

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ cereulide ในจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry

ภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว¹ ชนิตา แก้วเกิดสี¹ ไกรวุฒิ นวลขาว¹

บทคัดย่อ

Cereulide เป็นสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย *Bacillus cereus* บางสายพันธุ์ สารพิษนี้มีลักษณะโครงสร้างเป็นวงแบบ dodecadepsiptide ขนาดโมเลกุล 1.2 kDa สามารถทนความร้อนและกรด ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียนเมื่อบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษนี้ วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้ เพื่อพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้มีความถูกต้อง ความไว และความน่าเชื่อถือสำหรับวิเคราะห์ cereulide ในจิ้งหรีด โดยใช้เทคนิคเจือจางไอโซโทปที่เสถียร (stable isotope dilution assay, SIDA) และเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดแมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS) โดยสกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) การกรอง (filtration) และเติม ¹³C₆-cereulide ก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ภายใต้สภาวะการชะตัวอย่างแบบไอโซคราติก (isocratic elution) โดยใช้ 10 mM ammonium formate และ acetonitrile กับ 0.1% formic acid เป็นสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของสหภาพยุโรป SANTE/11352/2021 ที่ค่าความแม่นยำโดยค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 70-120% ค่าความเที่ยงโดยค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20% ค่าขีดความสามารถของการตรวจพบเท่ากับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 8.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าผลกระทบจากเมทริกซ์มีค่า %signal suppression and enhancement อยู่ระหว่าง 80-120% ตามลำดับ

คำสำคัญ : การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์, cereulide, LC-MS/MS, จิ้งหรีด

¹ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ 91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

Method validation for cereulide determination in cricket by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Panuwat Sungpethkaew¹ Chanida Kaewkerdsi¹ Kraiwut Nualkaw¹

Abstract

Cereulide is an emetic toxin produced by some strains of *Bacillus cereus*. This bacterial toxin, a cyclic 1.2 kDa dodecadepsipeptide, is stable to heat and acids and causes nausea and vomiting when ingested via contaminated foods. The objective of this study was to develop and validate a reliable, sensitive, and accurate method for determination of cereulide in cricket using stable isotope dilution assay (SIDA) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The cricket samples were extracted with acetonitrile, purified by centrifugation, filtration and adding ¹³C₆-cereulide before the LC-MS/MS analysis. The chromatographic condition was used isocratic elution by 10 mM ammonium formate and acetonitrile with 0.1% formic acid. The method's performance complied with the SANTE/11352/2021 guideline and had mean recovery accuracies in the range of 70–120% and precision testing of percent relative standard deviation (RSD) <20%. The limit of detection and limit of quantification values were 2.0 µg/kg and 8.0 µg/kg, respectively. The matrix effect testing of %signal suppression and enhancement (SSE) was 108.2%. This indicated that the method may be used for identification and quantification of cereulide in cricket.

Keywords: method validation, cereulide, LC-MS/MS, cricket

¹Bureau of Quality Control of Livestock Product, 91 Moo 4 Tiwanon Rd., Bangkadi, Mueng, Pathumthani, 12000
กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ cereulide ในจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ให้มีสมรรถนะเหมาะสมกับการใช้งาน และผ่านเกณฑ์การพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของ SANTE/11352/2021

2. ขอบข่าย

วิธีวิเคราะห์ cereulide ในจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์ cereulide ในจิ้งหรีด ด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ที่สามารถยืนยันชนิดและปริมาณ และผ่านเกณฑ์การพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของ SANTE/11352/2021

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ AB Sciex รุ่น QTRAP5500
- 4.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG 603-S และ ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA623S-CW
- 4.1.3 เครื่อง Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2
- 4.1.4 เครื่อง Nitrogen Evaporator ยี่ห้อ Biotage
- 4.1.5 เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MFD
- 4.1.6 เครื่อง Vacuum pump ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S
- 4.1.7 เครื่อง shaker ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น LS500
- 4.1.8 Micropipette ขนาด 2 – 20 μL
- 4.1.9 Micropipette ขนาด 10 – 100 μL
- 4.1.10 Micropipette ขนาด 100 - 1,000 μL
- 4.1.11 Micropipette ขนาด 500 - 5,000 μL

4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

4.2.1 สารเคมี

- 4.2.1.1 สารเคมีเกรด LC-MS ได้แก่ ammonium formate solution, formic acid
- 4.2.1.2 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (CH_3CN), methanol
- 4.2.1.3 น้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า $18.2 \text{ M}\Omega^{-\text{cm}}$

4.2.2 สารมาตรฐาน

4.2.2.1 สารมาตรฐาน (reference standard) cereulide ความเข้มข้น 50 µg/mL

ยี่ห้อ chiralix

4.2.2.2 สารมาตรฐานภายใน (internal standard) ¹³C₆-cereulide ความเข้มข้น 20 µg/mL

ยี่ห้อ chiralix

4.3 อุปกรณ์

4.3.1 HPLC Column Kinetex C18 2.1×100mm., 2.6 µm. ยี่ห้อ Phenomenex

4.3.2 Centrifuge tube ขนาด 50 mL

4.3.3 Syringe พลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม

4.3.4 Syringe Filters ชนิด PTFE ขนาด 0.20 µm

4.3.5 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum

4.3.6 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mL

4.3.7 กระจกตวงขนาด 50, 100, 1000 mL

4.3.8 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ mobile phase

5. วิธีดำเนินการ

5.1 เตรียมสารมาตรฐาน cereulide และสารมาตรฐานภายใน ¹³C₆-cereulide ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรง และเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive ionization)

5.2 Precursor ion scan

ทำการสแกนหาผลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion ของสารมาตรฐาน และสารมาตรฐาน ภายใน โดยการกำหนดช่วงของค่า m/z (Q1) ให้ทำงานในโหมดสแกน เมื่อได้ค่า m/z ของ precursor ion ที่สนใจ แล้วจึงทำการหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของ precursor ion ได้แก่ declustering potential (DP) และ entrance potential (EP)

5.3 Product ion scan

ทำการปรับตั้ง Q1 โดยยอมให้เฉพาะ precursor ion ผ่านไปยัง Q2 (collision cell) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว จากนั้นจึงใช้ Q3 มาทำการสแกนหา product ion 2 ion สำหรับสารมาตรฐาน cereulide และ product ion 1 ion สำหรับสารมาตรฐานภายใน ¹³C₆-cereulide ที่ให้ค่าสัญญาณ (signal) สูงสุด

5.4 Multiple reaction monitoring

การตรวจวัดทำได้โดยการปรับตั้ง Q1 ให้เฉพาะ m/z ของ precursor ion ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านไป และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว จากนั้นตั้ง Q3 ให้ตรวจวัดเฉพาะ product ion ที่เกิดจาก

การแตกตัวจาก precursor ion ที่ต้องการ แล้วจึงทำการหาค่าพลังงานที่ใช้แตกตัวให้เหมาะสม ได้แก่ collision energy (CE) และ collision cell exit potential (CXP)

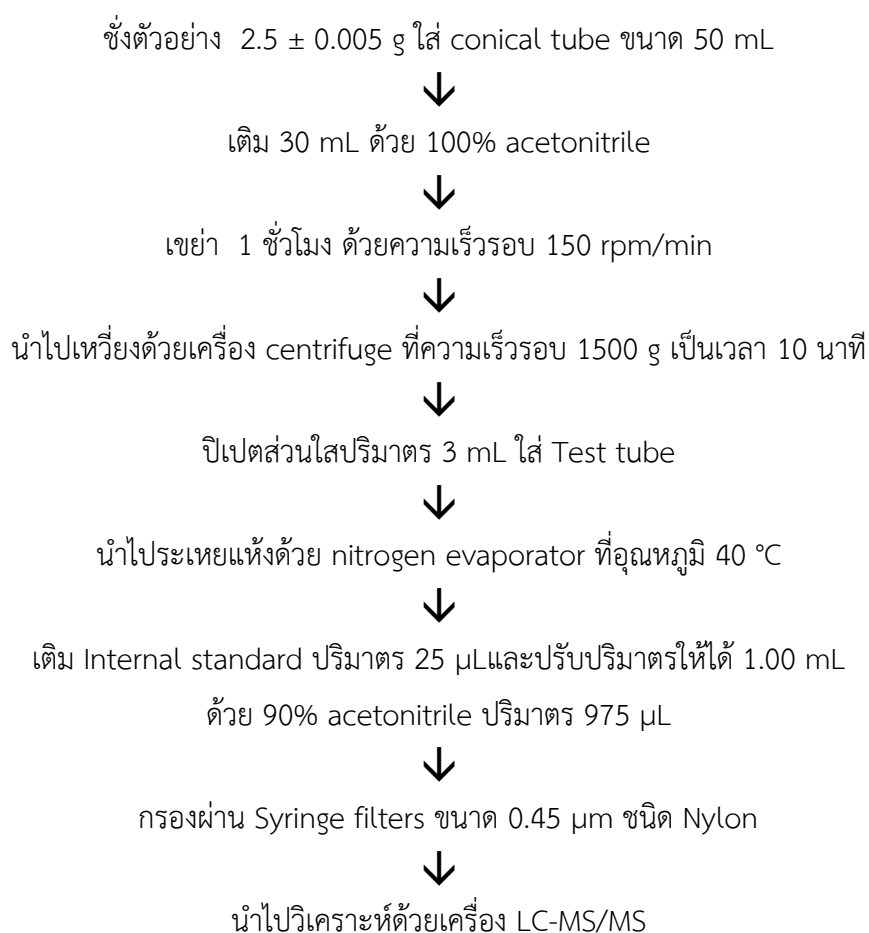
5.5 ทดสอบสภาวะสำหรับการแยกสารมาตรฐาน cereulide และสารมาตรฐานภายใน $^{13}\text{C}_6$ -cereulide ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง (UHPLC) แบบ reverse phase chromatography ของเครื่อง LC-MS/MS

5.6 ทำการตรวจสอบค่า linearity และ range ของสารมาตรฐานสารพิษจากแบคทีเรีย (cereulide toxin) โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน ประกอบด้วย 5 ระดับความเข้มข้น โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน cereulide ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40 ng/mL และเติมสารมาตรฐานภายใน $^{13}\text{C}_6$ -cereulide ที่ระดับความเข้มข้น 25 ng/mL โดยเตรียมความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำค่า peak area ratio ระหว่างสารมาตรฐาน cereulide กับ $^{13}\text{C}_6$ -cereulide และค่าความเข้มข้นไปสร้างความสัมพันธ์เชิงเส้น เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) และทดสอบช่วงของการทดสอบ (range) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.990 (AOAC, 2019) และคำนวณความเข้มข้นจริงกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ โดยพิจารณาจากค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐาน cereulide ต้องไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE/11352/2021, 2021)

5.7 การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect) โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน cereulide ในตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40 ng/mL และในเมทริกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ซึ่งสามารถคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ และความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย เพื่อคำนวณหา %SSE (Huang et al., 2014) ดังนี้

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

5.8 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากแบคทีเรีย (cereulide toxin) จากวิธีอ้างอิง Bacteriological Analytical Manual, Chapter 14: Bacillus cereus. (BAM, 2020)



5.9 การทดสอบเพื่อหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และค่าขีดการจำกัดของการตรวจวัด (LOQ) โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน cereulide toxin ความเข้มข้นระดับที่ 1 แล้วทำตามวิธีทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S_0'$ และค่า LOQ จาก $10S_0'$ (Eurachem, 2014) โดยมีวิธีคำนวณหา S_0' ดังนี้

$$S_0' = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

โดยที่ S_0' = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล
n = จำนวนการทดสอบซ้ำในการทดสอบประจำวัน

5.10 การยืนยันค่า LOD (Limit of detections) โดยการเติมสารมาตรฐาน cereulide toxin ที่ความเข้มข้น 2 µg/kg ลงใน sample blank แล้วนำไปทำตามขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 10 ซ้ำ ผลที่ได้ต้องตรงระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3

5.11 การยืนยันค่า LOQs (Limit of Quantifications) โดยการเติมสารมาตรฐาน cereulide toxin ที่ความเข้มข้น 8 µg/kg ลงใน sample blank แล้วนำไปทำตามขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 10 ซ้ำ

ผลที่ได้ต้องอยู่ระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3 และได้ค่าร้อยละการกลับคืน อยู่ในช่วง 70-120 % และค่า %RSD_r ≤ 20 %

5.12 การทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ (accuracy)

ทำการทดสอบโดยการนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน cereulide toxin ที่ระดับความเข้มข้น 8, 40, 160 µg/kg และทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยผลที่ได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ระหว่าง 70-120% และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ≤ 20% (SANTE/11352/2021, 2021)

5.13 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (repeatability)

ทำการทดสอบโดยการนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน cereulide toxin ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ตามข้อ 8.12 และทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดย โดยเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงของการทดสอบซ้ำ (repeatability) พิจารณาจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD_r) ≤ 20% (SANTE/11352/2021, 2021)

5.14 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (within-laboratory reproducibility)

ทำการทดสอบโดยการนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน cereulide toxin ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ตามข้อ 8.12 โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน แต่ต่างนักวิเคราะห์และต่างวันที่วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงของการทดสอบซ้ำ (within-laboratory reproducibility) พิจารณาจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD_{wR}) ≤ 20% (SANTE/11352/2021, 2021)

5.15 การประมาณค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) ตามแนวทางของ SANTE/11352/2021 สามารถประมาณความไม่แน่นอนได้จากข้อมูลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดังนี้

5.15.1 การคำนวณหาความลำเอียงสัมพัทธ์ (relative bias)

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

5.15.2 การประมาณความไม่แน่นอนมาตรฐานจากความลำเอียง; U'(bias) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

5.15.3 การประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากการทำซ้ำ; U'(precision) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

5.15.4 การประมาณค่าความไม่แน่นอนรวม; U'(combined) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

5.15.5 การประมาณความไม่แน่นอนขยาย; U'expanded โดยคูณค่า U'(combined) ด้วย coverage factor, k = 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(expanded) = k \times U'(combined)$$

โดยค่าความไม่แน่นอนขยายสำหรับวิธีทดสอบต้องไม่เกิน 50% (SANTE/11352/2021, 2021)

6. ผลการทดลอง

6.1 จากผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับส่วนการแยกสารมาตรฐาน cereulide ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และส่วน mass spectrometer ได้สถานะที่เหมาะสมดังตารางที่ 1-3 และแสดงโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐาน cereulide โดยแบ่งออกเป็นโครมาโทแกรมใน positive ionization แสดงตามรูปที่ 1-3

ตารางที่ 1 แสดง HPLC conditions

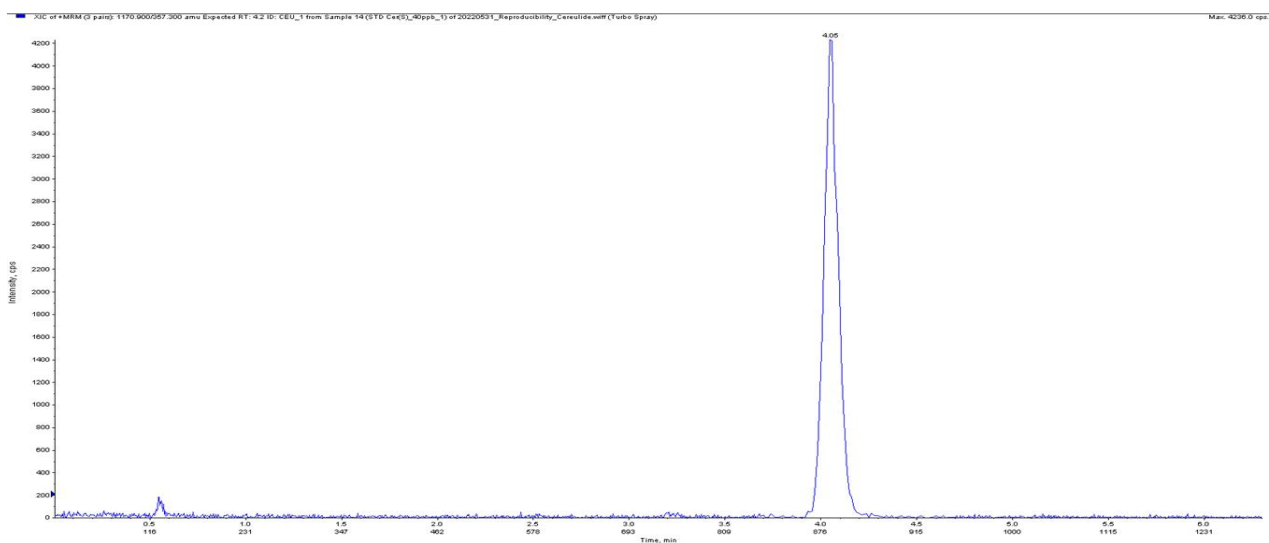
Parameter	Conditions
HPLC Column	Kinetex C18 ขนาด 2.1×100 mm., 2.6 μm
Flow rate	0.40 mL/min
Injection volume	5 μL
Run time	12.00 min
Mobile phase Line A	10 mM ammonium formate with 0.1% formic acid
Mobile phase Line B	Acetonitrile with 0.1%formic acid
Elution mode	Isocratic elution

ตารางที่ 2 แสดงสถานะของ Interface parameter ของแหล่งกำเนิดไอออนแบบ ESI

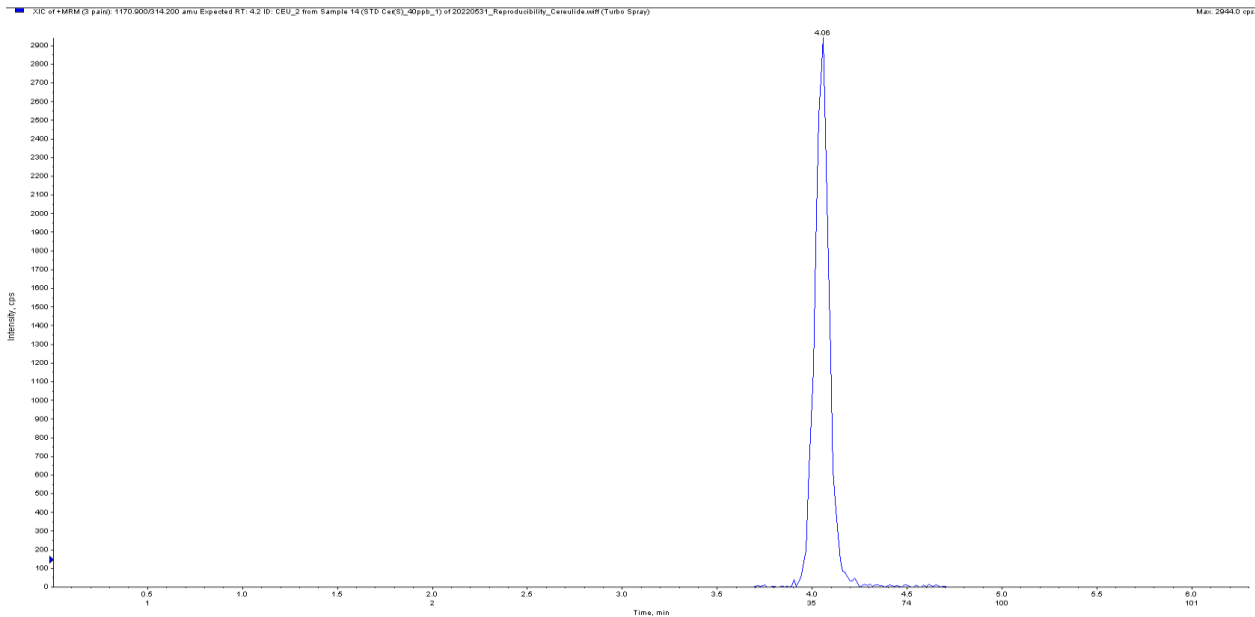
Mass spectrometer	Conditions
Ion Source	ESI (+)
Curtain Gas (CUR)	20 psi
Collision Gas (CAD)	Medium
IonSpray Voltage (IS)	4500 V
Temperature (TEM)	550 °C
Ion Source Gas 1 (GS1)	45 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	55 psi

ตารางที่ 3 แสดง MS/MS Parameter แบบ MRM ของสารมาตรฐาน cereulide และ ¹³C₆-cereulide

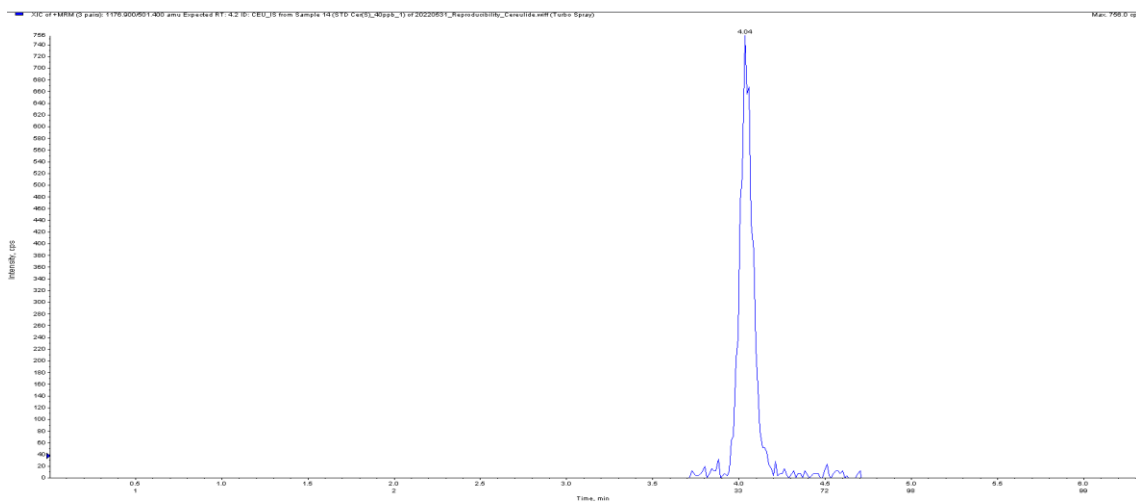
Analyte	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Cereulide	4.20	1170.9 [M+NH ₄] ⁺	357.3	100	10	79	8
		1170.9	314.2	100	10	87	2
¹³ C ₆ -cereulide	4.20	1176.9 [M+NH ₄] ⁺	501.4	80	10	83	14



รูปที่ 1 Extracted ion chromatogram (quantitative peak) ของสารมาตรฐาน cereulide ที่ความเข้มข้น 40 ng/mL



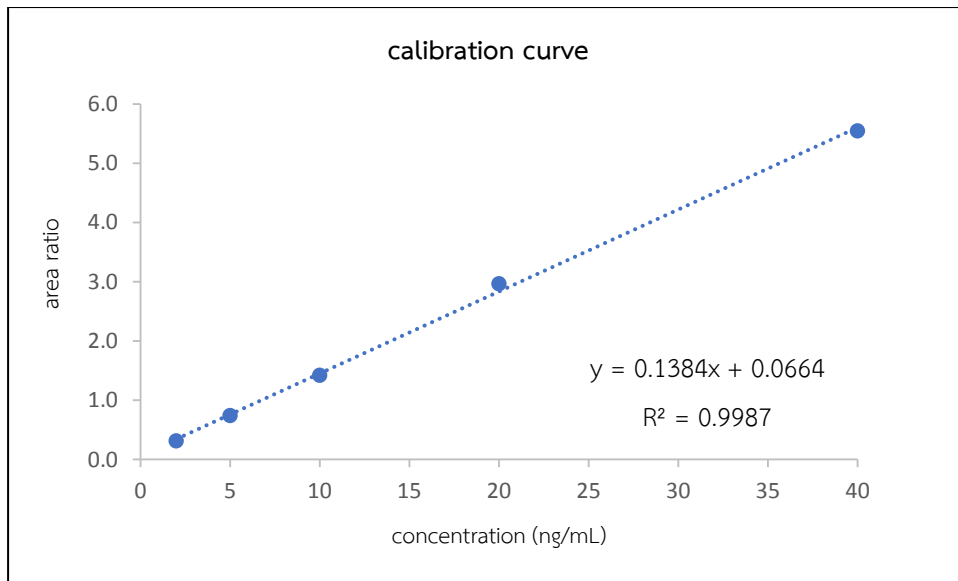
รูปที่ 2 Extracted ion chromatogram (qualitative peak) ของสารมาตรฐาน cereulide ที่ความเข้มข้น



40 ng/mL

รูปที่ 3 Extracted ion chromatogram ของ Internal standard $^{13}\text{C}_6$ -cereulide ที่ความเข้มข้น 25 ng/mL

6.2 จากผลของการทดสอบ linearity และ range ของสารมาตรฐาน cereulide และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990 พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (AOAC, 2019) ตามรูปที่ 4 และคำนวณความเข้มข้นจริงกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ โดยพิจารณาจากค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐานต้องไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE/11352/2021, 2021) ตามตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง area ratio และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cereulide

ตารางที่ 4 แสดงค่า deviation of back calculated concentration ของกราฟมาตรฐาน cereulide

True concentration (ng/mL)	Calculated concentration (ng/mL)	Deviation of back calculated concentration (%)
2.00	1.64	-18
5.00	4.91	-2
10.00	9.76	-2
20.00	21.19	6
40.00	39.49	-1

6.3 จากผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ โดยประเมินจากค่า %SSE ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายพบว่าได้ 108.17 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ 80-120 % จึงถือว่าผลของ matrix effect อยู่ในระดับที่ยอมรับ (SANTE/11352/2021, 2021)

6.4 จากผลการทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน cereulide และคำนวณหา LOD และ LOQ ได้ผลตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ข้อมูลของตัวอย่าง sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน cereulide ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1

No.	Conc spike (ppb)	Conc ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	S/N
-----	------------------	----------------------------------	-----

1	2.00	3.23	9.00
2	2.00	1.87	27.30
3	2.00	1.58	31.40
4	2.00	2.03	34.70
5	2.00	1.73	29.80
6	2.00	1.84	10.10
7	2.00	1.72	36.40
8	2.00	2.80	3.60
9	2.00	1.29	26.60
10	2.00	1.46	30.10
Average		1.95	
SD		0.61	
n		1	
LOD=3SD		1.82	
LOQ=10SD		6.06	

6.5 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดสารพิษจากแบคทีเรีย (cereulide toxin) โดยค่า LOD เท่ากับ 2 µg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 8 µg/kg โดยแสดงค่า LOD และ LOQ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ

No.	LOD = 2 µg/kg		LOQ = 8 µg/kg	
	S/N	Concentration (µg/kg)	%recovery	S/N
1	10.50	8.12	101.56	29.2
2	13.20	8.41	105.09	48.8
3	8.70	8.39	104.89	35.2
4	13.30	8.25	103.15	58.5
5	16.40	7.47	93.44	26.5
6	10.50	7.40	92.54	48.4
7	22.70	8.40	105.02	30.0
8	13.40	7.96	99.45	38.5
9	7.00	7.75	96.90	9.6
10	18.40	7.49	93.61	32.7
Average	13.41	7.97	99.56	35.74

SD	-	0.41	5.11
%RSD	-	5.13	5.13

6.6 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยงของวิธีทดสอบ (precision) สำหรับสารพิษจากแบคทีเรีย (cereulide) พบว่าค่า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 85.54–112.93 % แสดงตามตารางที่ 7 และค่าความเที่ยง แสดงจากค่า %RSD_r ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ คือ ≤ 20% พบว่าค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ (repeatability) ได้ค่า %RSD_r อยู่ระหว่าง 2.62–7.71 % และค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกันแต่นักวิเคราะห์และต่างวันที่วิเคราะห์ (within-laboratory reproducibility) ได้ค่า %RSD_{WR} อยู่ระหว่าง 5.67–8.52 % แสดงตามตารางที่ 8

ตารางที่ 7 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ในตัวอย่างจิ้งหรีด

No.	8 µg/kg		40 µg/kg		160 µg/kg	
	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
1	7.24	90.50	44.97	112.44	168.53	105.33
2	6.84	85.54	38.38	95.94	177.48	110.93
3	7.29	91.07	38.37	95.91	163.68	102.30
4	7.09	88.63	37.30	93.26	176.77	110.48
5	6.96	87.05	39.17	97.92	180.68	112.93
Average	7.08	88.56	39.64	99.09	173.43	108.39
SD	0.19	2.32	3.06	7.64	7.06	4.41
%RSD	2.62	2.62	7.71	7.71	4.07	4.07

ตารางที่ 8 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (precision) ในตัวอย่างจิ้งหรีด

Condition	No.	8 µg/kg		40 µg/kg		160 µg/kg	
		Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
Staff 1	1	7.24	90.50	44.97	112.44	168.53	105.33
	2	6.84	85.54	38.38	95.94	177.48	110.93

	3	7.29	91.07	38.37	95.91	163.68	102.30
	4	7.09	88.63	37.30	93.26	176.77	110.48
	5	6.96	87.05	39.17	97.92	180.68	112.93
Staff 2	1	7.66	95.71	38.89	97.24	158.90	99.31
	2	7.82	97.70	36.25	90.63	157.89	98.68
	3	8.05	100.66	39.94	99.86	157.19	98.24
	4	8.84	110.47	38.08	95.19	175.88	109.92
	5	8.33	104.12	37.89	94.72	157.76	98.60
Average		7.61	95.15	38.92	97.31	167.48	104.67
SD		0.65	8.11	2.35	5.89	9.50	5.94
%RSD		8.52	8.52	6.05	6.05	5.67	5.67

6.7 การประมาณค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 จากข้อมูล method validation โดยนำข้อมูล within-laboratory reproducibility พบว่าความไม่แน่นอนขยาย; U'(expanded) พบว่าไม่เกิน 50% (SANTE/11352/2021, 2021) ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสารพิษจากแบคทีเรีย (cereulide toxin)

Cereulide	Spike Level (40 µg/kg)	Measure (µg/kg)	relative bias (%)
1	40	44.97	12.44
2	40	38.38	-4.06
3	40	38.37	-4.09
4	40	37.30	-6.74
5	40	39.17	-2.08
6	40	38.89	-2.76
7	40	36.25	-9.37
8	40	39.94	-0.14
9	40	38.08	-4.81
10	40	37.89	-5.28
N		10	
mean		38.92	-2.69
SD.Pbias (stdev) (%)			5.886
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		2.354	

RSDwR (%)	6.048	
U'(bias) (%)		6.471
U'precision	6.048	
U'combine (%)	8.857	8.857
U'expanded (%)	17.715	

7. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องตรวจวัด Mass Spectrometer พบว่าสามารถใช้ค่าตามพารามิเตอร์ต่างๆ ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษ cereulide และสามารถแยกสารพิษ cereulide ด้วยเทคนิค HPLC โดยจะได้โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและ ¹³C-ISTD cereulide แสดงดังรูปที่ 1-3

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานโดยมีช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 2-40 ng/mL โดยมีค่า correlation coefficient, r) คือ 0.9987 พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ และค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐานของสารพิษ cereulide อยู่ระหว่าง -18 ถึง 6 % พบว่าไม่เกิน $\pm 20\%$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

การศึกษา matrix effect โดยประเมินจากค่า %SSE พบว่าได้ 108.17 % ซึ่งอยู่ในช่วง 80-120% อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ค่า LOD เท่ากับ 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ และค่า LOQ เท่ากับ 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ค่า %recovery มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 85.54–112.93 % และค่าความเที่ยงจาก %RSD ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ คือ $\leq 20\%$ พบว่าค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ (repeatability) %RSD_r อยู่ระหว่าง 2.62-7.71 % และค่าความเที่ยงของวิธีทดสอบแบบ within-laboratory reproducibility ค่า %RSD_{wR} อยู่ระหว่าง 5.67-8.52 % และการประมาณค่าความไม่แน่นอน ตามแนวทางของสหภาพยุโรป SANTE/11352/2021 พบว่าค่าความไม่แน่นอนขยาย (U'(expanded)) เท่ากับ 17.715%

8. ข้อเสนอแนะ

-

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) สำหรับความร่วมมือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

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

Appendix K, P.7.

EURACHEM. 2014. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. The Fitness

for Purpose of Analytical Method EURACHEM Guide.

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.

SANTE/11352/2021. (2021). Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed.

Tallent, S. M., Knolhoff, A., Rhodehamel, J., Harmon, S. M., RW, B., & US Food and Drug Administration. (2020). Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 14: *Bacillus cereus*.