณจากสมการ ดังนี้

- การคำนวณหาความลำเอียงสัมพัทธ์ (relative bias)

$$\text{relative bias} = \frac{\text{measured concentration} - \text{spiked concentration}}{\text{spiked concentration}} \times 100 \%$$

- การประมาณความไม่แน่นอนมาตรฐานจากความลำเอียง; U'(bias) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{bias}) = \sqrt{(\text{mean}_{\text{bias}})^2 + (\text{SD.P}_{\text{bias}})^2}$$

- การประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากการทำซ้ำ; U'(precision) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{precision}) = \text{RSD}_{\text{WR}} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}}$$

-การประมาณค่าความไม่แน่นอนรวม; $U'(\text{combined})$ สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{combined}) = \sqrt{(\text{mean}_{\text{bias}})^2 + (\text{SD.P}_{\text{bias}})^2 + (\text{RSD}_{\text{WR}})^2}$$

-การประมาณความไม่แน่นอนขยาย; $U'(\text{expanded})$ โดยคูณค่า $U'(\text{combined})$ ด้วย coverage factor, $k = 2$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{expanded}) = k \times U'(\text{combined})$$

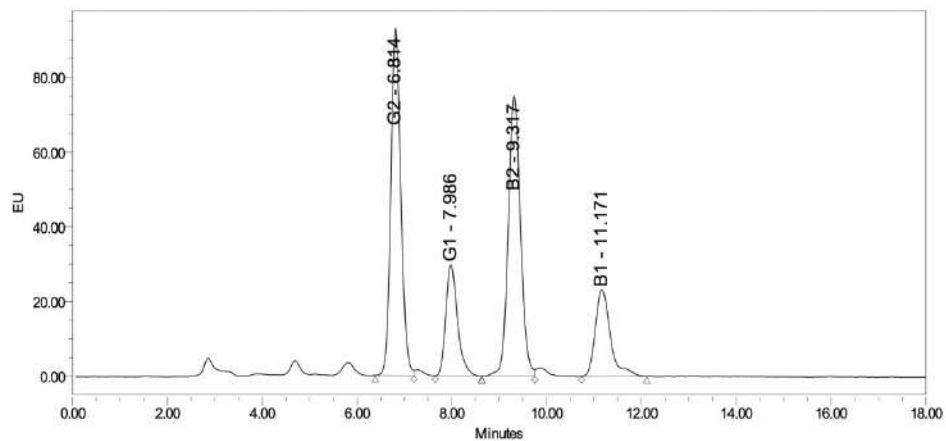
จากข้อมูลดังกล่าวที่ใช้ข้อมูลจาก method validation จะพิจารณาจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนขยายสำหรับวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการซึ่งต้องไม่เกิน 50% ถึงจะบ่งบอกได้ว่าวิธีทดสอบนั้นเหมาะสม (SANTE, 2019)

8. ผลการทดลอง

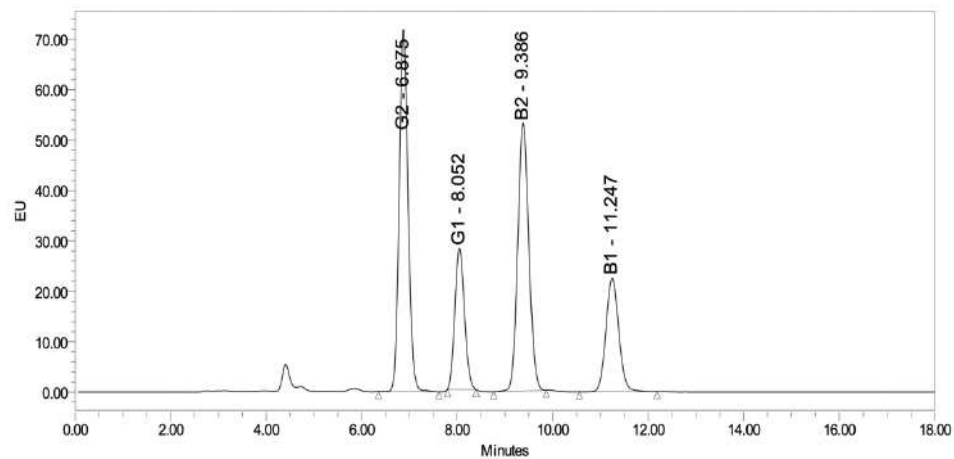
8.1 จากผลการศึกษาสภาวะเครื่อง HPLC-FLD สำหรับวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง HPLC Conditions สำหรับวิเคราะห์ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂

Parameters	Conditions
HPLC System	Water Alliance e2695 with Multi-Fluorescence Detector 2475
Column	Inertsil ODS-3 , 4.6 mm X 150 mm , 5 μm
Post-column derivatization	Photochemical reactor
Mobile phase	water: methanol: acetonitrile (55:45:5)
Elution mode	Isocratic elution
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	100 μL
Run time	18.00 min
Fluorescence Detector	excitation wavelength = 360 nm, emission wavelength = 440 nm



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/L

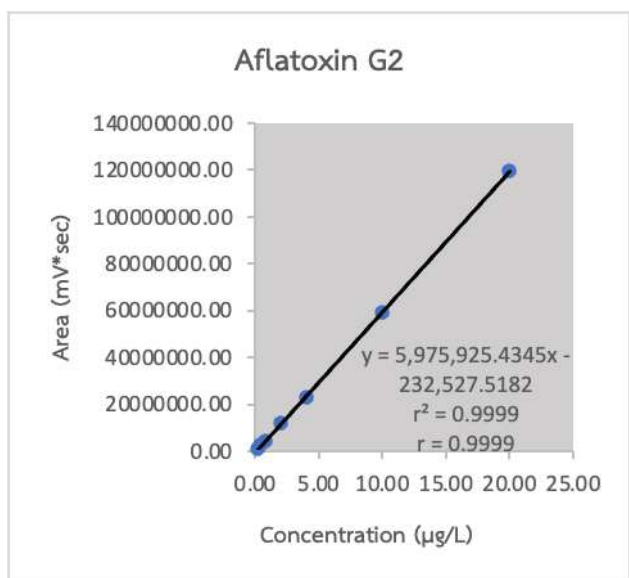


ภาพที่ 4 โครมาโทแกรม (chromatogram) ของ Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ ในกากไข่เหลือง ที่ระดับความเข้มข้น Aflatoxin G₂ และ G₁ 120 µg/kg Aflatoxin B₂ และ B₁ 60 µg/kg

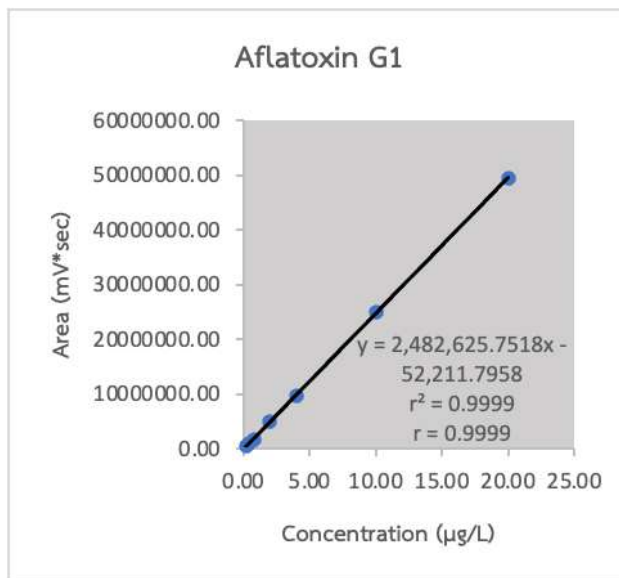
8.2 จากผลของการทดสอบการฉีดยามาตรฐาน Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ G₂ และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990 พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (AOAC, 2019) ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของ slope, intercept และ correlation coefficient (r) ของวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin G₂, G₁ B₂ และ B₁

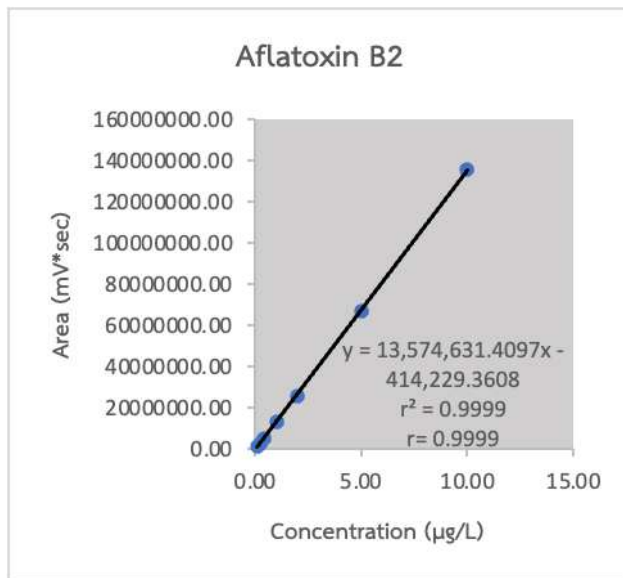
No.	aflatoxin	Slope (Peak area, µg/L)	Intercept	r
1	AFG ₂	5,975,925	232,528	0.9999
2	AFG ₁	2,482,626	52,212	0.9999
3	AFB ₂	13,574,631	414,229	0.9999
4	AFB ₁	6,061,300	209,765	0.9999



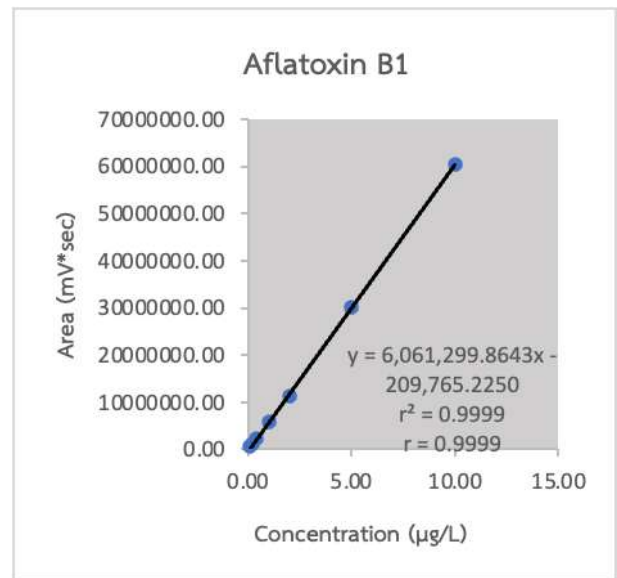
ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area และ ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂ ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 - 20 µg/L



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Aflatoxin G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 - 20 µg/L



ภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์
ระหว่าง Peak area และค่าความเข้มข้น
ของสารมาตรฐาน Aflatoxin B₂ ที่ระดับ
ความเข้มข้น 0.1 - 10 µg/L



ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง
Peak area และค่าความเข้มข้นของสาร
มาตรฐาน Aflatoxin B₁ ที่ระดับความ
เข้มข้น 0.1 - 10 µg/L

8.3 จากผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ โดยประเมินค่า %SSE ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนของผลต่างระหว่างความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับ ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย โดยพิจารณาค่า %SSE ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ 80-120 % จึงถือว่าผลของ matrix effect อยู่ในระดับที่ยอมรับ (SANTE, 2019) ดังตารางที่ 4 ตารางที่ 4 แสดงค่า %SSE ของ Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁

No.	aflatoxin	%SEE
1	AFG ₂	104.24
2	AFG ₁	94.35
3	AFB ₂	91.76
4	AFB ₁	82.81

8.4 จากผลการทดสอบความจำเพาะ (selectivity) ของวิธีทดสอบ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า Retention time (RT) ของพีคของ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ โดยหาค่าเฉลี่ยของ Retention time ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า retention time ของ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁

Concentration (µg/kg)	Retention time Aflatoxins (min)			
	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁
ระดับที่ 1	6.82	7.98	9.29	11.13
ระดับที่ 2	6.81	7.97	9.28	11.12
ระดับที่ 3	6.83	7.99	9.30	11.14
Average	6.82	7.98	9.29	11.13
SD	0.007	0.007	0.008	0.010
%RSD	0.096	0.093	0.091	0.094

8.4 จากผลการทดสอบเพื่อหาค่า sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ แล้วคำนวณหา LOD และ LOQ ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ตารางแสดงค่า sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁

จำนวนซ้ำ	ความเข้มข้นที่วัดได้ (µg/kg)			
	AFG ₂ 1.2 µg/kg	AFG ₁ 1.2 µg/kg	AFB ₂ 0.6 µg/kg	AFB ₁ 0.6 µg/kg
1	1.34	1.09	0.47	0.71
2	1.03	1.20	0.49	0.64
3	1.08	1.19	0.54	0.74
4	1.17	1.08	0.53	0.66
5	1.04	1.11	0.46	0.80
6	0.93	1.12	0.44	0.62
7	1.45	1.07	0.45	0.67
8	1.34	1.08	0.44	0.62
9	1.41	1.14	0.42	0.63
10	1.05	1.01	0.45	0.67
Average	1.18	1.11	0.47	0.68
SD (S ₀)	0.18	0.06	0.04	0.06
n	1.00	1.00	1.00	1.00
S ₀ '	0.18	0.06	0.04	0.06
LOD (3S ₀)	0.56 ≈ 0.60	0.18 ≈ 0.60	0.12 ≈ 0.20	0.18 ≈ 0.20
LOQ (10S ₀)	1.86 ≈ 2.40	0.60 ≈ 2.40	0.40 ≈ 1.20	0.60 ≈ 1.20

8.5 การทดสอบเพื่อยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) แสดงผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตารางแสดงผลการทดสอบการยืนยันค่า LOD

ครั้งที่	Signal/noise			
	AFG ₂ 0.6 µg/kg	AFG ₁ 0.6 µg/kg	AFB ₂ 0.2 µg/kg	AFB ₁ 0.2 µg/kg
1	20.84	6.67	10.67	3.35
2	15.19	5.01	6.92	3.02
3	17.25	5.13	8.01	3.38
4	14.95	4.56	7.64	3.00
5	28.09	8.48	12.66	4.61
6	19.67	6.04	7.94	3.17
7	22.33	6.42	9.39	4.84
8	16.54	4.33	6.85	3.12
9	22.90	6.31	10.25	3.18
10	23.42	7.00	10.88	4.27
Average	20.12	6.00	9.12	3.59

จากค่า LOD ของสาร Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ พบว่าค่า signal to noise มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (EU, 2002)

8.6 การทดสอบเพื่อยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตารางแสดงผลการทดสอบค่า LOQ

จำนวนซ้ำ	Recovery data							
	AFG ₂ 2.0 µg/kg		AFG ₁ 2.0 µg/kg		AFB ₂ 1.0 µg/kg		AFB ₁ 1.0 µg/kg	
	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
1	2.23	111.25	1.82	85.40	1.03	99.13	1.06	102.21
2	1.91	95.70	1.33	62.39	0.76	73.17	1.12	107.60
3	1.91	95.50	1.47	69.01	0.73	70.48	1.10	106.15
4	1.89	94.25	1.40	65.59	0.79	75.48	1.09	104.42
5	2.09	104.50	1.68	79.06	0.93	89.13	1.16	111.63
6	2.07	103.65	1.92	89.91	0.66	63.46	1.14	109.90
7	2.09	104.40	1.77	83.10	0.66	63.27	0.98	94.23
8	1.87	93.70	1.38	64.88	0.75	71.92	1.02	98.27
9	2.08	104.00	1.83	85.92	0.64	61.15	1.10	105.77
10	2.13	106.55	1.76	82.82	0.63	60.87	1.04	99.62
Average	2.03	101.35	1.64	76.81	0.76	72.81	1.08	103.98
SD	0.12	-	0.22	-	0.13	-	0.06	-
%RSD	5.99	-	13.35	-	17.31	-	5.22	-
Horwitz equation	27.25	-	28.14	-	31.59	-	29.96	-
HORRAT	0.22	-	0.47	-	0.55	-	0.17	-

จากค่า LOQ ของสาร Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ พบว่าค่า %recovery อยู่ช่วง 60-120% และ %RSD ≤ 20% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (AOAC, 2019)

8.7 การทดสอบความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (method repeatability) และความแม่นยำ (accuracy) โดยนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂ และ G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 2.4, 12.0 และ 120.0 µg/kg Aflatoxin B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 6.0 และ 60.0 µg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยค่า %RSD_r ภายในวันที่วิเคราะห์ (with-in day) ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% และ %recovery ต้องอยู่ในช่วง 60-120% ส่วนเกณฑ์การยอมรับ HORRAT ที่ได้ต้องมีค่าไม่เกิน 2 (AOAC, 2019) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 9 และ ตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ค่า %recovery, %RSD_r, PRSD_r และ HORRAT_r ของ AFG₂ และ AFG₁

Spike level (µg/kg)	analytes							
	Aflatoxin G ₂				Aflatoxin G ₁			
	%recovery	%RSD _r	PRSD _r	HORRAT _r	%Recovery	%RSD _r	PRSD _r	HORRAT _r
2.4	106.68	3.22	26.31	0.28	100.08	7.33	26.57	0.12
12.0	117.87	0.98	20.35	0.05	117.22	1.16	20.36	0.06
120.0	117.05	0.91	14.40	0.06	117.33	1.70	14.40	0.12

ตารางที่ 10 ค่า %recovery, %RSD_r, PRSD_r และ HORRAT_r ของ AFB₂ และ AFB₁

Spike level (µg/kg)	analytes							
	Aflatoxin B ₂				Aflatoxin B ₁			
	%recovery	%RSD _r	PRSD _r	HORRAT _r	%Recovery	%RSD _r	PRSD _r	HORRAT _r
1.2	88.41	9.42	30.90	0.30	72.99	12.52	30.05	0.42
6.0	77.66	8.27	24.04	0.34	73.48	9.74	24.24	0.40
60.0	90.7	3.15	16.61	0.19	92.48	4.02	16.56	0.24

8.8 การทดสอบความเที่ยง (intermediate precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แบบการทำซ้ำ (intermediate precision) ใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และต่างวันที่วิเคราะห์ (method reproducibility) โดยนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน Aflatoxin G₂ และ G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 2.4, 12.0 และ 120.0 µg/kg Aflatoxin B₂ และ B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 1.2, 6.0 และ 60.0 µg/kg แล้วทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยค่า %RSD_r ระหว่างวันที่วิเคราะห์ (with-out day) ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% และ เกณฑ์การยอมรับ HORRAT ที่ได้ต้องมีค่าไม่เกิน 2 (AOAC, 2019) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11 %RSD_R, PRSD_R และ HORRAT_R ของ AFG₂ และ AFG₁

Spike level (µg/kg)	analytes					
	Aflatoxin G ₂			Aflatoxin G ₁		
	%RSD _R	PRSD _R	HORRAT _R	%RSD _R	PRSD _R	HORRAT _R
2.4	3.80	39.18	0.10	6.39	39.56	0.16
12.0	1.54	30.39	0.05	1.64	30.41	0.05
120.0	1.52	21.51	0.07	1.89	21.50	0.09

ตารางที่ 12 %RSD_R, PRSD_R และ HORRAT_R ของ AFB₂ และ AFB₁

Spike level (µg/kg)	analytes					
	Aflatoxin B ₂			Aflatoxin B ₁		
	%RSD _R	PRSD _R	HORRAT _R	%RSD _R	PRSD _R	HORRAT _R
1.2	10.02	45.89	0.22	13.24	45.17	0.29
6.0	8.75	35.99	0.24	9.22	36.30	0.25
60.0	3.61	24.85	0.15	4.81	24.79	0.19

8.9 การประเมินค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE จากข้อมูล method validation โดยนำข้อมูล within-laboratory reproducibility มาคำนวณความไม่แน่นอนขยายพบว่าไม่เกิน 50% (SANTE, 2019) ดังนี้

ตารางที่ 13 แสดงค่าความไม่แน่นอนของสาร aflatoxin B₁ ที่ระดับความเข้มข้น 60µg/kg

AFB1	Spike Level(60µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
Staff#1_1	60.0	52.93	-11.78
Staff#1_2	60.0	56.34	-6.10
Staff#1_3	60.0	54.38	-9.37
Staff#1_4	60.0	53.19	-11.34
Staff#1_5	60.0	55.84	-6.93
Staff#1_6	60.0	53.60	-10.68
Staff#1_7	60.0	55.33	-7.79
Staff#1_8	60.0	55.31	-7.82
Staff#1_9	60.0	60.16	0.26
Staff#1_10	60.0	57.81	-3.64
Staff#2_1	60.0	50.53	-15.79
Staff#2_2	60.0	57.25	-4.58
Staff#2_3	60.0	51.96	-13.41
Staff#2_4	60.0	50.99	-15.02
Staff#2_5	60.0	52.24	-12.93
Staff#2_6	60.0	51.83	-13.62
Staff#2_7	60.0	52.64	-12.26
Staff#2_8	60.0	52.08	-13.20
Staff#2_9	60.0	57.13	-4.78
Staff#2_10	60.0	56.76	-5.41
N		20	
mean		54.41	-9.31
SD.Pbias (stdev.p) (%)			4.251
Standard dev.measured (ug/kg)			
(stddev.s)		2.617	
RSDwR (%)		4.809	
U'(bias) (%)			10.234
U'percision		4.809	
U'combine (%)		11.307	11.307
U'expanded (%)		22.614	

ตารางที่ 14 แสดงค่าความไม่แน่นอนของสาร aflatoxin B₂ ที่ระดับความเข้มข้น 60 µg/kg

AFB2	Spike Level(60 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
Staff#1_1	60.0	51.98	-13.37
Staff#1_2	60.0	57.06	-4.90
Staff#1_3	60.0	52.22	-12.97
Staff#1_4	60.0	54.21	-9.65
Staff#1_5	60.0	54.15	-9.76
Staff#1_6	60.0	55.04	-8.27
Staff#1_7	60.0	53.13	-11.45
Staff#1_8	60.0	55.61	-7.33
Staff#1_9	60.0	54.31	-9.49
Staff#1_10	60.0	56.70	-5.49
Staff#2_1	60.0	50.51	-15.81
Staff#2_2	60.0	54.79	-8.68
Staff#2_3	60.0	50.94	-15.10
Staff#2_4	60.0	52.09	-13.19
Staff#2_5	60.0	51.04	-14.93
Staff#2_6	60.0	53.45	-10.91
Staff#2_7	60.0	51.29	-14.51
Staff#2_8	60.0	53.41	-10.98
Staff#2_9	60.0	55.10	-8.17
Staff#2_10	60.0	55.34	-7.77
N		20	
mean		53.62	-10.64
SD.Pbias (stdev.p) (%)			3.346
Standard dev.measured (ug/kg)			
(stddev.s)		1.934	
RSDwR (%)		3.608	
U'(bias) (%)			11.150
U'percision		3.608	
U'combine (%)		11.720	11.720
U'expanded (%)		23.440	

ตารางที่ 15 แสดงค่าความไม่แน่นอนของสาร aflatoxin G₁ ที่ระดับความเข้มข้น 120 µg/kg

AFG1	Spike Level(120 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
Staff#1_1	120.00	141.92	18.27
Staff#1_2	120.00	142.28	18.57
Staff#1_3	120.00	141.87	18.22
Staff#1_4	120.00	140.98	17.48
Staff#1_5	120.00	141.87	18.23
Staff#1_6	120.00	134.54	12.12
Staff#1_7	120.00	141.38	17.82
Staff#1_8	120.00	139.14	15.95
Staff#1_9	120.00	141.39	17.82
Staff#1_10	120.00	142.56	18.80
Staff#2_1	120.00	137.01	14.17
Staff#2_2	120.00	141.57	17.97
Staff#2_3	120.00	141.84	18.20
Staff#2_4	120.00	140.34	16.95
Staff#2_5	120.00	134.04	11.70
Staff#2_6	120.00	141.87	18.22
Staff#2_7	120.00	140.45	17.04
Staff#2_8	120.00	140.26	16.88
Staff#2_9	120.00	139.42	16.18
Staff#2_10	120.00	135.42	12.85
N	20		
mean	140.01		17.33
SD.Pbias (stdev.p) (%)			2.151
Standard dev.measured (ug/kg)			
(stddev.s)	2.649		
RSDwR (%)	1.892		
U'(bias) (%)			17.461
U'percision	1.892		
U'combine (%)	16.916		17.563
U'expanded (%)	33.832		

ตารางที่ 16 แสดงค่าความไม่แน่นอนของสาร aflatoxin G₂ ที่ระดับความเข้มข้น 120 µg/kg

AFG2	Spike Level(120 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
Staff#1_1	120.00	139.19	15.99
Staff#1_2	120.00	139.87	16.56
Staff#1_3	120.00	141.41	17.84
Staff#1_4	120.00	138.04	15.04
Staff#1_5	120.00	141.45	17.88
Staff#2_1	120.00	140.72	17.27
Staff#2_2	120.00	139.67	16.39
Staff#2_3	120.00	140.38	16.98
Staff#2_4	120.00	141.69	18.08
Staff#2_5	120.00	142.14	18.45
Staff#1_1	120.00	136.02	13.35
Staff#1_2	120.00	139.32	16.10
Staff#1_3	120.00	135.31	12.76
Staff#1_4	120.00	140.01	16.68
Staff#1_5	120.00	136.41	13.67
Staff#2_1	120.00	142.48	18.73
Staff#2_2	120.00	137.23	14.36
Staff#2_3	120.00	141.76	18.14
Staff#2_4	120.00	141.38	17.82
Staff#2_5	120.00	140.69	17.24
N	20		
mean	139.76		16.47
SD.Pbias (stdev.p) (%)			1.729
Standard dev.measured (ug/kg)			
(stddev.s)	2.129		
RSDwR (%)	1.523		
U'(bias) (%)			16.556
U'percision	1.523		
U'combine (%)	16.626		16.626
U'expanded (%)	33.252		

9. สรุปผลการทดลอง

ผลของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ ในกากถั่วเหลือง แสดงดังตารางที่ 17 ดังนั้นจากการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ สามารถยืนยันได้ว่าวิธีการทดสอบนี้ มีความเหมาะสมในการทดสอบหา Aflatoxin G₂, G₁, B₂ และ B₁ ในกากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค HPLC-FLD

แสดงดังตารางที่ 17 สรุปผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ aflatoxins ในกากถั่วเหลือง ตามพารามิเตอร์ต่างๆ

No.	Parameter	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁
1	Linearity และ range ของสารมาตรฐาน	$r^2 = 0.9999$ $r = 0.9999$ (0.2 – 20.0 µg/L)	$r^2 = 0.9999$ $r = 0.9999$ (0.2 – 20.0 µg/L)	$r^2 = 0.9999$ $r = 0.9999$ (0.1 – 10.0 µg/L)	$r^2 = 0.9999$ $r = 0.9999$ (0.1 – 10.0 µg/L)
2	Matrix effect (%SSE)	104.24	94.35	91.76	82.81
3	Precision (Repeatability)	HORRAT _r อยู่ในช่วง 0.05 – 0.28 (2.4 – 120.0 µg/kg)	HORRAT _r อยู่ในช่วง 0.06 – 0.12 (2.4 – 120.0 µg/kg)	HORRAT _r อยู่ในช่วง 0.19 – 0.34 (1.2 – 60.0 µg/kg)	HORRAT _r อยู่ในช่วง 0.24 – 0.42 (1.2 – 60.0 µg/kg)
4	Precision (Reproducibility)	HORRAT _R 0.05 – 0.10 (2.4 – 120.0 µg/kg)	HORRAT _R 0.05 – 0.16 (2.4 – 120.0 µg/kg)	HORRAT _R 0.15 - 0.24 (1.2 – 60.0 µg/kg)	HORRAT _R 0.10 – 0.29 (1.2 – 60.0 µg/kg)
5	Accuracy	% Recovery อยู่ในช่วง 106.68 – 117.87 %	% Recovery อยู่ในช่วง 100.08 – 117.33 %	% Recovery อยู่ในช่วง 72.99 – 90.73 %	% Recovery อยู่ในช่วง 73.48 – 92.48 %
7	LOD	0.6 µg/kg	0.6 µg/kg	0.2 µg/kg	0.2 µg/kg
8	LOQ	2.0 µg/kg	2.0 µg/kg	1.0 µg/kg	1.0 µg/kg
9	Expanded measurement uncertainty	33.252 %	33.832 %	22.440 %	22.614 %

10. ข้อเสนอแนะ

-

11. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ. เสิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการโครงการวิจัยครั้งนี้ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ และเจ้าหน้าที่ งานพิษวิทยาและชีวเคมี สารพิษจากเชื้อรา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่มีส่วนช่วยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จ

12. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะอาหารสัตว์

เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. 2559 ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 133 ตอนพิเศษ 99 ง, หน้า1, 3 พฤษภาคม 2559
กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. ข้อมูลกากถั่วเหลืองพิกัด 2304.00.90. [ออนไลน์] เข้าถึงได้ที่

<https://api.dtn.go.th/files/v3/5f719d3eef414057c85b4ecc/download>

Aflatoxin B1, B2, G1 และ G2 ศิริประภา ชูช่วย, ประกรณ์ จาละ, ธนภูมิ มณีบุญ, ปาริยา อุดมกุศลศรี, ณัฐสิทธิ์
ตันสกุล. 2560. การตรวจ

วิเคราะห์อะฟลาทอกซินปี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ปีที่ 36. ฉบับที่ 2, มี.ค.-เม.ษ. 2560.

ประวัติ ตันบุญเอก, อมรา สนิมทอง และ กลอยใจ สำเร็จวิทย. 2534. การตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซิน

โดยวิธี ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay). ว. วิชาการเกษตร 9 : 78-83
(2534)

ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล, กมลชัย ตรงวานิชนาม, ปาริยา อุดมกุศลศรี และ ศศิธร ลิ้มสุวรรณ. 2557. การปนเปื้อนสาร
อะฟลา ทอกซินและออกคราทอกซิน เอ ในอาหารสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย. สัตวแพทยมหาสารคาม.
9(1): 1-9.

วรัญญา จริยาวัฒนชัยกุล. 2012. เปรียบเทียบวิธีการสกัดอะฟลาทอกซินปีหนึ่งระหว่างสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง
กับการสกัดด้วยตัวทำละลาย. วารสารรามคำแหง. 29(1) : 42

อรอุษา อุสนโน. 2546. ผลของอะฟลาทอกซินปี1ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. สงขลา : คณะทรัพยากรธรรมชาติ.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 14-15.

AOAC Official Methods of Analysis, (2019). Guidelines for dietary supplements and botanicals.
Appendix K, P.7.

D. Dhanasekaran, S. S., N. Thajuddin, A. Panneerselvam. (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis
in Human and Animals.

EURACHEM Guide Second Edition (2014). The Fitness for purpose of analytical methods:
A Laboratory guide to method validation and related topics.

EURL for Residues of Pesticides, (2020). Analytical quality control and method validation
procedures for Pesticide Residues Analysis in food and feed. Document No.
SANTE/12682/2019.

European Commission Decision 2002/65/EC Of 12 August 2002 Implementing council
directive 96/23/CE concerning the performance of analytical method and
the interpretation of result. Office journal of the European communities. 2002 L221/8.

Julius Albert, Camilla A. More, Niklaus R. P. Dahlke, Zacharias Steinmetz, Gabriele E. Schaumann,

- and Katherine Munoz (2021). Validate of Simple and Reliable Method for the Determination of Aflatoxins in Soil and Food Matrices, P.18687.
- L.C. Huang, N. Zheng, B.Q. Zheng, F. Wen, J.B. Cheng, R.W. Han., et al. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and alpha-zearalenone in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, 146, 247.
- Vicam AflaTest WB SR⁺ Instruction Manual. (2021). AFLATEST HPLC Procedure For Wheat, Oats, other Grains, and Feed, P.10