

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้า ด้วยเทคนิค HPLC

กนกวรรณ มงคล สุณีย์ คณาพิพัฒน์ พงษ์พิพัฒน์ สุวพัฒน์

วารารณ ยุบลโชติ จันทรพิมพ์ ไทรทอง

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 (Pyridoxine hydrochloride) ในสารผสมล่วงหน้า ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ 25 mM KH_2PO_4 และ 5 mM Sodium hexanesulfonate ในน้ำปราศจากไอออน : 5 mM Sodium hexanesulfonate ในเมทานอล แบบ isocratic elution (85:15, v/v) ในคอลัมน์ Inertsil ODS-3 ชนิด C18 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที ในเวลา 10 นาที โดยใช้ส่วนตรวจวัดตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่า ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.1 -5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 1 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบได้มีค่าเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าต่ำสุดที่หาปริมาณได้มีค่าเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของค่าการคืนกลับเฉลี่ยอยู่ในช่วง 94.34 - 95.95 ความเที่ยงแบบทวนซ้ำมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 0.31 - 2.29 ความเที่ยงแบบทำซ้ำมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงร้อยละ 0.52 - 4.37 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความแม่นยำและความเที่ยง โดยมีช่วงการใช้งาน 5 - 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าได้

คำสำคัญ : วิตามินบี 6, ไพริดอกซีน ไฮโดรคลอไรด์, HPLC-DAD, สารผสมล่วงหน้า, การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for Determination of Vitamin B6 in Premixes by HPLC

Kanokwan Mongkol Sunee Kanapipat Phongpipat Suwapat

Varaporn Yubolchote Chanpim Saitong

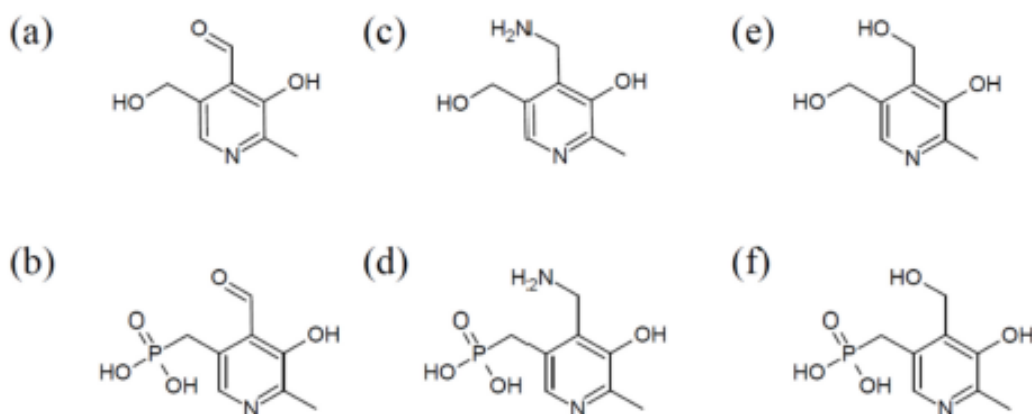
The method for determining vitamin B6 (Pyridoxine hydrochloride) in premixes using high-performance liquid chromatography with diode array detector was validated. Chromatographic separation was achieved in under 10 minutes using an Inertsil ODS-3 C18 column at 35°C, with a mobile phase composed of 25 mM KH₂PO₄ and 5 mM sodium hexanesulfonate in deionized water, combined with 5 mM sodium hexanesulfonate in methanol (85:15, v/v). Isocratic elution was performed at a flow rate of 0.7 mL/min, with detection at 280 nm using a diode array detector. The method demonstrated linearity within the range of 0.1 to 5.0 mg/L, with a correlation coefficient (r) of 1. The limit of detection (LOD) was 2.5 mg/kg, and the limit of quantification (LOQ) was 5 mg/kg. The mean percent recovery ranged from 94.34 to 95.95. The relative standard deviations of the repeatability were been 0.31 to 2.29 and The relative standard deviations of the within-laboratory reproducibility were been 0.52 to 4.37. The results showed that the method is accurate and precise in the working rang of 5 – 250 mg/kg for determination of Vitamin B6 in premixes.

Keyword: Vitamin B6, Pyridoxine hydrochloride, HPLC-DAD, Premixes, Method validation

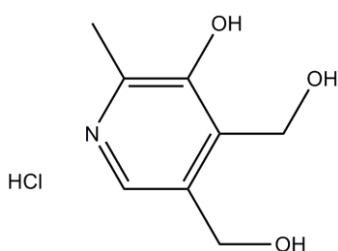
Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products.
Department of Livestock Development

บทนำ

วิตามินบี 6 ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาทางเคมีในร่างกายที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเผาผลาญและการใช้ประโยชน์แป้ง ไขมัน และโปรตีนในร่างกายจำนวนมากมาย โดยเฉพาะมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโน สามารถพบได้ในอาหารสัตว์ทั่วไป หากขาดวิตามินบี 6 ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง เป็นโรคโลหิตจาง มีอาการชักได้ (วรรณพร, 2560; อุทัย, 2559) โดยวิตามินบี 6 นั้นเป็นกลุ่มสารหลายชนิดด้วยกัน เช่น pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxal 5-phosphate, pyridoxamine 5-phosphate, pyridoxine 5-phosphate (ภาพที่ 1) (Parra *et al.*, 2018) วิตามินบี 6 ในรูป pyridoxine เป็นรูปแบบหลักที่พบในวัตถุดิบจากพืช ส่วน pyridoxamine และ pyridoxal เป็นรูปแบบหลักที่พบในวัตถุดิบจากสัตว์ สำหรับ Pyridoxine hydrochloride (ภาพที่ 2) ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี (ESFA, 2011)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินบี 6 (a) Pyridoxal (b) pyridoxal 5'-phosphate (c) pyridoxamine (d) pyridoxamine 5'-phosphate (e) pyridoxine (f) pyridoxine 5'-phosphate (Parra *et al.*, 2018)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Pyridoxine hydrochloride (ESFA, 2011)

ไพริดอกซีนไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine hydrochloride) มีสูตรโมเลกุล $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ น้ำหนักโมเลกุล 205.6 ความหนาแน่นประมาณ 0.69 g/cm^3 มีความสามารถละลายน้ำประมาณ 200 g/L ไม่ละลายในคลอโรฟอร์มและไดเอซิลอีเธอร์ วิตามินบี 6 ในรูปแบบไพริดอกซีนไฮโดรคลอไรด์ได้รับอนุญาตใช้เป็นวัตถุที่

เติมในอาหารสัตว์ของสหภาพยุโรปตาม Regulation (EC) No 1831/2003 โดยไม่มีการกำหนดปริมาณสูงสุดของไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์สำหรับอาหารสัตว์ทุกชนิดและทุกประเภท (ESFA, 2011) ขณะที่ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ราชกิจจานุเบกษา, 2559ก) ได้กำหนดปริมาณต่ำสุดของ Pyridoxine hydrochloride ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป ดังนี้ ไก่เนื้อ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไก่ไข่ 2.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสุกร 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ราชกิจจานุเบกษา, 2559ข) ได้กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภทวัตถุดิบผสมแล้วชนิดสารผสมล่วงหน้า (พรีมิกซ์) โดยต้องมีส่วนผสมที่ประกอบด้วยวัตถุดิบที่เติมในอาหารสัตว์ผสมกับสื่อ (Carriers) ตามที่ปรากฏในใบสำคัญการขึ้นทะเบียนอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะที่ผู้รับใบอนุญาตได้ขอขึ้นทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ การตรวจสอบปริมาณส่วนผสมจึงมีความสำคัญเพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะว่าเป็นไปตามที่ขึ้นทะเบียนไว้หรือไม่ ทางห้องปฏิบัติการเคมี กลุ่มตรวจสอบอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อเพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือเกิดความเชื่อมั่นในวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น เป็นไปตามมาตรฐานสากล

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC ตามพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ความแม่นยำ และความเที่ยง เป็นต้น

1.2 เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC เป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานและผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ

2. ขอบข่าย

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC-DLD ดังนี้

- 2.1 หาสถานะของเครื่อง HPLC-DLD 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)
 - 2.7.1 แบบทวนซ้ำได้ (repeatability)
 - 2.7.2 แบบทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility)

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 เพื่อใช้เป็นวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC ของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

3.2 เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและยอมรับในวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 Infinity

4.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.1.3 เครื่อง Ultrasonic bath

4.1.4 เครื่อง water bath

4.1.5 เครื่อง Vacuum pump

4.1.6 เครื่อง Centrifuge

4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

4.2.1 วิตามินบี 6 (Pyridoxine hydrochloride)

4.2.2 Glacial acetic acid, AR grade

4.2.3 Methanol, HPLC grade

4.2.4 Potassium dihydrogen orthophosphate anhydrous, AR grade

4.2.5 Sodium hexanesulfonate, AR grade

4.2.6 น้ำจัดไอออน (Deionized water,DI) ความต้านทานไม่น้อยกว่า 18 MΩ·cm

4.3 อุปกรณ์

4.3.1 Volumetric flask สีชา ขนาด 50, 100 และ 1000 ml

4.3.2 Volumetric pipette ขนาด 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ml

4.3.3 Vial สีชา พร้อมฝาและ Septum ขนาด 2 ml

4.3.4 Syringe พลาสติกขนาด 3 µl ชนิดไม่มีหัวเข็ม

4.3.5 Syringe filters ชนิด Nylon ขนาด 0.45 µm , 13 mm

4.3.6 Cylinder ขนาด 25 ml

4.3.7 หลอดใส่ตัวอย่าง (Tube) ขนาด 50 ml พร้อมฝาปิด

4.3.8 กระดาษชั่งสาร

4.3.9 ซ้อนตักสาร

5. วิธีดำเนินการ

5.1 ศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง และวางแผนการทดลอง

5.2 จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี สารละลายมาตรฐาน และเตรียมตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าเพื่อใช้ในการทดสอบ

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพเครื่อง HPLC-DAD

5.3.1 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมเพื่อกำหนดรายละเอียด HPLC Conditions สำหรับตรวจวัดสารวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้า

5.3.2 การหาค่า Instrument detection limit (IDL)

5.3.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/l

5.3.2.2 ตรวจวัดสารวิตามินบี 6 ด้วยเครื่อง HPLC-DAD 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 6 ที่ความเข้มข้นระดับ IDL ทำการตรวจวัด 3 ซ้ำ

5.3.2.6 ตรวจสอบสัญญาณฟีดแบ็กสารวิตามินบี 6 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 6 จำนวน 6 ความเข้มข้น คือ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 5 mg/l

5.4.2 ตรวจวัดสารวิตามินบี 6 ด้วยเครื่อง HPLC-DAD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

5.4.3 หาค่าเฉลี่ยสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น นำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 และพื้นที่ใต้พีค (peak area) แล้วพิจารณาค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับ $r > 0.995$ (AOAC, 2023)

5.5 ทดสอบความจำเพาะของวิธี (selectivity)

5.5.1 เตรียมตัวอย่างสารผสมล่วงหน้าเป็น sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

5.5.2 เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้น 5 mg/kg โดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 ความเข้มข้น 5 mg/l ปริมาตร 1 ml ลงใน sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

5.5.3 นำตัวอย่างข้อ 5.5.1-5.5.2 ทำตามวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้าด้วยเทคนิค HPLC-DAD

5.5.4 เปรียบเทียบสัญญาณของ sample blank กับ spiked sample หากวิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อสารวิตามินบี 6 จะต้องไม่พบสัญญาณบริเวณ retention time ของสารวิตามินบี 6

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

5.6.1 เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg โดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 ความเข้มข้น 5 mg/l ปริมาตร 2 ml ลงใน sample blank ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ

5.6.2 วิเคราะห์หาความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่าง หาค่า mean, SD หรือ S_0 และ S'_0 จากนั้นนำค่า S'_0 ไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังนี้

$$\text{LOD} = 3S'_0$$

$$\text{LOQ} = 10S'_0 \text{ หรือมากกว่า LOD หรือ } 10S'_0 \text{ แต่ต้องมีความแม่นยำและความเที่ยง}$$

$$\text{โดยที่ } S'_0 = S_0/\sqrt{n}$$

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 ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบให้ดูระดับสัญญาณฟิค โดยต้องมีค่า $S/N \geq 3$

5.6.4 การยืนยัน LOQ ของการทดสอบ

เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า LOQ ที่คำนวณได้ ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า $\bar{x}$, SD, %recovery, %RSD_r และ %PRSD_r โดยพิจารณาความแม่นยำจากค่า %mean Recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023) ตามตารางที่ 1 และพิจารณาความเที่ยงแบบ repeatability จากค่า %RSD_r ต้องมีค่าน้อยกว่า %PRSD_r ที่คำนวณจากสมการ Horwitz

ตารางที่ 1 เกณฑ์การยอมรับ % recovery ของ AOAC (2023)

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 μ g/kg	80-110
10 μ g/kg	60-115
1 μ g/kg	40-120

5.7 ทดสอบ matrix effect

หาความแตกต่างระหว่างปริมาณวิตามินบี 6 ในสารละลายมาตรฐานและปริมาณวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้า โดยใช้การคำนวณทางสถิติ Pair t-test

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

โดยที่ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง
 SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง
 n = จำนวนตัวอย่าง = 6

5.8 ทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของการทดสอบ

ประเมินผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง โดยการทดสอบ spiked sample ประเมินความแม่นยำ (accuracy) จากค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับได้ของสารวิตามินบี 6 (%mean recovery) และความเที่ยง (precision) จากค่า %RSD และ %PRSD, โดยผลที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังนี้

5.8.1 เตรียม spiked sample ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 5 (ระดับ LOQ), 50 และ 250 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียม spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 250 mg/kg

รายละเอียด	ระดับความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 (mg/kg)		
	5	50	250
Stock STD Conc. (mg/l)	5	100	50
Volume (ml)	1	0.5	5
Conc. In Solution (mg/l)	0.1	1	5
Conc. In sample (mg/kg)	5	50	250

5.8.2 ทำการทดสอบ spiked sample ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DLD เทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 5 mg/l และทำการทดสอบอีก 2 ชุด โดยต่างวัน 7 วัน และ 14 วัน

5.8.3 ประเมินความแม่นยำ (accuracy) โดยการคำนวณหาค่า %recovery ของแต่ละความเข้มข้น และ พิจารณาค่า %mean Recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2023) คือ ที่ปริมาณสารความเข้มข้น 5 mg/kg ต้องอยู่ในเกณฑ์ 80-110 % ปริมาณสารความเข้มข้น 50 mg/kg ต้องอยู่ในเกณฑ์ 90-107 % และที่ปริมาณสารความเข้มข้น 250 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

□ 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 ของแต่ละชุดความเข้มข้นนั้นๆ 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 ได้ผลการศึกษาและผลการทดลอง ดังนี้

6.1.1 แผนผังแสดงวิธีทดสอบสารวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้า ด้วยเทคนิค HPLC-DAD
ดังนี้

ชั่งตัวอย่าง 1.0000 g ± 0.0010 g ลงใน volumetric flask สีชา ขนาด 50 ml

↓
เติม 1% Acetic acid 25 ml

↓
นำไปละลายใน water bath อุณหภูมิ 70 °C นาน 40 นาที

↓
ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรด้วย 1% Acetic acid

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

↓
กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filters ขนาด 0.45 μm

↓
วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพเครื่อง HPLC-DAD

6.2.1 จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารวิตามินบี 6 ด้วยเทคนิค HPLC-DAD แสดงผลได้ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดง HPLC Conditions สำหรับตรวจวัดสารวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้า

Parameters	Conditions
Mobile phase line A : B	25 mM KH_2PO_4 and 5 mM Sodium hexanesulfonate in DI water : 5 mM Sodium hexanesulfonate in MeOH (85:15)
Elution mode	Isocratic elution
Flow rate	0.70 mL/min
LC Column	Inertsil ODS-3 , 4.6 mm x 150 mm , 5 μm
Temperature column	35 $^{\circ}\text{C}$
Injection volume	20 μl
Run time	10.00 min
Diode array detector	wavelength = 280 nm

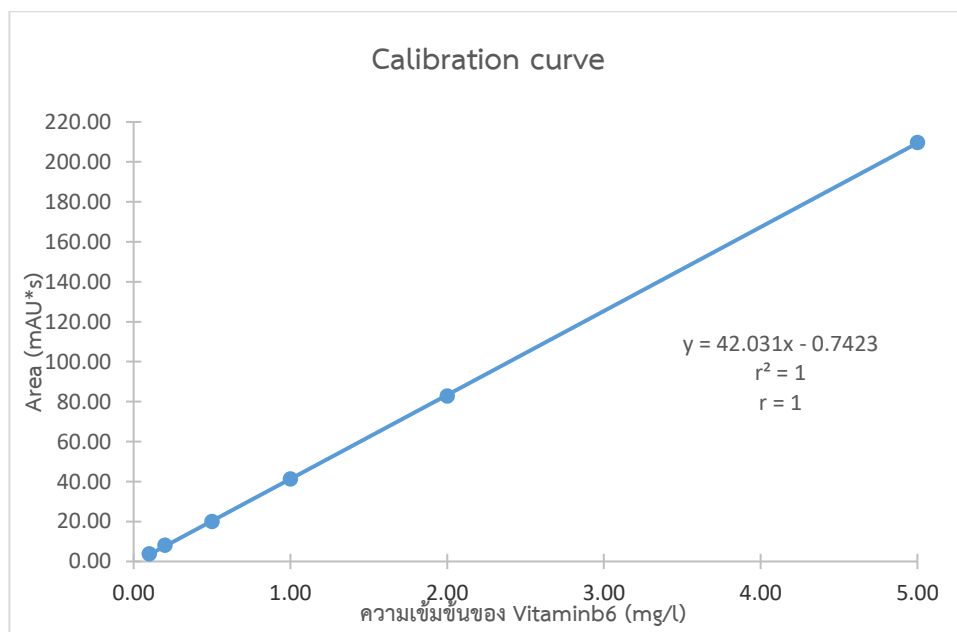
6.2.2 จากผลของการทดสอบการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/l จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า mean และ SD ของความเข้มข้นที่วัดได้ และคำนวณค่า IDL ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบค่า IDL ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/l

ลำดับ	Conc.(mg/l)
1	0.199
2	0.202
3	0.200
4	0.201
5	0.205
6	0.207
7	0.202
8	0.209
9	0.203
10	0.203
mean	0.203
SD	0.00311
IDL	0.01

ผลการยืนยันค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่อง HPLC สามารถวัดได้ (Instrument Detection Limit; IDL) ของสารวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/l จำนวน 3 ซ้ำ พบว่ามีค่า S/N < 3 จึงทำการปรับค่า IDL เป็นความเข้มข้น 0.05 mg/l และทำการยืนยันจำนวน 3 ซ้ำ พบว่าค่า S/N > 3 ได้ผลเป็น 4.3, 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารวิตามินบี 6 สามารถวัดได้โดยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ที่ระบุไว้อยู่ที่ระดับ 0.05 mg/l

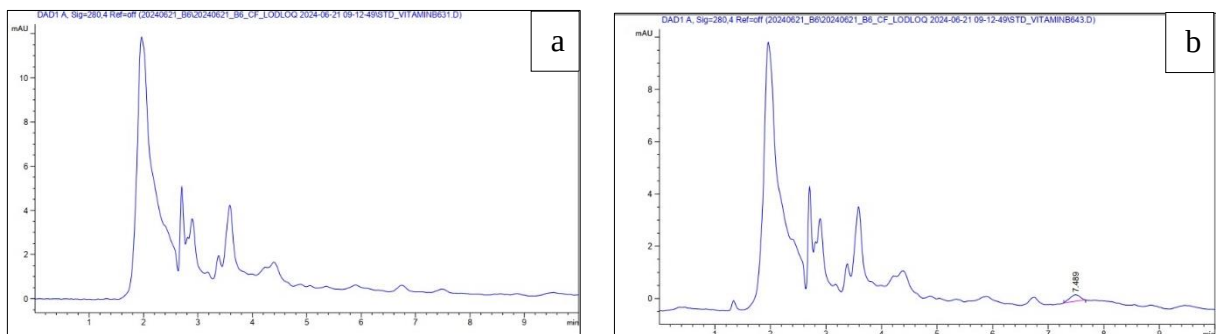
6.3 จากผลของการทดสอบการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับ $r > 0.995$ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (AOAC , 2023) แสดงว่า สามารถวัดสารวิตามินบี 6 ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 5.0 mg/l แล้วให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area และ ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 0.10-5.0 mg/l

6.4 ผลการทดสอบ selectivity

จากการเปรียบเทียบสัญญาณฟิสิกของ sample blank กับ spiked sample พบว่า sample blank ไม่พบสัญญาณฟิสิกที่ตำแหน่ง Retention time ของสารวิตามินบี 6 แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงโครมาโทแกรมของ sample blank (a) และ spiked sample (b)

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

6.5.1 จากการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของสารวิตามินบี 6 โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ระดับ 10 mg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 5 mg/l นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า mean, SD หรือ S_0 และ S'_0 แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก $3S'_0$ และค่า LOQ จาก $10S_0$ ให้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบสารวิตามินบี 6

ลำดับ	ความเข้มข้นของสาร วิตามินบี 6 (mg/kg)
1	9.70
2	9.46
3	9.67
4	9.95
5	9.95
6	9.99
7	9.89
8	10.01
9	9.89
10	9.73
mean	9.82
S_0	0.18
S'_0	0.13
LOD	0.80
LOQ	3.00

6.5.2 จากการทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ระดับ 0.80 mg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบให้ดูระดับสัญญาณของพีค โดย S/N ต้องมีค่า ≥ 3 พบว่า S/N มีค่า < 3 จึงทำการปรับค่า LOD เป็นความเข้มข้น 2.5 mg/kg และทำการยืนยันจำนวน 10 ซ้ำ พบว่าค่า S/N > 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่า S/N ของการยืนยันค่า LOD ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/kg

ลำดับ	LOD (2.5 mg/kg)
	S/N
1	4.2
2	3.4
3	3.8
4	3.3
5	5.1
6	3.1
7	3.8
8	5.7
9	4.6
10	5.0
mean	4.2

6.5.3 จากการทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ระดับ 3 mg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า %recovery, %RSD_r และ %PRSD_r พบว่า ทุกค่าไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงทำการปรับค่า LOQ เป็นความเข้มข้น 5 mg/kg และทำการยืนยันจำนวน 10 ซ้ำ พบว่าค่า %recovery, %RSD_r และ %PRSD_r ของทุกค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบยืนยันค่า LOQ ของวิธีทดสอบวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 5 mg/kg

ลำดับ	LOQ (5 mg/kg)	
	Conc. (mg/kg)	% Recovery
1	4.89	97.74
2	5.29	105.80
3	4.80	95.92
4	5.07	101.38
5	4.67	93.34
6	4.63	92.61
7	5.23	104.67
8	4.90	98.10
9	4.96	99.15
10	5.00	100.09
mean	4.94	98.88
SD	0.22	
%RSD _r	4.39	
%PRSD _r	8.30	

6.6 ผลการทดสอบ Matrix effect

จากการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 6 ในสารละลายมาตรฐานและปริมาณวิตามินบี 6 ในตัวอย่างสารผสมล่วงหน้า โดยนำมาคำนวณทางสถิติ Pair t-test พบว่า t ที่คำนวณได้ (t_{cal}) มีค่าน้อยกว่า $t_{critical\ value}$ (t_{crit}) ($t_c=2.57$ ที่ $df = 5$) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบ Matrix effect

STD	Premixes	d
0.1	0.106	0.006
0.2	0.203	0.003
0.5	0.482	0.018
1	0.97	0.03
2	1.982	0.018
5	4.911	0.089
$\bar{d}$		0.027
SD		0.03
$\sqrt{6}$		2.45
t_{cal}		2.11
t_{crit}		2.57

6.7 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบ

6.7.1 จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ ทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ทั้งหมด 3 ระดับคือ 5 (ระดับ LOQ), 50 และ 250 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า %recovery พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นมี %mean recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2023) แสดงว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ Spiked sample ที่ความเข้มข้น 5, 50 และ 250 mg/kg

รายละเอียด	ความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 (mg/kg)		
	5	50	250
mean	4.74	47.17	239.87
SD	0.09	1.08	0.74
%mean recovery	94.80	94.34	95.95
เกณฑ์การยอมรับ %recovery	80-110	90-107	95-105

6.7.2 จากการทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ทั้งหมด 3 ระดับคือ 5 (ระดับ LOQ), 50 และ 250 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณค่า % RSD_r และ %PRSD_r พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า % RSD_r น้อยกว่า ค่า%PRSD_r ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่า วิธีทดสอบนี้มีความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้

ความเข้มข้นของสารวิตามิน บี 6 (mg/kg)	%RSD _r (repeatability, n=10)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _r
5	1.94	8.35
50	2.29	5.91
250	0.31	4.63

6.7.3 จากการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) โดยทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ทั้งหมด 3 ระดับคือ 5 (ระดับ LOQ), 50 และ 250 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 ชุดการทดสอบ โดยต่างวัน 7 วัน และ 14 วัน จากนั้นคำนวณค่า % RSD_R และ %PRSD_R พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า % RSD_R น้อยกว่า ค่า %PRSD_R ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่า วิธีทดสอบมีความเที่ยงแบบทำซ้ำได้เป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำได้

ความเข้มข้นของสารวิตามิน บี 6 (mg/kg)	%RSD _R (within- laboratory reproducibility, n=30)	เกณฑ์การยอมรับ %PRSD _R
5	4.37	12.64
50	1.69	8.94
250	0.52	7.01

7. สรุปผลการทดลอง

7.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง HPLC-DLD พบว่า ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารวิตามินบี 6 ด้วยเทคนิค HPLC-DAD และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ สารวิตามินบี 6 สามารถวัดได้โดยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ที่ระบุไว้ อยู่ที่ระดับ 0.05 mg/l

7.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานวิตามินบี 6 (linearity) พบว่าค่า r มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ r ไม่น้อยกว่า 0.995 (AOAC, 2023) และมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1-5.0 mg/l

7.3 การทดสอบ selectivity จากการเปรียบเทียบสัญญาณพีคของ sample blank กับ spiked sample พบว่า sample blank ไม่พบสัญญาณพีคที่ตำแหน่ง retention time ของสารวิตามินบี 6 แสดงว่า ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน matrix ของ sample จึงไม่มีผลต่อการทดสอบ

7.4 ผลการทดสอบค่า LOD ของสารมาตรฐานวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/kg พบว่า ระดับสัญญาณของพีคมีค่า S/N เท่ากับ 4.2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ $S/N \geq 3$

7.5 ผลการทดสอบค่า LOQ ของสารมาตรฐานวิตามินบี 6 ที่ความเข้มข้น 5 mg/kg พบว่า ค่าความแม่นยำจาก %recovery เท่ากับ 98.88 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 80-110 % และความเที่ยงแบบ repeatability อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ มีค่า $\%RSD_r < \%PRSD_r$

7.6 ผลการทดสอบ Matrix effect โดยใช้ Pair t-test พบว่า ปริมาณวิตามินบี 6 ในเมทริกซ์ที่ต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่า วิธีการทดสอบนี้ไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์

7.7 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ

7.7.1 ความเที่ยงแบบ repeatability จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ระดับ 5, 50 และ 250 mg/kg มีค่า $\%RSD_r$ น้อยกว่า ค่า $\%PRSD_r$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

7.7.2 ความเที่ยงแบบ within-laboratory reproducibility จากการทดสอบ spiked sample ที่มีความเข้มข้นของสารวิตามินบี 6 ระดับ 5, 50 และ 250 mg/kg มีค่า $\%RSD_R$ น้อยกว่า ค่า $\%PRSD_R$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

7.8 การทดสอบวิตามินบี 6 ในสารผสมล่วงหน้ามีช่วงการวัดของวิธีทดสอบ (working range) คือ 5 – 250 mg/kg สรุปได้ว่า วิธีทดสอบมีความแม่นยำและความเที่ยง

10. เอกสารอ้างอิง

10.1 Zand, N.; Chowdry, B.Z.; Pullen, F.S.; Snowden, M.J.; Tetteh, J. **Simultaneous determination of riboflavin and pyridoxine by UHPLC/LC—MS in UK commercial infant meal food products.** Food Chem. 2012, 135, 2743–2749.

10.2 Md. Zahangir Hosain, S. M. Shariful Islam and Md. Mostofa Kamal 2021. **Development of a rapid and reliable high-performance liquid chromatography method for determination of water-soluble vitamins in veterinary feed premix.** Veterinary World, EISSN: 2231-0916

10.3 AOAC. 2023. **Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals.** Association of Official Analytical Chemists. In: *AOAC Official Methods of Analysis*. 22theds. Edited by George W. Latimer, Jr. Oxford University Press. New York. USA

10.4 AOAC. 2023. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.** In: *AOAC Official Methods of Analysis*. 22theds. Edited by George W. Latimer, Jr. Oxford University Press. New York. USA.

- 10.5 EFSA. 2011. Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin B₆ (pyridoxine hydrochloride) as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal* 2011; 9(5):2171.
- 10.6 Parra, M., S. Stahl and H. Hellmann. 2018. Vitamin B6 and Its Role in Cell Metabolism and Physiology. *Cells*. Jul 22;7(7):84.
- 10.7 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.
- 10.8 วรณพร ทะพิงค์แก. 2560. อาหารและการให้อาหารสัตว์ (Feeds and Feeding). ศูนย์บริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- 10.9 อุทัย คั่นโธ. 2559. อาหารสุกรและสัตว์ปีกเชิงประยุกต์. ยู เค ที, ฉะเชิงเทรา.
- 10.10 ราชกิจจานุเบกษา. 2559ก. เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 306 ง, หน้า 18 - 26.
- 10.11 ราชกิจจานุเบกษา. 2559ข. เล่มที่ 133 ตอนพิเศษ 242 ง, หน้า 12 - 13.