# การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไตรโคทีซีน 9 ชนิด ในอาหารสุกรโดยเทคนิค LC-MS/MS

วิภาดา สงวนสุข[1] ภาณุวัฒน์ ซังเพชรแก้ว[1] ไกรวุฒิ นวลขาว[1]

## บทคัดย่อ

สารพิษจากเชื้อราในกลุ่มไตรโคทีซีน (trichothecenes) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สร้างโดยเชื้อราในสกุล *Fusarium* ซึ่งสามารถปนเปื้อนในธัญพืชและผลผลิตทางการเกษตรได้อย่างแพร่หลาย ส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารและอาหารสัตว์ การลดประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ ตลอดจนการกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสำคัญต่อการวิเคราะห์โดยเลือกใช้เทคนิคที่มีความถูกต้องและความไวคือการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดแมสเปกโทรเมทรี สารตัวอย่างถูกสกัดด้วยซีโตไนไตรล์ต่อน้ำปราศจากไอออนอัตราส่วน 80:20 ที่มี 0.5%v/v กรดอะซิติก, 0.2%v/v กรดฟอร์มิก โดยอาศัยการทำให้บริสุทธิ์ (clean-up) ด้วยเทคนิคการสกัดเฟสของแข็ง (solid phase extraction,SPE) ชนิด hydrophilic-lipophilic balance (HLB) แล้วเก็บสิ่งสกัดที่ผ่านคอลัมภ์จากนั้นเติมสารมาตรฐานภายในที่เป็นไอโซโทปชนิดคาร์บอน-13 แล้วทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่มไตรโคทีซีนทั้ง 9 ชนิด ตามแนวทางของสหภาพยุโรป (SANTE 11312/2021 V2026) ที่ค่าความแม่นโดยค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 70-120% ค่าความเที่ยงโดยค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20% ค่าขีดความสามารถของการตรวจพบอยู่ระหว่าง 0.010 - 0.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 0.040 - 0.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าผลกระทบจากเมทริกซ์อยู่นอกช่วง 80-120% แสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์จึงเลือกใช้กราฟมาตรฐานในเมทริกซ์แบบ post-MMC ส่วนการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีทดสอบ โดยประมาณจากค่าความไม่แน่นอนขยาย พบอยู่ระหว่าง 10.484 –31.631 % ตามลำดับจากค่าพารามิเตอร์ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบสารพิษจากเชื้อรากลุ่มไตรโคทีซีนทั้ง 9 ชนิดในอาหารสุกร

**คำสำคัญ :** ไตรโคทีซีน,สารพิษจากเชื้อรา , การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์, อาหารสัตว์สุกร

---

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

# Method Development and Validation for determination of 9 trichothecenes in swine feed by LC-MS/MS

Wipada Sanguansuk[1] Panuwat Sungpethkaew[1] Kraiwut Nualkaw[1]

## Abstract

Trichothecenes, secondary metabolites produced by fungi of the genus *Fusarium*, are widespread contaminants in cereals and agricultural commodities. This contamination adversely affects food and feed safety and quality, reduces livestock production efficiency, and impacts international trade. Therefore, this study focused on the determination of mycotoxins using a highly sensitive and accurate analytical method. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was employed due to its high sensitivity and accuracy. The 9 types of trichothecenes were extracted with acetonitrile and deionized water (80:20, v/v) containing 0.5% (v/v) acetic acid and 0.2% (v/v) formic acid. Sample clean-up was performed using hydrophilic–lipophilic balance solid-phase extraction (HLB-SPE), and the eluates were subsequently spiked with carbon-13 isotope-labeled internal standards. The method for the determination of nine trichothecene mycotoxins in swine feed was validated according to SANTE/11312/2021 Version 2026**.** The %recovery of method 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 ranged from 0.010 to 0.40 mg/kg and 0.040 to 0.80 mg/kg, respectively. Matrix effects were observed outside the acceptable range of 80–120%, indicating significant matrix interference; therefore, post-extraction matrix-matched calibration (post-MMC) was employed for quantification. The expanded measurement uncertainty ranged from 10.484% to 31.631%**.** All validation parameters met the acceptance criteria, demonstrating that the proposed method is suitable for the determination of nine trichothecene mycotoxins in swine feed. The method can be reliably applied for routine monitoring and quality control of trichothecene contamination in animal feed.

**Keywords :** trichothecenes, mycotoxins, method validation, swine feed

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

# การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไตรโคทีซีน 9 ชนิดในอาหารสุกร โดยเทคนิค LC-MS/MS

วิภาดา สงวนสุข[1] ภาณุวัฒน์ ซังเพชรแก้ว[1] ไกรวุฒิ นวลขาว[1]

## บทนำ

สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) จัดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อราหลากหลายชนิด ซึ่งมักพบการปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยเฉพาะธัญพืชจำพวกข้าวโพด ข้าวสาลี และกากถั่วเหลือง การปนเปื้อนดังกล่าวนอกจากจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของสัตว์และลดทอนประสิทธิภาพการผลิตจนนำไปสู่ความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการปศุสัตว์ แล้วยังส่งผลกระทบต่อเนื่องไปยังความปลอดภัยของมนุษย์ในฐานะผู้บริโภคลำดับสุดท้ายของห่วงโซ่อาหาร (Food chain) เนื่องจากสารพิษหรือเมแทบอไลต์บางชนิดสามารถตกค้างและถ่ายทอดเข้าสู่ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้ ดังนั้น การควบคุมคุณภาพและการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารสัตว์จึงเป็นมาตรการที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความมั่นคงและความปลอดภัยทางอาหาร (Food safety) ตั้งแต่ระดับฟาร์มจนถึงมือผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษในกลุ่มไตรโคทีซีน (Trichothecenes) ซึ่งสร้างโดยเชื้อราในสกุล *Fusarium spp.* ที่มักตรวจพบการปนเปื้อนอย่างกว้างขวางและส่งผลกระทบอย่างรุนแรงในระดับสากล

สารพิษจากเชื้อรากลุ่มไตรโคทีซีน (Trichothecenes) มีกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือ การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) และรบกวนการทำงานของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อระบบอวัยวะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์อย่างรวดเร็ว เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบเลือด และระบบสืบพันธุ์ (Pestka, 2010) โดยสุกรจัดเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อสารพิษกลุ่มนี้มากกว่าสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น ทำให้ได้รับผลกระทบต่อสุขภาพและประสิทธิภาพการผลิตได้อย่างชัดเจน ความรุนแรงของพิษขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสาร ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่ม Type A trichothecenes ประกอบด้วย T-2 toxin (T-2), HT-2 toxin (HT-2), diacetoxyscirpenol (DAS) และ neosolaniol (NEO) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันสูง สามารถทำลายเยื่อบุทางเดินอาหาร ก่อให้เกิดแผลหลุม การอักเสบ และส่งผลกระทบต่อระบบเลือดรวมถึงระบบสืบพันธุ์ได้แม้ได้รับในปริมาณต่ำ (CAST, 2003; Rocha *et al.,* 2005; EFSA, 2011) ขณะที่กลุ่ม Type B trichothecenes ได้แก่ deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), fusarenon-X (FUS-X) รวมถึงอนุพันธ์ในรูป acetylated ได้แก่ 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) และ 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) แม้จะมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำกว่า แต่กลับพบการปนเปื้อนในอาหารสุกรได้บ่อยและในระดับความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะ DON ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของอาการอาเจียน การปฏิเสธอาหาร (feed refusal) และการลดลงของอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร (feed conversion ratio; FCR) ของสุกร (Rotter *et al.*,

1996; EFSA, 2017) นอกจากนี้ สารพิษทั้งสองกลุ่มยังมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ส่งผลให้สัตว์มีความไวต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้น และลดประสิทธิภาพการตอบสนองต่อวัคซีน (Pestka, 2007) นอกจากผลกระทบต่อสัตว์แล้ว สารพิษจากเชื้อรากลุ่มไตรโคทีซีนยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ โดยเฉพาะจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เบื่ออาหาร ปวดท้อง และส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงระบบเลือดได้ (Pestka and Smolinski, 2005; Pestka, 2010) ในกรณีที่ได้รับสารในปริมาณสูงหรือได้รับสะสมเป็นเวลานาน อาจส่งผลต่อการทำงานของตับ ไต และระบบสืบพันธุ์ได้ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาด้านความปลอดภัยอาหารเกี่ยวกับการถ่ายทอดสารพิษ (carry-over) จากอาหารสัตว์สู่ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มนุษย์บริโภค แม้ว่าสารพิษกลุ่มนี้จะถูกเมแทบอลิซึมและขับออกจากร่างกายสัตว์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว ทำให้การสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์อยู่ในระดับต่ำ แต่การได้รับสัมผัสอย่างต่อเนื่องจากหลายแหล่งยังคงเป็นประเด็นสำคัญด้านความปลอดภัยอาหารและการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพมนุษย์ (EFSA, 2011; EFSA, 2017)

จากความเป็นพิษของสารพิษจาเชื้อรากลุ่มไตรโคทีซีนที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ ประสิทธิภาพการผลิต และความปลอดภัยของห่วงโซ่อาหาร สหภาพยุโรป (European Union; EU) จึงได้กำหนดค่าแนะนำ (guidance values) สำหรับการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรากลุ่มไตรโคทีซีนในอาหารสัตว์อย่างเข้มงวดตาม Commission Recommendation 2006/576/EC และ Commission Recommendation 2013/165/EU โดยกำหนดให้ deoxynivalenol (DON) ในอาหารสุกร มีปริมาณไม่เกิน 0.9 mg/kg ขณะที่ผลรวมของ T-2 toxin และ HT-2 toxin ถูกกำหนดไว้ ไม่เกิน 0.25 mg/kg สำหรับอาหารสุกร และไม่เกิน 0.05 mg/kg สำหรับอาหารลูกสุกรหย่านม เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อสารพิษกลุ่มนี้สูง เกณฑ์ดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงความจำเป็นในการตรวจวิเคราะห์สารพิษในระดับความเข้มข้นต่ำมาก เพื่อให้สามารถเฝ้าระวังและควบคุมความปลอดภัยของอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสำหรับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี้ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมี(สารพิษจากเชื้อรา)ได้ใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค solid-phase extraction (SPE) ชนิด hydrophilic-lipophilic balance (HLB) เพื่อลดการรบกวนจากเมทริกซ์ลดการสูญเสียของสารวิเคราะห์ และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราหลายชนิดพร้อมกัน ร่วมกับเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)เพื่อตรวจยืนยันชนิดและปริมาณของสารพิษจากเชื้อราในกลุ่มไตรโคทีซีนทั้ง 9 ชนิดในคราวเดียวกัน จากนั้นพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้มีความไวเพียงพอที่จะตรวจสารพิษจากเชื้อรากลุ่มดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นตามค่าแนะนำของสหภาพยุโรปสำหรับอาหารสุกร และสามารถยืนยันชนิดและปริมาณของสารพิษจากเชื้อรากลุ่มไตโครทีซีน 9 ชนิดได้ โดยมีค่าความแม่น (accuracy) และ ค่าความเที่ยง (precision) ผ่านตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของสหภาพยุโรป(SANTE 11312/2021 V2026) เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ สอดคล้องกับแนวทางที่เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ และสามารถนาไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม ไตรโคทีซีนในอาหารสุกร

**1. วัตถุประสงค์**

1.1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecenes จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ T-2 toxin (T-2), HT-2 toxin (HT-2), diacetoxyscirpenol (DAS), neosolaniol (NEO), nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) และ fusarenon-X (FUS-X) ในอาหารสุกรโดยเทคนิค LC–MS/MS

1.2. เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ trichothecene 9 ชนิด ในอาหารสุกรเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

**2. ขอบข่าย**

เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่าง, ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของ LC–MS/MS และ พิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecenes ในตัวอย่างอาหารสุกรตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 V2026 โดยมีพารามิเตอร์ที่ศึกษาได้แก่ ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity), การศึกษาผลกระทบจากเมทริกซ์(matrix effect ;ME) การหาค่าและการยืนยันค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ), การทดสอบความแม่น (accuracy) และการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability และ within- laboratory reproducibility

**3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิธีวิเคราะห์ trichothecenes จำนวน 9 ชนิดในอาหารสุกร โดยเทคนิค LC MS/MS

**4.เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์**

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LCMS-8060

4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

4.2.1 สารเคมี

4.2.1.1 สารเคมีเกรด LC-MS ได้แก่ ammonium acetate solution ($NH_4OAc$), formic acid (FA), Acetic acid (AcOH)

4.2.1.2 สารเคมีเกรด HPLC ได้แก่ acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), dispersive solid phase extraction (dSPE sorbent) ได้แก่ C18 (17%)

4.2.1.3 สารเคมีเกรด AR Magnesium sulfate ($MgSO_4$), Sodium Chloride (NaCl)

4.2.1.4 น้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ-cm

4.2.2 สารมาตรฐาน

4.2.2.1 สารมาตรฐาน (reference standard) trichothecenes จำนวน 9 ชนิด ดังตารางที่1

**ตารางที่ 1** แสดงยี่ห้อสารมาตรฐาน trichothecenes จำนวน 9 ชนิด

| **สารมาตรฐาน (reference standard)** | **ยี่ห้อ** |
|---|---|
| T-2 | Pribolab |
| HT-2 | Pribolab |
| DAS | Blopure |
| NEO | Blopure |
| NIV | Inikem |
| DON | Dr. Ehrenstorfer |
| 3-AcDON | Dr. Ehrenstorfer |
| 15-AcDON | Dr. Ehrenstorfer |
| FUS-X | Blopure |

4.2.2.2 สารมาตรฐานภายใน (internal standard, ISTD) จำนวน 7 ชนิด ดังตารางที่2

**ตารางที่ 2** แสดงยี่ห้อสารมาตรฐานภายใน trichothecenes จำนวน 7 ชนิด

| **สารมาตรฐานภายใน (internal standard)** | **ยี่ห้อ** |
|---|---|
| $^{13}C_{24}$-T-2 | Blopure |
| $^{13}C_{22}$-HT-2 | Blopure |
| $^{13}C_{19}$-DAS | Pribolab |
| $^{13}C_{15}$-NIV | Blopure |
| $^{13}C_{15}$-DON | Pribolab |
| $^{13}C_{17}$-3-AcDON | Blopure |
| $^{13}C_{17}$-15-AcDON | Blopure |

4.3 อุปกรณ์

4.3.1 HPLC column kinetex XB-C18 2.6 µm 2.1×100 mm ยี่ห้อ Phenomenex

4.3.2 PuriToX Trichothecene  Column ยี่ห้อ R-Biopharm Rhône Ltd

4.3.1 Oasis PRiME HLB 3cc (150mg) extraction cartridge ยี่ห้อ Waters

**5. วิธีดำเนินการ**

5.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง mass spectrometer

5.1.1 เตรียมสารมาตรฐาน trichothecenes จำนวน 9 ชนิด และสารมาตรฐานภายใน 7 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/mL ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรง และเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive ionization) และ ไอออนลบ (negative ionization)

5.1.2 ทำการสแกนหามวลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion ของสารมาตรฐานโดยการกำหนดช่วงของค่า m/z (Q1) ให้ทำงานในโหมดสแกน เมื่อได้ค่า m/z ของ precursor ion ที่สนใจ แล้วจึงทำการหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของ precursor ion ได้แก่ declustering potential (DP) และ entrance potential (EP)

5.1.3 ทำการแสกนหามวลต่อประจุ (m/z) ของ product ion โดยทำการปรับตั้ง Q1 ให้ยอมเฉพาะ precursor ion ผ่านไปยัง Q2 (collision cell) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว จากนั้นจึงใช้ Q3 มาทำการสแกนหา product ion 2 ion สำหรับสารมาตรฐาน trichothecenes ทั้ง 9 ชนิด และสารมาตรฐานภายใน 7 ชนิด ที่ให้ค่าสัญญาณ (signal) สูงสุด

5.1.4 ปรับตั้งค่าในโหมด multiple reaction monitoring (MRM) โดยการปรับตั้ง Q1 ให้เฉพาะ m/z ของ precursor ion ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านไป และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัว จากนั้นตั้ง Q3 ให้ตรวจวัดเฉพาะ product ion ที่เกิดจากการแตกตัวจาก precursor ion ที่ต้องการ แล้วจึงทำการหาค่าพลังงานที่ใช้แตกตัวให้เหมาะสม ได้แก่ collision energy (CE) และ collision cell exit potential (CXP)

5.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในระบบ UHPLC

ทดสอบสภาวะสำหรับแยกสารมาตรฐาน trichothecenes 9 ชนิด และสารมาตรฐานภายใน 7 ชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟแบบสมรรถนะสูง (UHPLC) แบบ reverse phase chromatography ของเครื่อง LC-MS/MS

5.3 ทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 4 วิธี ได้แก่ dilute and shoot (DnS) , QuEChERS, multi-functional column (MFC) และ SPE-HLB (prime HLB) โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนไอออน (ion ratio) ของสารวิเคราะห์ที่ได้จากตัวอย่างต้องไม่แตกต่างจากสารมาตรฐานเกิน ±30% เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการยืนยันชนิดของสารด้วยเทคนิค MS/MS และ ค่าความแม่น (accuracy) จากค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) อยู่ระหว่าง 70-120% ตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2026

5.4 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวัด (linearity and range)

ทำการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงโดยสร้างกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์แบบเติมสารภายหลังการสกัด (post-spike matrix-matched calibration curve; post-MMC) อย่างน้อย 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้

- NIV, 3-AcDON, 15-AcDON และ FUS-X ที่ความเข้มข้น 0.020, 0.040, 0.080, 0.16, 0.32, 0.80 µg/mL
- DON, NEO, FUS-X และ HT-2 ที่ความเข้มข้น 0.0040, 0.0080, 0.016, 0.032, 0.064, 0.16 µg/mL
- DAS ที่ความเข้มข้น 0.0020, 0.0040, 0.0080, 0.016, 0.032 ,0.080 µg/mL
- T-2 ที่ความเข้มข้น 0.0010, 0.0020, 0.0040, 0.0080, 0.016, 0.040 µg/mL

และเติมสารมาตรฐานภายใน $^{13}C$-ISTD 7 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นดังนี้

- $^{13}C_{15}$-NIV, $^{13}C_{15}$-DON, และ $^{13}C_{17}$-3-AcDON ที่ความเข้มข้น 0.50 µg/mL
- $^{13}C_{17}$-15-AcDON, $^{13}C_{22}$-HT-2และ $^{13}C_{24}$-T-2 ที่ความเข้มข้น 0.20 µg/mL
- $^{13}C_{19}$-DAS ที่ความเข้มข้น 0.10 µg/mL

โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และสร้างกราฟมาตรฐานโดยกำหนดให้

- แกน Y คือ area สำหรับสารที่ไม่มีการใช้ ISTD ได้แก่ FUS-X และ NEO หรือ area ratio (area analyte/area ISTD) สำหรับสารที่ใช้ ISTD ได้แก่ NIV, 3-AcDON ,15-AcDON, DON, HT-2, T-2 และ DAS
- แกน X คือ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์

ทำการสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นในรูปแบบ y = mx + c โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990 (AOAC, 2019) และ %deviation of back-calculated concentration โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นจริง (Nominal concentration ,$C_{nom}$) เทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ (Back-calculated concentration,$C_{bc}$) ของสารมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้น ดังสมการที่1 โดยเกณฑ์การยอมรับไม่เกิน ±20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2026

**สมการที่ 1** Deviation of back-calculated concentration (%) = $(C_{bc} - C_{nom}) \times 100/C_{nom}$

5.5 Matrix effect (ME)

ทำการประเมิน ME จากค่า % signal suppression and enhancement (%SSE) โดยคำนวณจากอัตราส่วนของความชัน (slope) ระหว่างกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์แบบ post-MMC และกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย (solvent calibration curve) ดังสมการที่ 2 เกณฑ์การยอมรับของค่า %SSE ต้องอยู่ในช่วง 80-120% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2026

**สมการที่ 2**

$$\%SSE = \frac{\text{slope (matrix-matched calibration curve)}}{\text{slope (solvent calibration curve)}} X100$$

5.6 การพิจารณาค่า ion ratio (IR)

การพิจารณาค่า IR ใช้สำหรับยืนยันชนิดของสารวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS/MS โดยการหา mean IR ของสารมาตรฐาน trichothecene 9 ชนิด ในตัวอย่างเพื่อพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อน (tolerance) โดย mean IR ของ peak analyte ที่ตรวจพบใน sample เมื่อเทียบกับ mean IR ของ standard คำนวณดังสมการที่3 และ 4 เกณฑ์การยอมรับต้องไม่เกิน ± 30 % ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2026

**สมการที่ 3**

$$\%\ IR = \frac{\text{peak area (or Height) of qualifier Ion}}{\text{peak area (or Height) quantifier Ion}} \times 100$$

**สมการที่ 4** Diff = 30 % × average IR

5.7 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม trichothecene 9 ชนิด

5.7.1 วิธี DnS ดำเนินการตามวิธีอ้างอิงจาก SIST EN 17194:2020 โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.7.1.1 ชั่งตัวอย่าง 5 ± 0.02 g ลงในหลอดพอลีโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร

5.7.1.2 เติม ACN/water/FA (79/20/1%v/v) ปริมาตร20 mL เขย่าตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่าง (shaker)

5.7.1.3 นำไปเหวี่ยงที่ 3,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

5.7.1.4 ปิเปตตัวอย่าง 500 µL นำไประเหยให้แห้งด้วย $N_2$

5.7.1.5 จากนั้นเติม ACN/water/FA (79/20/1%v/v) ปริมาตร 450 µL และ $^{13}$C-ISTD 50 µL

5.7.1.6 กรองผ่าน Syringe filters ขนาด 0.20 µm ชนิด PTFE

5.7.1.7 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

5.7.2 วิธี QuEChERS ดำเนินการตามวิธีอ้างอิงจาก Dzuman *et al.*, 2014 โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.7.2.1 ชั่งตัวอย่าง 2 ± 0.02 g ลงในหลอดพอลีโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร

5.7.2.2 เติม 2%v/v FA ปริมาตร 10 mL ปิดฝาหลอดให้สนิทและแช่ตัวอย่างไว้ 30 นาที

5.7.2.3 เติม ACN ปริมาตร 10 mL เขย่าตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที ความเร็ว 240 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่าง (shaker)

5.7.2.4 เติม $MgSO_4$ ปริมาณ 4 g และ NaCl ปริมาณ 1 g เขย่าหลอดทันทีเป็นเวลา 30 วินาที

5.7.2.5 เขย่าหลอดทันทีเป็นเวลา 30 วินาที ด้วย vortex mixer และ นำไปเหวี่ยงที่ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

5.7.2.6 ดูดสารสกัดชั้น ACN ปริมาตร 2 mLใส่ลงในหลอดพอลิโพรพิลีน 15mL ที่บรรจุ C18 sorbent ปริมาณ 0.1 g และ $MgSO_4$ ปริมาณ 0.3 g

5.7.2.7 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

5.7.2.8 นำไประเหยให้แห้งด้วย $N_2$

5.7.2.9 จากนั้นเติม 5%MeOH ปริมาตร 950 µL และ $^{13}$C-ISTD 50 µL

5.7.1.6 กรองผ่าน Syringe filters ขนาด 0.20 µm ชนิด PTFE

5.7.1.7 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

5.7.3 วิธี MFC ดำเนินการตามวิธีอ้างอิงจาก คู่มือผลิตภัณฑ์ PuriToX Trichothecene Column ยี่ห้อ R-Biopharm Rhône Ltd โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.7.3.1 ชั่งตัวอย่าง 25 g ใส่ในโถปั่น ขนาด 1L

5.7.3.2 เติม %80 ACN ที่ ปริมาตร 100 mL แล้วปั่นด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที

5.7.3.3 กรองด้วยกระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 4

5.7.3.4 ปิเปตสารละลายที่สกัดได้ปริมาตร 5 mL ผ่านคอลัมน์ SPE จากนั้นกดคอลัมน์ลงอย่างช้า ๆ เพื่อให้สารละลายไหลผ่านแผ่นกรอง (Frit) และตัวดูดซับภายในคอลัมน์

5.7.3.5 เก็บสารละลายส่วนที่ไหลผ่านคอลัมน์ 2 mL

5.7.3.6 นำไประเหยให้แห้งด้วย $N_2$ ที่อุณหภูมิ 60-70 $^{\circ}C$

5.7.3.7 เติม Diluent ( 80:20 ของ 5mM $NH_4OAC$ ในน้ำที่มี 0.1%v/v AcOH : 5 mM $NH_4OAC$ ใน MeOH ที่มี0.1%v/v AcOH ) ปริมาตร 1 mL จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 2-3 นาที

5.7.3.8 กรองผ่าน Syringe filters ขนาด 0.20 µm ชนิด PTFE

5.7.3.9 ปิเปตสารละลายในข้อ 5.7.3.7 ปริมาตร 675 µL, $^{13}$C-ISTD 37.5 µL และ Diluent 37.5 µL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 20 วินาที

5.7.3.10 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

5.7.4. วิธี prime HLB ดำเนินการตามวิธีอ้างอิงจาก Waters Corporation (Application Note, 2021) โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.7.4.1 ชั่งตัวอย่าง 5 ± 0.02 g ลงในหลอดพอลีโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร

5.7.4.2 เติม %80 ACN ที่มี 0.5%v/v AcOH, 0.2%v/v FA ปริมาตร20 mL เขย่าตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่าง (shaker)

5.7.4.3 นำไปเหวี่ยงที่ 5,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

5.7.4.4 ปิเปตสารละลายที่สกัดได้ปริมาตร 0.4 mL นำผ่านคอลัมน์สกัดเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction: SPE) ทิ้งสารละลายส่วนแรก และทำให้คอลัมน์ SPE แห้ง

5.7.4.5 ปิเปตสารละลายที่สกัดได้เพิ่มอีกปริมาตร 1.2 mL ผ่านคอลัมน์ SPE ซ้ำอีกครั้งเก็บสารละลายส่วนที่ไหลผ่านคอลัมน์ไว้

5.7.4.6 เจือจางสิ่งสกัดโดยปิเปตสิ่งสกัดปริมาตร 100 µL น้ำ DI ปริมาตร 850 µL และ $^{13}$C-ISTD ปริมาตร 50 µL จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer

5.7.4.7 กรองผ่าน Syringe filters ขนาด 0.20 µm ชนิด PTFE

5.7.4.8 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

5.8 การทดสอบเพื่อหา LODและค่า LOQ

การทดสอบเพื่อหาค่า LOD และค่า LOQ โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน trichothecene ทั้ง 9 ชนิด ที่ความเข้มข้นระดับ 1 แล้วทำตามวิธีทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า standard deviation (S0) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก 3S0' และค่า LOQ จาก 10S0' (Eurachem, 2025) โดยมีวิธีคำนวณหา S0' ดังสมการที่ 5

**สมการที่ 5**

$$S0' = \frac{S0}{\sqrt{n}}$$

โดยที่ S0' = ค่าส่วนเบี่ยงเบนสำหรับคำนวณ LOD และ LOQ

S0 = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการประมาณค่าผลการทดสอบเดียว จำนวน 10 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้นใกล้ศูนย์

n = จำนวนการทดสอบซ้ำสำหรับ routine sample

5.9 การยืนยันค่า LOD

การยืนยันค่า LOD ดำเนินการโดยเติมสารมาตรฐาน trichothecene 9 ชนิด จำนวน 10 ซ้ำ ลงใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้น ดังนี้

- 0.40 mg/kg สำหรับ NIV และ 3-AcDON
- 0.20 mg/kg สำหรับ 15-AcDON และ FUS-X
- 0.040 mg/kg สำหรับ NEO และ HT-2
- 0.020 mg/kg สำหรับ DAS และ DON
- 0.010 mg/kg สำหรับ T-2

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์จริง และประเมินสัญญาณของสารวิเคราะห์ที่ตรวจพบ โดยพิจารณาจากค่า S/N ≥ 3 และค่า IR อยู่ระหว่าง ±30% เทียบกับ mean IR ของสารมาตรฐานตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2026

5.10 การยืนยันค่า LOQ

การยืนยันค่า LOQ ดำเนินการโดยเติมสารมาตรฐาน trichothecene 9 ชนิด จำนวน 10 ซ้ำ ลงใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้น ดังนี้

- 0.80 mg/kg สำหรับ NIV, 15-AcDON, 3-AcDON และ FUS-X
- 0.16 mg/kg สำหรับ DON, NEO และ HT-2
- 0.080 mg/kg สำหรับ DAS
- 0.040 mg/kg สำหรับ T-2

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์จริง และประเมินสัญญาณของสารวิเคราะห์ที่ตรวจพบโดยพิจารณาจากค่า S/N ≥ 10 และค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ระหว่าง 70-120% และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ≤ 20% (SANTE 11312/2021 V2026)

5.11 การทดสอบ accuracy

ดำเนินทดสอบ accuracy โดยเติมสารมาตรฐาน trichothecene 9 ชนิด ลงในตัวอย่างอาหารสุกร จำนวน 5 ซ้ำ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ดังนี้

- 0.80, 3.2, 12.8 mg/kg สำหรับ NIV, 15-AcDON, 3-AcDON และ FUS-X
- 0.16, 0.64, 2.56 mg/kg สำหรับ DON, NEO และ HT-2
- 0.080, 0.32, 1.28 mg/kg สำหรับ DAS
- 0.040, 0.16, 0.64 mg/kg สำหรับ T-2

จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ทั้งนี้เกณฑ์การยอมรับกำหนดให้ %recovery อยู่ในช่วง 70–120% (SANTE 11312/2021 V2026)

**สมการที่ 6** $$\%recovery = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (mg/kg)}} \times 100$$

5.12 การทดสอบ repeatability

ทำการทดสอบสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecenes ทั้ง 9 ชนิดโดยใช้ตัวอย่างและระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ตามข้อ 5.11 และทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเกณฑ์การยอมรับ repeatability พิจารณาจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSDr) ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% (SANTE 11312/2021 V2026)

**สมการที่ 7** $$\%RSD_r = \frac{\text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ}} \times 100$$

5.13 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (within-laboratory reproducibility)

ทำการทดสอบสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecenes ทั้ง 9 ชนิด โดยใช้ตัวอย่างและระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ตามข้อ 5.11 โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน แต่ต่างนักวิเคราะห์และต่างวันที่วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเกณฑ์การยอมรับ within-laboratory reproducibility พิจารณาจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, $\%RSD_{wR}$) ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% (SANTE 11312/2021 V2026)

**สมการที่ 8** $$\%RSD_{wR} = \frac{\text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ}} \times 100$$

5.14 การประมาณค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) ตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 สามารถประมาณความไม่แน่นอนได้จากข้อมูลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ดังนี้

5.14.1 การคำนวณหาความลำเอียงสัมพัทธ์ (relative bias)

**สมการที่ 9** $$\text{relative bias} = \frac{\text{measured concentration- spiked concentration}}{\text{spiked concentration}} \times 100$$

5.14.2 การประมาณความไม่แน่นอนมาตรฐานจากความลำเอียง; U'(bias) คำนวณดังสมการที่10

**สมการที่ 10** $$U'(bias) = \sqrt{(\text{mean}_{bias})^2 + (SD.P_{bias})^2}$$

5.14.3 การประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากการทำซ้ำ; U'(precision) คำนวณดังสมการที่11

**สมการที่ 11** $U'(\text{precision}) = \%RSD_{wR} = \frac{\text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ}} \times 100$

5.14.4 การประมาณค่าความไม่แน่นอนรวม; U'(combined) คำนวณดังสมการที่12

**สมการที่ 12** $U'(\text{combined}) = \sqrt{(\text{mean bias})^2 + (SD.P_{bias})^2 + (RSD_{wR})^2}$

5.14.5 การประมาณความไม่แน่นอนขยาย; U'expanded โดยคูณค่า U'(combined) ด้วย coverage factor, k = 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณดังสมการที่13 ดังนี้

**สมการที่ 13** U'(expanded) = k x U'(combined)

โดยค่าความไม่แน่นอนขยายสำหรับวิธีทดสอบต้องไม่เกิน 50% (SANTE 11312/2021 V2026)

**6. ผลการทดลอง**

6.1 จากผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับส่วนการแยกสารมาตรฐาน trichothecenes และสารมาตรฐานภายใน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และส่วน mass spectrometer ได้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 3-6 และแสดงโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐาน trichothecene และ สารมาตฐานภายใน โดยแบ่งออกเป็นโครมาโทแกรมในโหมด positive ionization และ negative ionization แสดงดังรูปที่ 1-2

**ตารางที่ 3** แสดง HPLC conditions

| Parameters | Conditions |
|---|---|
| HPLC Column | Kinetex XB-C18 ขนาด 2.1×100 mm., 2.6 µm |
| Flow rate | 0.25 mL/min |
| Injection volume | 3 µL |
| Run time | 12 min |
| Mobile phase Line A | 5 mM ammonium acetate with 0.1% acetic acid in water |
| Mobile phase Line B | 5 mM ammonium acetate with 0.1% acetic acid in methanol |
| Elution mode | Gradient elution |

**ตารางที่ 4** แสดงสภาวะของ Interface parameters ของแหล่งกำเนิดไอออนแบบ ESI

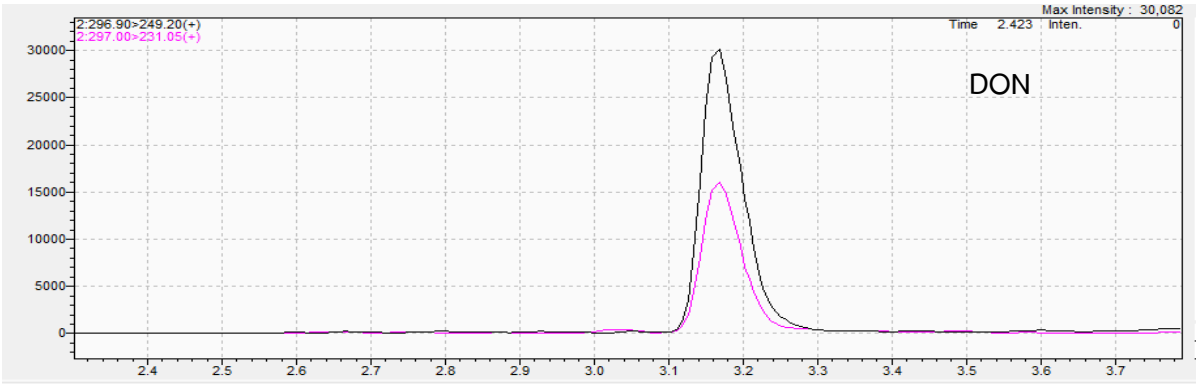
| Interface parameters | Conditions | Conditions |
|---|---|---|
| Ion Source | ESI (+) | ESI (-) |
| Curtain Gas (CUR) | 30 psi | 30 psi |
| Collision Gas (CAD) | Medium | Medium |
| IonSpray Voltage (IS) | 4500 V | -4500 V |
| Temparature (TEM) | 500 $^{\circ}$C | 500 $^{\circ}$C |
| Ion Source Gas 1 (GS1) | 40 psi | 40 psi |
| Ion Source Gas 2 (GS2) | 50 psi | 50 psi |

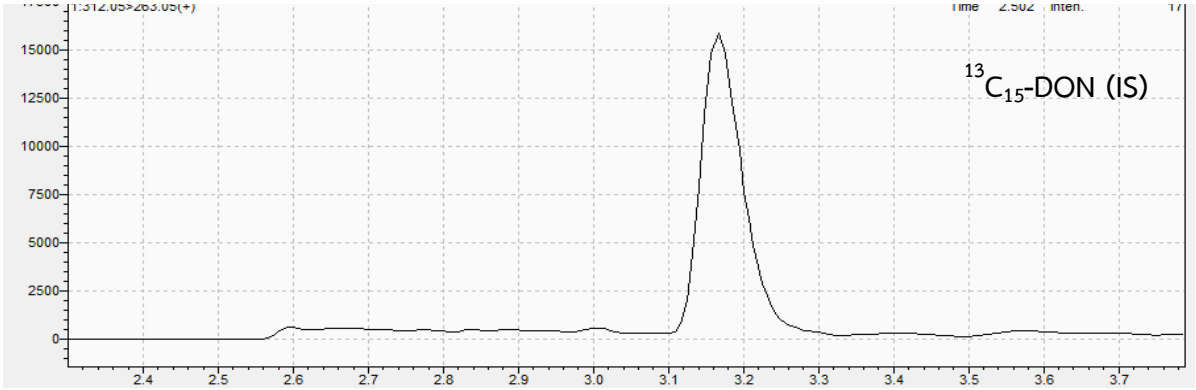
**ตารางที่ 5** แสดง MS/MS parameter แบบ MRM ของสารมาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน trichothecenes ในโหมด positive ionization

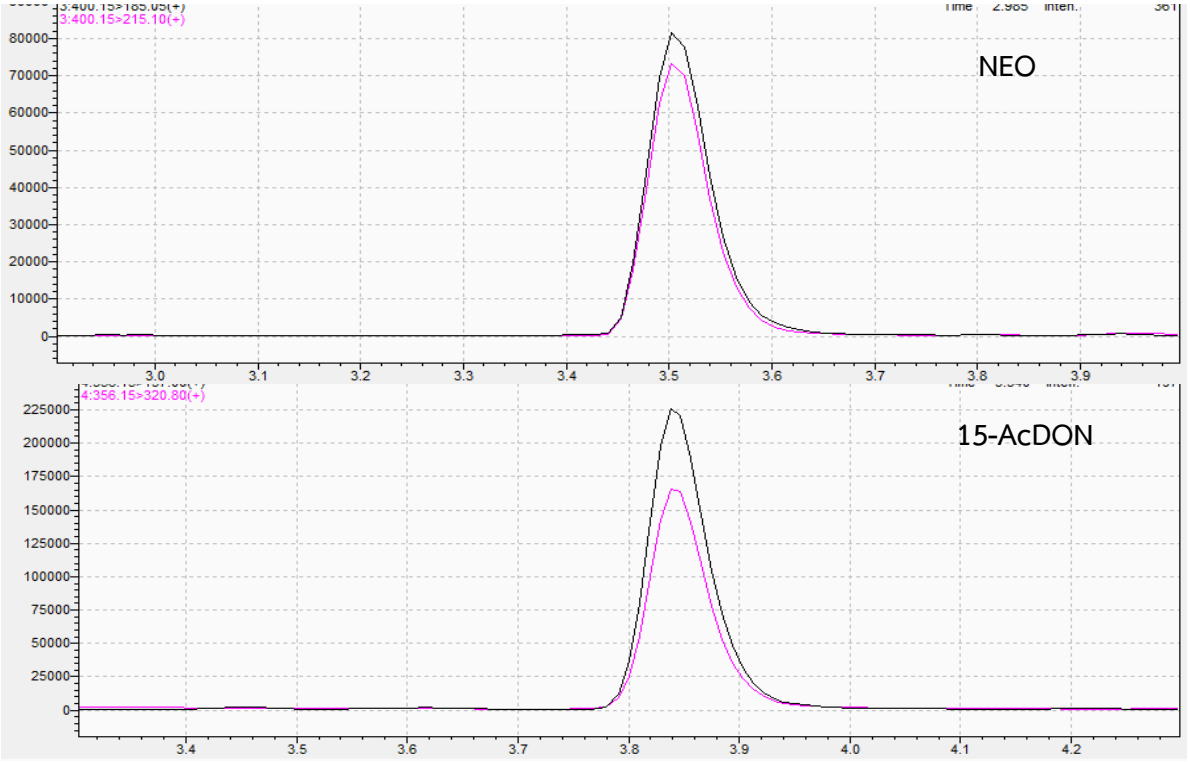
| Analyte | RT (min) | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Q1 | Q3 | CE (V) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DON | 3.18 | 296.90 | 249.20 | -11.0 | -12.0 | -11.0 |
| | | 296.90 | 231.05 | -11.0 | -16.0 | -13.0 |
| $^{13}C_{15}$-DON | 3.18 | 312.05 | 263.05 | -11.0 | -18.0 | -11.0 |
| NEO | 3.50 | 400.15 | 185.05 | -14.0 | -20.0 | -20.0 |
| | | 400.15 | 215.10 | -14.0 | -23.0 | -18.0 |
| 15Ac-DON | 3.85 | 356.15 | 137.00 | -13.0 | -26.0 | -16.0 |
| | | 356.15 | 320.80 | -13.0 | -22.0 | -14.0 |
| $^{13}C_{17}$-15-AcDON | 3.85 | 373.00 | 338.20 | -13.0 | -17.0 | -13.0 |
| DAS | 4.80 | 384.15 | 247.20 | -14.0 | -17.0 | -15.0 |
| | | 384.15 | 306.70 | -14.0 | -15.0 | -12.0 |
| $^{13}C_{19}$-DAS | 4.80 | 403.15 | 324.25 | -14.0 | -24.0 | -14.0 |
| HT-2 | 5.91 | 442.20 | 263.05 | -10.0 | -13.0 | -14.0 |
| | | 442.20 | 214.95 | -10.0 | -15.0 | -15.0 |
| $^{13}C_{22}$-HT-2 | 5.91 | 469.05 | 362.25 | -17.0 | -18.0 | -20.0 |
| T-2 | 6.02 | 484.30 | 215.10 | -11.0 | -10.0 | -20.0 |
| | | 484.30 | 185.05 | -11.0 | -20.0 | -22.0 |
| $^{13}C_{24}$-T-2 | 6.02 | 508.30 | 229.20 | -26.0 | -16.0 | -20.0 |

**ตารางที่ 6** แสดง MS/MS parameter แบบ MRM ของสารมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานภายใน trichothecenes ในโหมด negative ionization

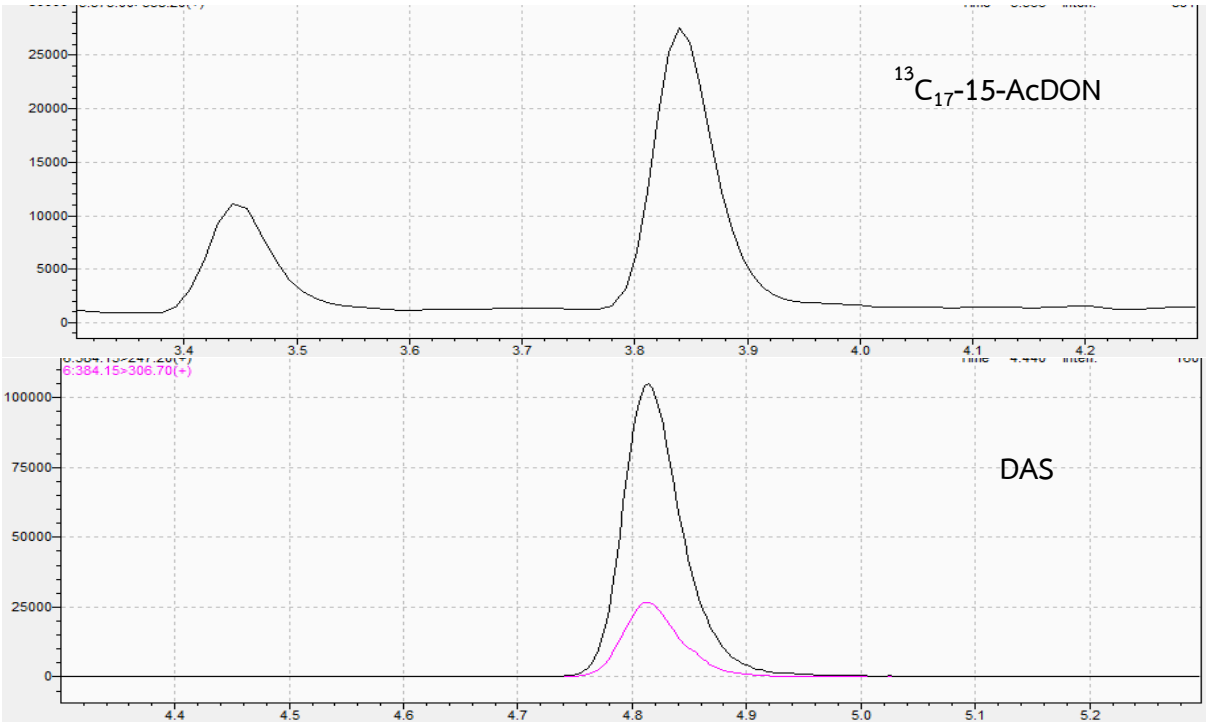
| Analyte | RT (min) | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Q1 | Q3 | CE (V) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NIV | 2.68 | 371.15 | 281.15 | 19.0 | 26.0 | 16.0 |
| | | 371.15 | 311.15 | 11.0 | 10.0 | 12.0 |
| $^{13}C_{15}$-NIV | 2.68 | 386.20 | 295.10 | 15.0 | 13.0 | 17.0 |
| FUS-X | 3.46 | 413.10 | 353.05 | 21.0 | 16.0 | 12.0 |
| | | 413.10 | 263.05 | 21.0 | 26.0 | 17.0 |
| 3-AcDON | 3.84 | 397.05 | 337.45 | 12.0 | 24.0 | 11.0 |
| | | 397.05 | 337.10 | 12.0 | 14.0 | 16.0 |
| $^{13}C_{17}$-3-AcDON | 3.84 | 414.25 | 323.10 | 12.0 | 15.0 | 17.0 |

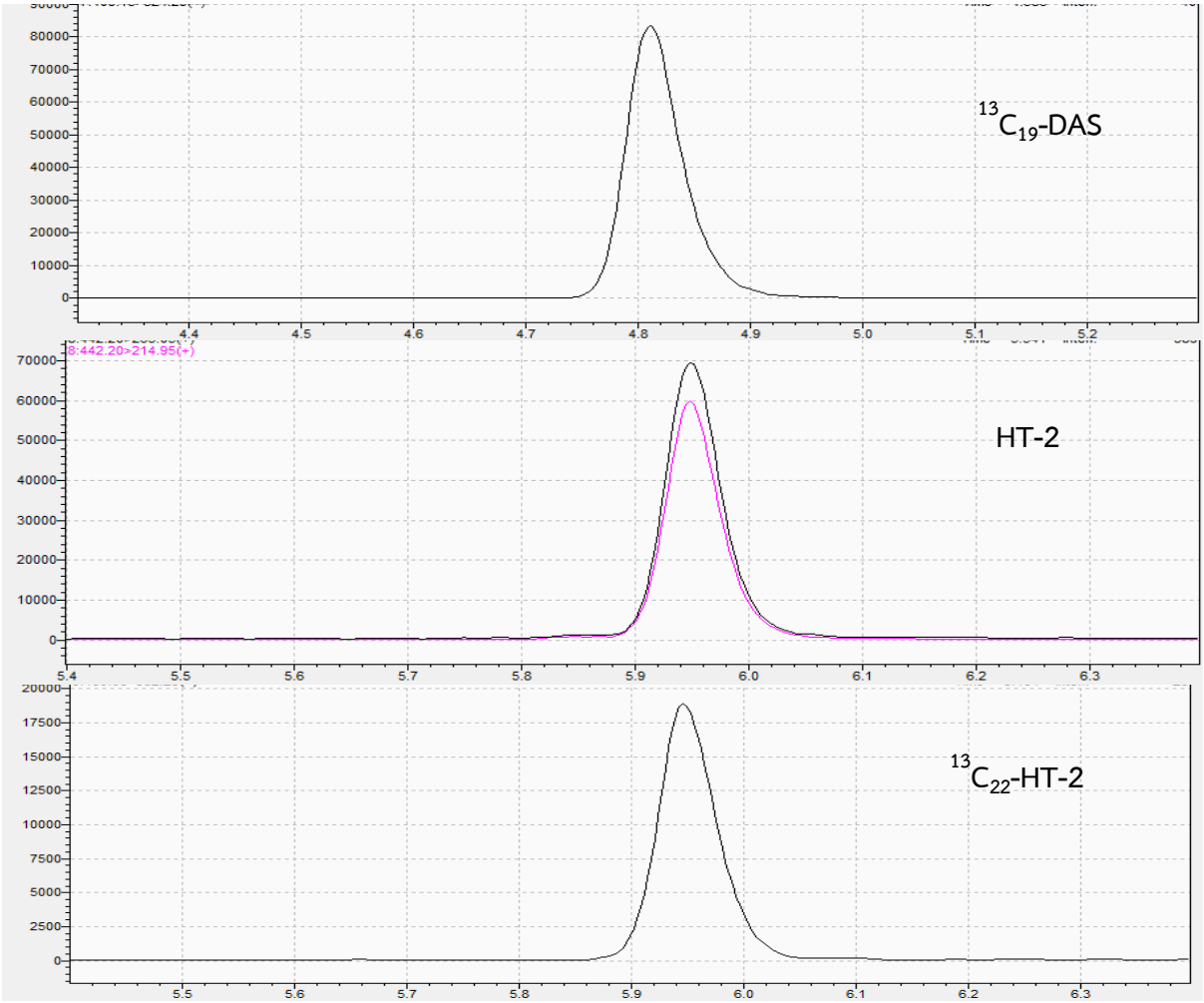


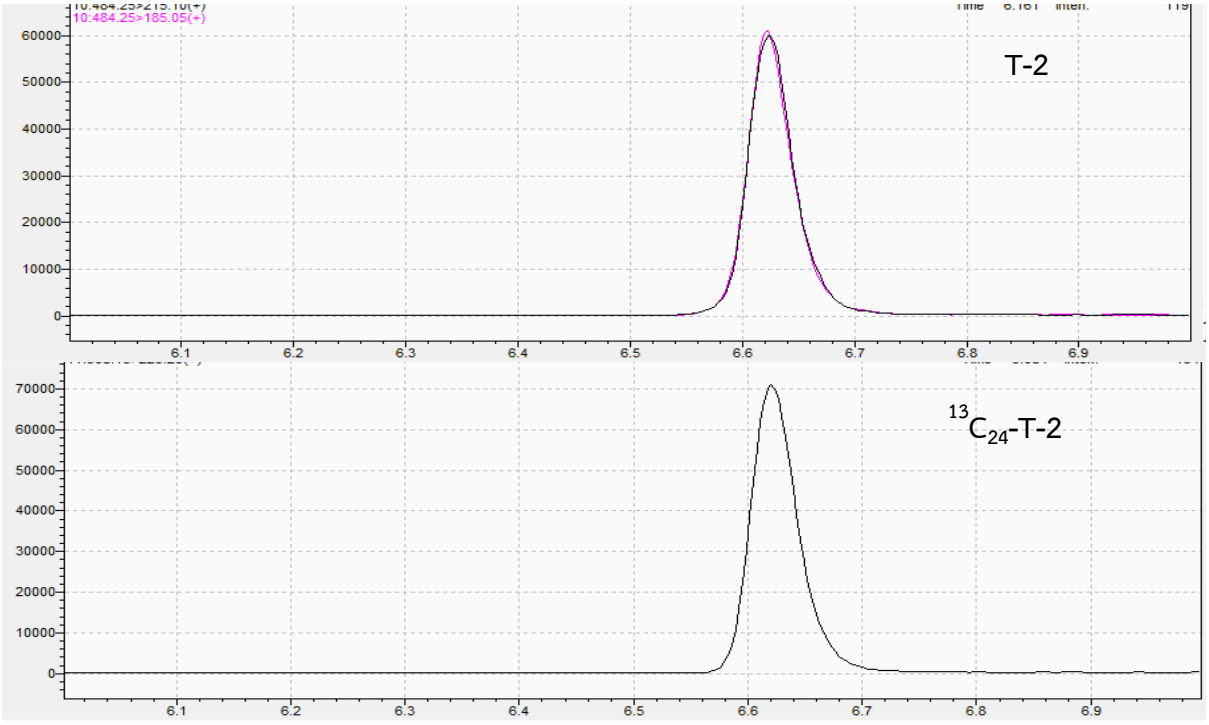



**รูปที่ 1** แสดง extracted ion chromatogram ของสารมาตรฐาน และสารมาตรฐานภายใน ในโหมด positive ionization

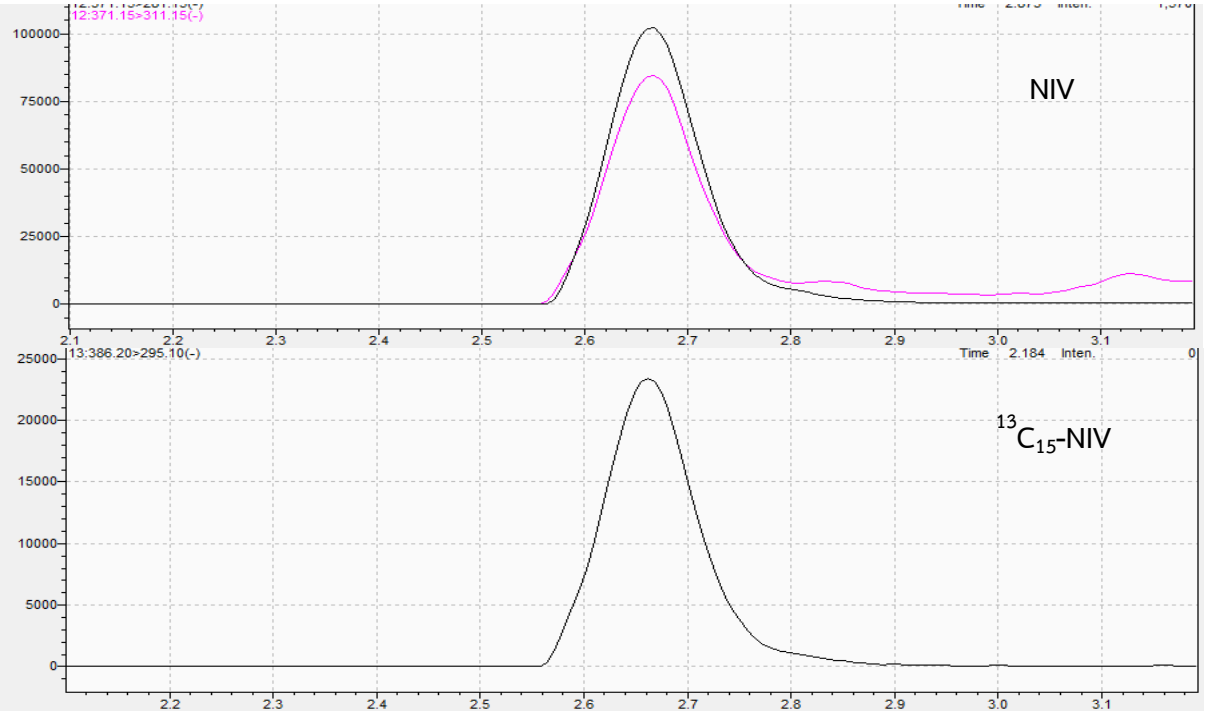




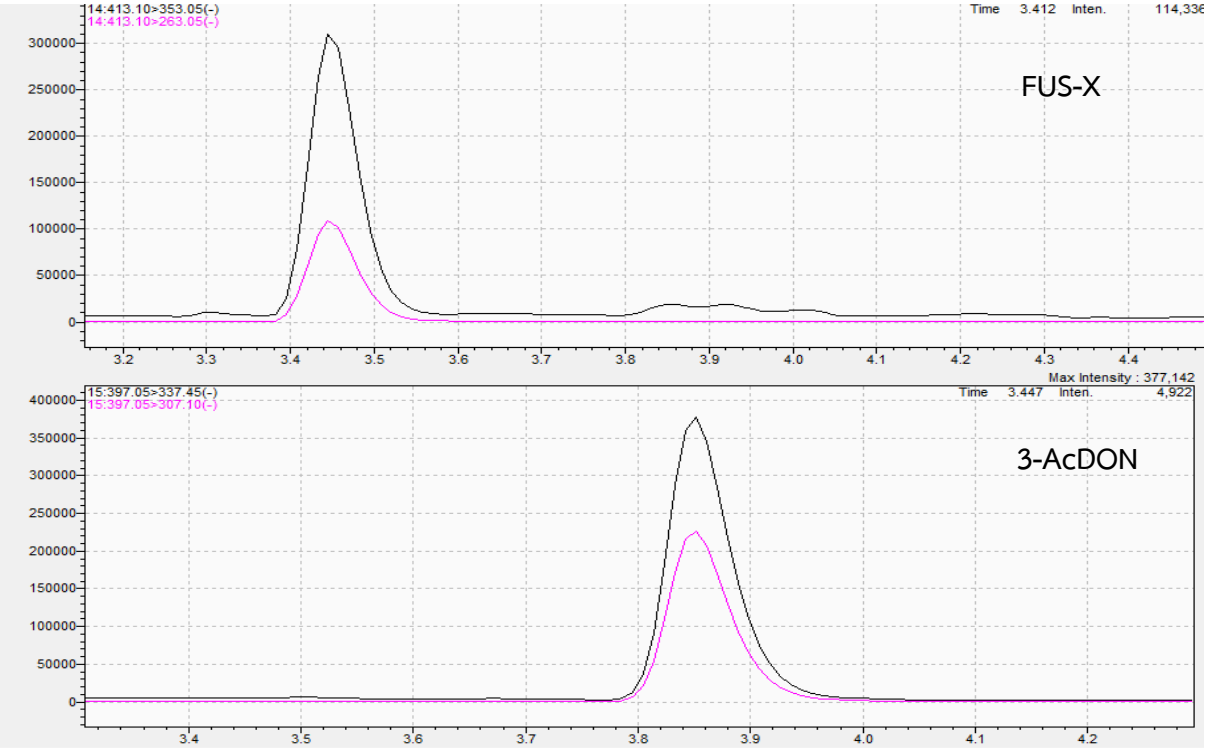

**รูปที่ 1** แสดง extracted ion chromatogram ของสารมาตรฐาน และสารมาตรฐานภายใน ในโหมด positive ionization(ต่อ)

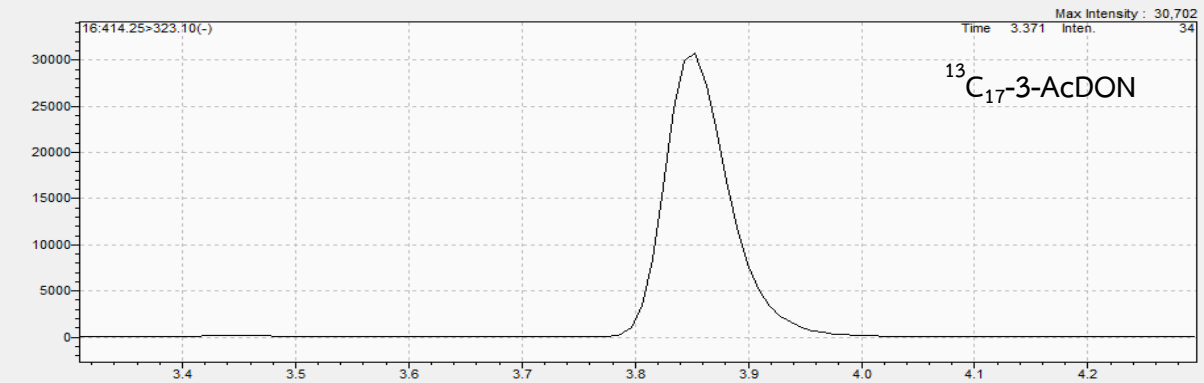


**รูปที่ 1** แสดง extracted ion chromatogram ของสารมาตรฐาน และสารมาตรฐานภายใน ในโหมด positive ionization(ต่อ)



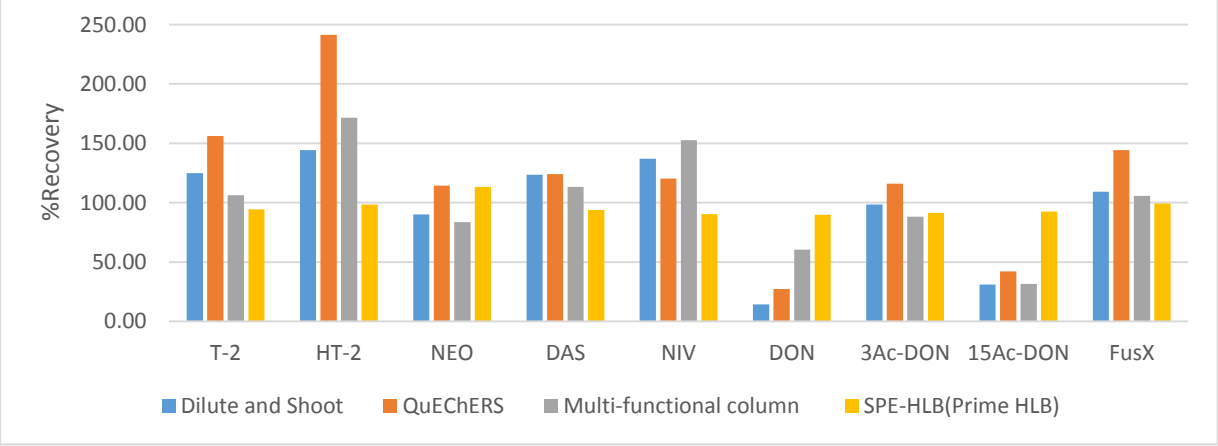

**รูปที่ 2** แสดง extracted ion chromatogram ของสารมาตรฐาน และสารมาตรฐานภายใน ในโหมด negative ionization






**รูปที่ 2** แสดง extracted ion chromatogram ของสารมาตรฐาน และสารมาตรฐานภายใน ในโหมด negative ionization

6.2 จากการทดสอบและเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารสุกร 4 วิธี ได้แก่ Dns, QuEChERS, MFC และ prime HLB พบว่าวิธี DnS, QuEChERS และ MFC ให้ค่า IR เบี่ยงเบนเกิน ±30% เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน และมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 30.91–144.35%, 27.38–241.45% และ 31.54–171.54% ตามลำดับ ซึ่งไม่เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามแนวทาง SANTE/11312/2021V2026 ที่กำหนดให้ค่า IR ต้องอยู่ในช่วง ±30% และ %recovery อยู่ในช่วง 70–120% และพบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมตัวอย่างคือ วิธี prime HLB โดยมีค่า IR อยู่ในช่วง ±30% เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน และมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 89.84–113.32% ดังรูปที่ 3




**รูปที่ 3** แสดง %recovery ของ trichothecenes ทั้ง 9 ชนิด ในตัวอย่างอาหารสุกร โดยวิธีการเตรียมตัวอย่าง 4 วิธี ได้แก่ Dns, QuEChERS, MFC และ prime HLB

6.3 การทดสอบ linearity and range

จากการทดสอบ linearity และ range ของสารมาตรฐาน trichothecene 9 ชนิด และสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990 พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ (AOAC, 2019) ดังตารางที่ 1 และคำนวณความเข้มข้นจริงกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ โดยพิจารณาจากค่าความเบี่ยงเบนของความ

เข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐานต้องไม่เกิน ±20% (SANTE 11312/2021 V2026) ดังตารางที่ 7-8 ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

**ตารางที่ 7** แสดงค่าของ slope, intercept และ correlation coefficient (r) ของสารมาตรฐาน trichothecene

| compounds | slope | intercept | r |
|---|---|---|---|
| NIV | 28.8843 | -0.0522205 | 0.99996 |
| DON | 62.8431 | -0.0123538 | 0.99993 |
| FUS-X | $7.84548 \times 10^{6}$ | -39236.70 | 0.99996 |
| NEO | $1.17643 \times 10^{7}$ | -19531.60 | 0.99990 |
| 3-AcDON | 76.4330 | 0.00148596 | 0.99998 |
| 15-AcDON | 58.7244 | 0.0209313 | 0.99998 |
| DAS | 88.3278 | 0.0315034 | 0.99996 |
| HT-2 | 100.527 | -0.1273460 | 0.99989 |
| T-2 | 128.469 | -0.0185748 | 0.99997 |

**ตารางที่ 8** แสดงค่าความเข้มข้นจริงและความเข้มข้นที่คำนวณได้ของของสารมาตรฐาน trichothecene

| compounds | the range of true concentration (µg/mL) | the range of deviation of back calculated concentration (%) |
|---|---|---|
| NIV | 0.020 – 0.800 | -1.43 – 7.42 |
| DON | 0.004 – 0.160 | -2.18 – 15.59 |
| FUS-X | 0.020 – 0.800 | -2.75 – 14.50 |
| NEO | 0.0040 – 0.160 | -4.06 – 16.79 |
| 3-AcDON | 0.020 – 0.800 | -1.55 – 3.08 |
| 15-AcDON | 0.020 – 0.800 | -2.19 – 1.99 |
| DAS | 0.0020 – 0.080 | -2.58 – 10.94 |
| HT-2 | 0.0040 – 0.160 | -3.05 – 18.12 |
| T-2 | 0.0010 – 0.040 | -2.33 – 11.37 |

6.4 การทดสอบ ME

จากการทดสอบ ME โดยประเมินจากค่า %SSE พบว่าสาร NIV, DON, NEO, 3-AcDON, 15-AcDON และ T2 มี %SSE ในช่วง 88.67-103.78 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 V2026 ที่กำหนดช่วงยอมรับไว้ที่ 80–120% และพบว่า FUS-X และ HT-2 มี %SSE เท่ากับ 77.59 % และ 124.81% ตามลำดับซึ่งอยู่นอกเกณฑ์การยอมรับดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์ มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์

6.5 การทดสอบสอบ IR

การพิจารณาค่า IR ดำเนินการโดยคำนวณ mean IR ของสารมาตรฐาน trichothecene จำนวน 9 ชนิด จากนั้นนำค่า IR ของสารที่ตรวจพบในตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับ mean IR ของสารมาตรฐาน เพื่อประเมินค่าความคลาดเคลื่อน (tolerance) ของการยืนยันชนิดสาร ผลการทดสอบพบว่า IR ของสารพิษจากเชื้อราที่ตรวจพบในตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับ mean IR ของสารมาตรฐานมีค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วงไม่เกิน ±30% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 V2026 โดยผลการทดสอบแสดงดัง ตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** แสดงค่า IR ของสารมาตรฐาน trichothecene 9 ชนิด ที่ 6 ระดับความเข้มข้น

| compounds | Mean %IR of Standards | Relative of IR | | |
|---|---|---|---|---|
| | | diff | lower | upper |
| NIV | 85.08 | 25.52 | 59.56 | 110.60 |
| DON | 48.62 | 14.59 | 34.03 | 63.21 |
| Fusarenon-X | 36.48 | 10.94 | 25.53 | 47.42 |
| NEO | 90.39 | 27.12 | 63.27 | 117.50 |
| 3-AcDON | 60.61 | 18.18 | 42.42 | 78.79 |
| 15-AcDON | 84.08 | 25.22 | 58.86 | 109.31 |
| DAS | 28.32 | 8.50 | 19.82 | 36.81 |
| HT-2 | 86.86 | 26.06 | 60.80 | 112.92 |
| T-2 | 98.57 | 29.57 | 69.00 | 128.13 |

6.6 การทดสอบเพื่อหาและการยืนยันค่า LOD และค่า LOQ

จากการทดสอบพบว่า LOD ของ trichithecene มีค่า 0.010 (T-2) ,0.020 (DON และDAS), 0.040 (NEO และ HT-2), 0.20 (FUS-X และ 15-AcDON), 0.40 (NIV และ 3-AcDON) mg/kg โดยที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีค่า S/N ≥ 3 และ IR มีความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วง ±30% ของ mean IR ของสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 V2026 และค่า LOQ ของ trichithecene มีค่า 0.040 (T-2) 0.080 (DAS), 0.16 (NEO, HT-2 และ DON ), 0.80 (FUS-X, NIV, 3-AcDON และ 15-AcDON) mg/kg โดยที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีค่า S/N ≥ 10 และมี %recovery และ %RSD อยู่ระหว่าง 97.04% (NIV) - 115.30% (15-AcDON) และ 1.27%(DAS) - 6.59%(DON) ตามลำดับซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% และ %RSD ≤ 20% (SANTE 11312/2021 V2026)

6.7 การทดสอบ accuracy

ความแม่นของวิธีทดสอบแสดงโดยค่า %recovery พบว่าสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene ทั้ง 9 ชนิด มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 84.33 (NIV)-118.75% (NEO) รายละเอียดตามตารางที่ 10

6.8 การทดสอบ precision

ความเที่ยงแสดงโดยค่า %RSD โดยพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงการยอมรับคือ 20% โดยค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (repeatability) โดยค่า $\%RSD_r$ อยู่ระหว่าง 0.77 (15-AcDON)- 4.28 % (FUS-X) และค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility) โดยค่า $\%RSD_{wr}$ อยู่ระหว่าง 1.46 (NIV)-12.73 % (NEO) รายละเอียดตามตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** การทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างอาหารสุกร

| Mycotoxin | Spike Level(mg/kg) | Repeatability (%$RSD_r$),(%recovery) | | Within-lab reproducibility |
|---|---|---|---|---|
| | | day1(n=5) | day2(n=5) | (%$RSD_{wr}$), (%recovery) (n=10) |
| NIV | 0.80 | 2.38 (102.98) | 3.53 (96.05) | 4.62 (99.51) |
| | 3.2 | 3.04 (92.68) | 2.09 (91.15) | 2.62 (91.92) |
| | 12.8 | 1.71 (86.93) | 2.24 (90.85) | 2.99 (88.89) |
| DON | 0.16 | 2.04 (113.68) | 2.41 (107.63) | 3.54 (110.63) |
| | 0.64 | 4.28 (100.88) | 3.65 (104.25) | 4.13 (102.56) |
| | 2.56 | 4.13 (95.20) | 4.38 (102.09) | 5.46 (98.64) |
| FUS-X | 0.80 | 3.40 (112.45) | 1.78 (99.83) | 6.81 (106.14) |
| | 3.2 | 1.88 (104.96) | 1.15 (105.27) | 1.47 (105.12) |
| | 12.8 | 1.19 (105.07) | 2.72 (102.19) | 2.44 (103.63) |
| NEO | 0.16 | 1.53 (116.75) | 1.84 (116.13) | 1.62 (116.44) |
| | 0.64 | 1.16 (112.03) | 1.09 (109.94) | 1.46 (110.98) |
| | 2.56 | 3.39 (105.42) | 3.38 (104.34) | 3.24 (104.88) |

**ตารางที่ 10** การทดสอบ accuracyและ precision ในตัวอย่างอาหารสุกร (ต่อ)

| Mycotoxin | Spike Level(mg/kg) | Repeatability (%$RSD_r$),(%recovery) | | Within-lab reproducibility |
|---|---|---|---|---|
| | | day1(n=5) | day2(n=5) | (%$RSD_{wr}$), (%recovery) (n=10) |
| 3-AcDON | 0.80 | 1.90 (115.55) | 4.48 (91.28) | 12.73 (103.41) |
| | 3.2 | 3.28 (108.97) | 1.77 (102.53) | 4.08 (105.75) |
| | 12.8 | 2.44 (110.09) | 3.43 (105.10) | 3.70 (107.60) |
| 15-AcDON | 0.80 | 2.13 (116.05) | 1.47 (114.93) | 1.81 (115.49) |
| | 3.2 | 2.49 (109.21) | 2.45 (109.74) | 2.34 (109.48) |
| | 12.8 | 0.77 (104.08) | 4.93 (103.28) | 3.34 (103.68) |
| DAS | 0.08 | 1.32 (116.25) | 1.81 (115.75) | 1.51 (116.00) |
| | 0.32 | 2.53 (113.69) | 1.63 (112.44) | 1.93 (113.06) |
| | 1.28 | 3.49 (104.75) | 2.53 (109.63) | 3.73 (107.19) |
| HT-2 | 0.16 | 0.92 ( 117.05) | 1.76 (115.00) | 1.74 (116.25) |
| | 0.64 | 1.87 (106.31) | 2.51 (106.63) | 2.09 (106.47) |
| | 2.56 | 2.02 (101.27) | 3.50 (101.27) | 2.69 (101.27) |
| T-2 | 0.04 | 1.18 (116.00) | 1.96 (114.00) | 1.77 (115.00) |
| | 0.16 | 2.41 (114.38) | 2.62 (111.88) | 2.64 (113.13) |
| | 0.64 | 2.98 (110.03) | 2.79 (111.16) | 2.77 (110.59) |

6.9 การประมาณค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE/11312/2021 V2026 จากข้อมูล method validation โดยนำข้อมูล within-laboratory reproducibility พบว่าความไม่แน่นอนขยาย; U'(expanded) พบว่าไม่เกิน 50% (SANTE/11312/2021 V2026) ได้ผลดังตารางที่ 11

**ตารางที่ 11** ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene 9 ชนิด

| Mycotoxins | Conc.(mg/kg) | Relative bias | Uncertainty | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | U'(bias) | U'(precision) | U'(combined) | U'(expanded) |
| NIV | 0.80 | -2.96 | 4.166 | 3.182 | 5.242 | 10.484 |
| DON | 0.16 | 7.25 | 9.874 | 6.588 | 11.870 | 23.741 |
| FUS-X | 0.80 | 2.85 | 4.715 | 3.850 | 6.087 | 12.174 |
| NEO | 0.16 | 8.75 | 3.802 | 3.685 | 10.227 | 20.454 |
| 3-AcDON | 0.80 | 9.00 | 9.237 | 2.009 | 9.453 | 18.905 |
| 15-AcDON | 0.80 | 15.30 | 15.583 | 2.703 | 15.816 | 31.631 |

**ตารางที่ 11** ผลการการประมาณค่าความไม่แน่นอนของสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene 9 ชนิด (ต่อ)

| Mycotoxins | Conc.(mg/kg) | Relative bias | Uncertainty | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | U'(bias) | U'(precision) | U'(combined) | U'(expanded) |
| DAS | 0.080 | 14.13 | 14.192 | 1.270 | 14.248 | 28.497 |
| HT-2 | 0.16 | 12.81 | 12.901 | 1.412 | 12.978 | 25.957 |
| T-2 | 0.040 | 11.00 | 12.298 | 5.223 | 13.361 | 26.723 |

**7. สรุปผลการทดลอง**

วิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene 9 ชนิด ได้แก่ NIV, DON, FUS-X, NEO, 3AcDON, 15-AcDON, DAS, HT-2, T2 ในตัวอย่างอาหารสุกรโดยใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Prime HLB โดยเริ่มจากการสกัดตัวอย่าง ด้วย 80% ACN %80 ACN ที่มี 0.5%v/v AcOH, 0.2%v/v FA แล้ว clean-up ตัวอย่างด้วย Prime HLB จากนั้นเติม $^{13}$C-ISTD ของสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene 9 ชนิด ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของสหภาพยุโรป (SANTE/11312/2021 V2026) ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene 9 ชนิด โดยมีช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มี ความเป็นเส้นตรงสำหรับHT-2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0010-0.040 µg/mL สำหรับ DAS ที่ระดับความเข้มข้น 0.0020-0.080 µg/mL สำหรับ DON, NEO, T-2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0040-0.16 µg/mL และสำหรับ NIV, FUS-X, 3-AcDON, 15-AcDON ที่ระดับความเข้มข้น 0.020-0.80 µg/mL โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) อยู่ระหว่าง 0.99989 (HT-2) - 0.99998 (3-AcDON) ค่า %deviation of back-calculated concentration อยู่ระหว่าง -4.06 (NEO) – 18.12 (HT-2) % พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ±20% และ IR ของ trichothecene ทั้ง 9 ชนิด พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้อยู่ในช่วงไม่เกิน ± 30 % ส่วนการศึกษา ME จากประเมินจากค่า %SSE พบว่ามี FUS-X มีเท่ากับ 77.59 % และ HT-2 มีค่าเท่ากับ 124.81 % ซึ่งอยู่นอกเกณฑ์การยอมรับ( 80-120% ) ค่า LOD อยู่ระหว่าง 0.010 (T-2) – 0.40 (3-AcDON) mg/kg และค่า LOQ อยู่ระหว่าง 0.040 (T-2) – 0.80 (DON) mg/kg %recovery อยู่ในช่วง 86.39 (NIV) – 117.05 (HT-2) % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และค่าความเที่ยงแสดงจากค่า %RSD ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ คือ ≤ 20% พบว่า repeatabilityได้ค่า %RSD$_r$ อยู่ระหว่าง 0.77 (15-AcDON) – 4.28 (DON) % และ within-laboratory reproducibility ได้ค่า %RSD$_{wR}$ อยู่ระหว่าง 1.47 (FUS-X) – 12.73 (3-AcDON) ค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecene 9 ชนิด ในอาหารสุกรตามแนวทางของสหภาพยุโรป SANTE/11312/2021 V2026 พบว่า U'(expanded) อยู่ในช่วง 10.484 -31.631%โดยค่าความไม่แน่นอนขยายของวิธีทดสอบไม่เกิน 50%

**8. ข้อเสนอแนะ**

เพิ่มขอบข่ายการพัฒนาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในสารพิษจากเชื้อราอุบัติใหม่ (emerging mycotoxins) และในชนิดตัวอย่างวัตถุดิบ และอาหารสัตว์ชนิดอื่น เพื่อให้ครอบคลุมชนิดวัตถุดิบและอาหารสัตว์

**9. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณนายขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ จิรภัทร อินทร์สุข ผู้อำนวยการสานักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

**10. เอกสารอ้างอิง**

CAST. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.

Dzuman, Z., Zachariášová, M., Lacina, O., Veprikova, Z., Slavikova, P. and Hajslova, J. (2014). A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. Talanta, 121, 263–272.

Dreolin, N., Foddy, H., Hird, S., Hancock, P. and Jenkins, T. (n.d.). Development of a multi-Toxin UPLC-MS/MS method for 50 mycotoxins and tropane alkaloids in cereal commodities. Application Note. Waters Corporation.

European Committee for Standardization (CEN). (2019). Animal feeding stuffs: methods of sampling and snalysis – determination of deoxynivalenol, aflatoxin B1, fumonisin B1 & B2, T-2 & HT-2 toxins, zearalenone and ochratoxin A in feed materials and compound feed by LC-MS/MS. EN 17194:2019. Brussels, Belgium: CEN.

European Commission. (2006). Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxin and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union, L229, 7–9.

European Commission. (2013). Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. Official Journal of the European Union, L91, 12–15.

European Commission Directorate General for Health and Food Safety (DG SANTE). (2021). Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANTE/11312/2021, Version 2026.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA Journal, 9(12), 2481.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. EFSA Journal, 15(9), 4718.

Nicola Dreolin, Sara Stead, Simon Hird and Timothy Jenkins. (n.d.). Determination of regulated and emerging mycotoxins in cereals, nuts, figs, and animal feeds using pass-through SPE and UPLC-MS/MS. Application Note. Waters Corporation.

Pestka, J.J. and Smolinski, A.T. (2005). Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 8(1), 39–69.

Pestka, J.J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Animal Feed and Technology, 137(3–4), 283–298.

Pestka, J.J. (2010). Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Archives of Toxicology, 84(9), 663–679.

Rocha, O., Ansari, K. and Doohan, F.M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. Food Additives and Contaminants, 22(4), 369–378.

Romer Labs. (n.d.). TRICHOTHECENE P. Product Information Sheet. Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria.

Rotter, B.A., Prelusky, D.B. and Pestka, J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Journal of Toxicology and Environmental Health, 48(1), 1–34.

R-Biopharm AG. (2018). TRICHOTHECENE P (Product Code: P51): Solid phase clean-up columns

for use in conjunction with LC-MS/MS (Version 5). R-Biopharm AG.

Shimadzu Corporation. (n.d.). Multi-residue analysis of 18 regulated mycotoxins by LC-MS/MS (2). Application News No. C165. Kyoto, Japan: Shimadzu Corporation.

Slovenian Institute for Standardization. (2020). Slovenski *standard: SIST EN 17194:2020* (01-januar-2020). SIST.

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuča, K. and Yuan, Z. (2014). Metabolic pathways of trichothecenes. Drug Metabolism Reviews, 46(2), 250–267.