

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone(ZON) ในข้าวโพดด้วย Immunoaffinity column โดย HPLC-FLD

สุทธิพร พิริยาน วิทยา สังข์ทอง ไกรวุฒิ นวลขาว ภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว
ชนิดา แก้วเกิดสี กุเกียรติ ขำขาว

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone(ZON) ในตัวอย่างข้าวโพดด้วย Immunoaffinity column โดย HPLC-FLD ซึ่งทำการสกัดตัวอย่างด้วย ACN 90% Cleanup ด้วย Immunoaffinity column แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD Fragmentor 95 eV. Gain 1dB. Mass 355.0(m/Z) Negative ion mode โดยใช้ Column Inertsil C₁₈(ODS-3) 150x4.6 mm. Particle size 5 µm. flow rate 1.0 mL/min Mobile phase ที่ใช้ 46% ACN ต่อ 46% น้ำ และเติม 8 % MeOH ผลการศึกษาพบว่า ค่าความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบZearalenone(ZON) อยู่ในช่วง 10 – 200 µg/kg มีค่า Coefficient of determination ≥ 0.995 ค่า HORRAT ของ Zearalenone(ZON)อยู่ในช่วง 0.33 - 0.64 ค่าเฉลี่ย %Recoveryของ Zearalenone(ZON) อยู่ในช่วง 80.98 – 95.85 % ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) ของ Zearalenone(ZON)) มีค่าเท่ากับ 10.00 µg/kg ค่าต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 20.00 µg/kg จากข้อมูลดังกล่าว สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นในการตรวจวิเคราะห์ Zearalenone(ZON) ในข้าวโพดได้

คำสำคัญ: Zearalenone(ZON), การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ, Immunoaffinity column (IAC) ข้าวโพด, HPLC-FLD

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Validation of Zearalenone(ZON) Analysis in Corn with Immunoaffinity column (IAC) by HPLC-FLD

Sutthiporn Phiriyayon Witaya Sungthong Kraiwut Nualkaw Panuwat sangphetrkaew
Chanida kaewkerdsi Kukiatt Khamkhaw

Abstract

The method validation of Zearalenone(ZON) analysis in Corn with Immuno affinity column (IAC) by HPLC-FLD was conducted. The samples were extracted with 100% DI water, clean-up by IAC and detected with LC-MS Fragmentor 95 eV. Gain 1dB.

Mass 355.0 m/Z. Negative ion mode Retention time(RT) 4.7 min. were done on Column reverse phase Inertsil C₁₈ (ODS-3) 150 x 4.6 mm. Particle size 5 µm. Column temperature 40 °C flow rate 1.0 mL/min The Solvent system was water-methanol(Mobile phase) The 46% ACN ต่อ 46% น้ำ และเติม 8 % MeOH. The linearity of Zearalenone(ZON) analysis illustrated 10 – 200 µg/kg . coefficient of determination (R^2) was greater than 0.9995 The precision of Zearalenone(ZON) demonstrated as HORRAT was in the ranged from 0.33 - 0.64 . The accuracy of Zearalenone(ZON) analysis in term of mean recovery percentage was in the ranged from 80.98 – 95.85 % . The limit of detection (LOD) limit of quantitation (LOQ) Zearalenone(ZON) were 10.00 µg/kg and 20.00 µg/kg, respectively. These results indicated that the validated method was suitable for Zearalenone(ZON) analysis in Corn .

Keywords : Zearalenone(ZON), Method Validation, Immunoaffinity column (IAC),
Corn,HPLC-FLD

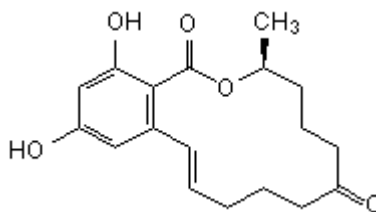
Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Product,

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด โดยวิธี Immunoaffinity column/ HPLC-FLD

สุทธิพร พิริยานน วิทยา สังข์ทอง ไกรวุฒิ นวลขาว ภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว
ชนิดา แก้วเกิดสี ภูเกียรติ ชำขาว

บทนำ

Zearalenone (F-2 Toxin) ดังแสดงในภาพที่ 1 เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อราในตระกูล *Fusarium* ได้แก่ *Fusarium culmorum*. และ *Fusarium graminearum*. การปนเปื้อนเชื้อราส่วนใหญ่พบในข้าวโพด และธัญพืชต่างๆ เช่นข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง เป็นต้น ซึ่งสามารถสร้าง Zearalenone ได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบหลักชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ผลิตเป็นอาหารสัตว์ ฤทธิ์ของสารพิษนี้จะส่งผลให้สัตว์เลี้ยงที่บริโภคอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อน Zearalenone เกิดการแท้งลูกและเป็นหมันได้ ทำให้ผลผลิตลดลง Zearalenone ได้รับความสนใจและมีการตื่นตัวเรื่องการปนเปื้อนในอาหารสัตว์ เนื่องจากการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (estrogen) ทำให้เกิดภาวะ hyperestrogenism ส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ และการเจริญเติบโตในสัตว์ ส่งผลกระทบต่อปศุสัตว์ สัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบว่าสุกรเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อ Zearalenone มาก เมื่อสุกรได้รับ Zearalenone จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้เป็นอนุพันธ์ต่างๆ ได้แก่ α - Zearalenol , β - Zearalenol และ Zearalenone



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสาร Zearalenone

สำหรับสหภาพยุโรปให้ความสำคัญกับปัญหาสารพิษจากเชื้อราในอาหารสัตว์เป็นอันมากจึงได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานสารพิษจากเชื้อราชนิด Zearalenone ในปริมาณธัญพืชและผลิตภัณฑ์ ≤ 2 mg/kg ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ ≤ 3 mg/kg หัวอาหารและอาหารสำเร็จรูปสำหรับ ลูกสุกร สุกรรุ่น สุกรสาว ≤ 0.1 mg/kg หัวอาหารและอาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกสุกรตัวเมีย, แม่พันธุ์เลี้ยงลูกและสุกรขุน ≤ 0.25 mg/kg หัวอาหารและอาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกวัว, โคนม, แพะ, ลูกแพะ, แกะ, ลูกแกะ ≤ 0.5 mg/kg

การดำเนินการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร Zearalenone มีความสำคัญและจำเป็นเพื่อใช้ในการควบคุม ดูแล ป้องกัน และแก้ปัญหาการปนเปื้อนให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยวิธีที่ถูกต้องแม่นยำ การพัฒนาวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด เป็นวิธีการหนึ่งในระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบให้ได้มาตรฐานที่ถูกต้อง เป็นการพัฒนาวิธีทดสอบในอาหารสัตว์หลายชนิดด้วย

จึงต้องมีการพัฒนาวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด เพื่อใช้เป็นวิธีของหน่วยงานในการทดสอบ และ อ้างอิงได้

1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้ทดสอบหาปริมาณ Zearalenone ในข้าวโพดได้

2. ขอบข่าย

ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค HPLC-FLD

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร Zearalenone ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค HPLC-FLD
2. เป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค HPLC-FL

4. วิธีดำเนินการ

4.1 จัดทำแผนการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามแนวทาง AOAC Appendix K (AOAC, 2016) และ EURACHEM Guide 2014 (EURACHEM, 2014)

4.1.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง อ้างอิง VICAM ZearalaTest (VICAM, 2013)
ชั่งตัวอย่าง 20 g + Sodium chloride 2 g ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL



เติม 90% Acetonitrile 50 mL เขย่าเป็นเวลา 30 นาที



กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4



ทำการ dilute ตัวอย่าง ในสัดส่วน 1 : 4 ด้วย DI Water



กรองด้วยกระดาษกรอง GF/C



Load ตัวอย่าง 10 mL ผ่าน Immunoaffinity Column



ล้างด้วย DI Water 10 mL



Elute column ด้วย 100% MeOH 1.5 mL
จากนั้นเติมน้ำ DI ลงไป 1.5 mL รวมปริมาตร 3.0 mL



กรองผ่าน Syringe Filters ขนาด 0.45 µm ชนิด Nylon



วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD

4.1.2 สภาพเครื่อง HPLC-FLD สำหรับวิเคราะห์ Zearalenone ตาม ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง HPLC Conditions สำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา Zearalenone

Parameters	Values
Mobile phase	46:46:8 (Acetonitrile : Water : Methanol)
Elution mode	Isocratic elution
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection volume	100 uL
Run time	14.00 min
Retention time (min)	7.90
Fluorescence	Excitation Wavelength = 274 nm
Detector	Emission Wavelength = 440 nm

4.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range) ของสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารมาตรฐาน Zearalenone ให้มีความเข้มข้น ตามตารางที่ 2 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD นำพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า Coefficient of Determination (r^2) โดยเกณฑ์การยอมรับ $r^2 \geq 0.995$ (AOAC, 2016)

ตารางที่ 2 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารพิษจากเชื้อรา Zearalenone

Compounds	Concentration ranges (ng/mL)
Zearalenone	10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 100.0, 200.0

4.3 ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range) ของวิธีทดสอบ โดยเตรียม matrix-matched standard calibration curve ให้มีความเข้มข้นตามตารางที่ 2 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD นำพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า Coefficient of Determination (r^2) โดยเกณฑ์การยอมรับ $r^2 \geq 0.995$ (AOAC, 2016)

4.4 ทดสอบความเที่ยงของระบบ (System repeatability)

โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 100 ug/L ด้วยเครื่อง HPLC-FLD 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า %RSD เกณฑ์การยอมรับ ค่า HORRAT ≤ 2 (AOAC, 2016)

4.5 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบแบบทวนซ้ำได้ (Precision)

โดยเตรียมสารมาตรฐาน Zearalenone ลงในตัวอย่างข้าวโพด 3 ระดับความเข้มข้น ตามตารางที่ 3 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้อ 6.1.1 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า HORRAT เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ≤ 2 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 3 ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ที่เติมลงในตัวอย่าง

Compounds	Fortified level		
	1	2	3
Zearalenone	20 ug/kg	80 ug/kg	200 ug/g

4.6 การทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบแบบทำซ้ำได้ (Intermediate Precision)

โดยใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน วิเคราะห์ต่างวัน และเจ้าหน้าที่ 2 คน โดยเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ลงในตัวอย่างข้าวโพด 3 ระดับความเข้มข้น ตามตารางที่ 3 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้อ 6.1.1 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า HORRAT เกณฑ์การยอมรับค่า $\text{HORRAT} \leq 2$ (AOAC, 2016)

4.7 การทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบ (Accuracy)

โดยเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ลงในตัวอย่างข้าวโพด 3 ระดับความเข้มข้น ตามตารางที่ 3 ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้อ 6.1.1 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า %recovery เกณฑ์การยอมรับ %recovery ต้องอยู่ในช่วง 70 – 110% (AOAC, 2016)

4.8 การทดสอบค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

โดยเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ให้มีความเข้มข้น 10 ug/kg ในตัวอย่างข้าวโพด แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้อ 6.1.1 ไม่น้อยกว่า 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า SD (Standard Deviation) แล้วคำนวณหาค่า LOD จาก 3SD และค่า LOQ จาก 10SD (EURACHEM, 2014)

4.9 การยืนยันค่า LOD

โดยเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า LOD ที่คำนวณได้ ลงในตัวอย่างข้าวโพด แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนตามข้อ 6.1.1 ไม่น้อยกว่า 10 ซ้ำ โดยผลที่ได้ต้องมีค่า signal to noise (S/N) ≥ 3 (EURACHEM, 2014)

4.10 การยืนยันค่า LOQ

โดยเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า LOQ ที่คำนวณได้ ลงในตัวอย่างข้าวโพด แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้อ 6.1.1 ไม่น้อยกว่า 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณ %recovery และค่า HORRAT เกณฑ์การยอมรับ %recovery ต้องอยู่ในช่วง 70 – 110% และค่า HORRAT ≤ 2 (AOAC, 2016)

4.11 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีทดสอบ (Selectivity)

โดยการเติมสารที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อวิธีทดสอบ ร่วมกับสารมาตรฐาน Zearalenone ให้มีความเข้มข้น 80 ug/kg ในตัวอย่างข้าวโพด แล้วเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้อ 6.1.1 ไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ นำผลที่ได้มาประเมินค่าความสามารถในการแยกสาร (Resolution, R_s) เกณฑ์การยอมรับ $R_s \geq 1.0$ (AOAC, 2016)

5. การตรวจสอบค่า Linearity และ Range

5.1 การตรวจสอบค่า Linearity และ Range ของสารมาตรฐาน Zearalenone

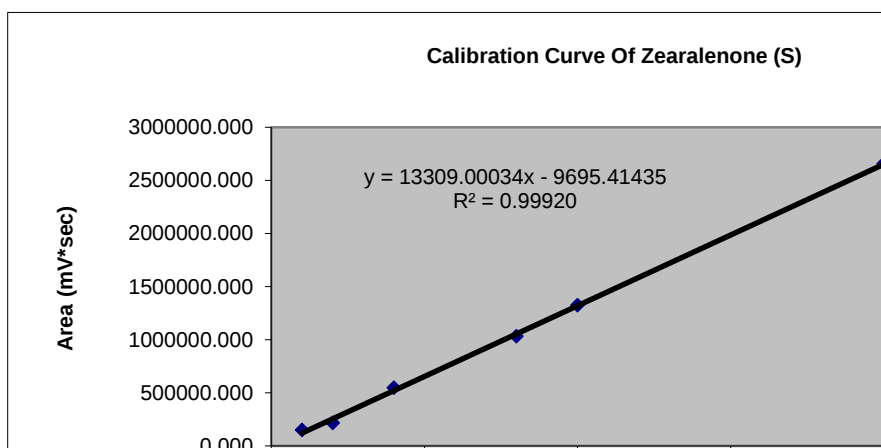
นิตสารละลายมาตรฐาน Zearalenone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 µg/mL ด้วยเครื่อง HPLC-FLD ตามวิธีทดสอบ ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ นำค่า Peak Area และค่าความเข้มข้นไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อศึกษาความเป็นเชิงเส้น (Linearity) โดยพิจารณาจากค่า Coefficient of determination (R^2) และทดสอบช่วงของแสดงดังตารางที่ 1

ความเข้มข้น (ng/mL)	Peak Area Zearalenone
ระดับที่ 1 Zearalenone(10)	151291.67

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของ Slope, Intercept และ Coefficient of determination (R^2) ของ สารมาตรฐาน Zearalenone

No.	Compound Zearalenone	Slope (peak area unit per ng/mL)	Intercept	R^2
1	Zearalenone	13309	-9695.41	0.9992

การทดสอบความตรงและช่วงของการทดสอบของสารมาตรฐาน Zearalenone พบว่า ค่า Coefficient of determination (R^2) มีค่า ≥ 0.995 ดังนั้นสารมาตรฐาน Aflatoxin Zearalenone ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC-FLD มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 – 200 ng/mL Calibration curve ของสารมาตรฐาน Zearalenone แสดงอยู่ในภาพที่ 1 ความเข้มข้นและ Peak area ของสารมาตรฐาน Zearalenone แสดงตามตารางที่ 2



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Peak area และค่าความเข้มข้น ของสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ความเข้มข้น 10 – 200 ng/mL

ตารางที่ 2 Peak
มาตรฐาน

Average	
ระดับที่ 2 Zearalenone(20) Average	217070.56
ระดับที่ 3 Zearalenone(40) Average	548114.78
ระดับที่ 4 Zearalenone(80) Average	1032470.49
ระดับที่ 5 Zearalenone(100) Average	1325490.07
ระดับที่ 6 Zearalenone(200) Average	2656440.09

area ของสาร
Zearalenone

5.2 การตรวจสอบค่า Linearity และ Range ของวิธีทดสอบ

ทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone ความเข้มข้น 20, 40, 80, 100 และ 200 µg/kg ด้วยเครื่อง HPLC-FLD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่า Peak Area และค่าความเข้มข้นไปสร้างกราฟความสัมพันธ์เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยพิจารณาจากค่า Coefficient of determination (R^2) และทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของ Slope, Intercept และ Coefficient of determination (R^2) ของวิธีทดสอบ Zearalenone

No.	Compound Zearalenone	Slope (peak area unit per µg/kg)	Intercept	R^2
1	Zearalenone	3759.36	6663.53	0.9987

การทดสอบความตรงและช่วงการทดสอบของวิธีทดสอบ พบว่าค่า Coefficient of determination (R^2) มีค่า ≥ 0.995 ดังนั้นวิธีทดสอบ Zearalenone มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 20 – 200 µg/kg แสดงอยู่ในภาพที่ 2 ความเข้มข้นและ Peak area ของ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone แสดงตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Peak area ของ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone ความเข้มข้น 20, 40, 80, 100 และ 200 µg/kg

No.	Peak Area Zearalenone				
	20 µg/kg	40 µg/kg	80 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg
1	91919.92	165719.26	297285.65	375991.22	777635.80
2	93696.78	163284.19	303242.23	406978.04	770585.95
3	74350.59	151943.38	272017.57	382779.32	734878.48
Average	86655.76	160315.61	290848.49	388582.86	761033.41

5.3 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

5.3.1 การทดสอบความเที่ยงของระบบ (System repeatability)

นำสารมาตรฐาน Zearalenone เตรียมความเข้มข้น 1 ระดับ (ระดับที่ 4 Zearalenone ความเข้มข้น 100 ng/mL) ฉีดด้วยเครื่อง HPLC-FLD โดยวัดซ้ำ 10 ครั้ง แล้วนำค่า Peak area ที่ได้ไปคำนวณหาค่า SD และ % RSD แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทดสอบความเที่ยงของระบบ (System repeatability) ของสารมาตรฐาน Zearalenone ความเข้มข้น 100 ng/mL

No.	Peak area Zearalenone
	Zearalenone
1	1310706.09
2	1314153.94
3	1311578.22
4	1326028.02
5	1263480.60
6	1321711.60
7	1326308.15
8	1322796.48
9	1320083.56
10	1218618.26
Average	1303546.49
SD	35029.97
% RSD	2.69

5.3.2 ทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (Method repeatability) โดยนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 $\mu\text{g/kg}$ ทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ได้ผลแสดงดังตารางที่

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80, และ 200 $\mu\text{g/kg}$

No.	20 $\mu\text{g/kg}$		80 $\mu\text{g/kg}$		200 $\mu\text{g/kg}$	
	Conc	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
1	19.84	99.20	78.16	97.71	158.79	79.40
2	17.85	89.26	75.54	94.43	155.72	77.86
3	16.39	81.98	83.66	104.59	171.16	85.58
4	17.96	89.82	76.77	95.96	137.02	68.51
5	18.85	94.26	71.36	89.21	169.33	84.67
6	20.83	104.17	73.33	91.67	182.39	91.20
7	17.00	85.05	77.93	97.42	159.30	79.65
Average	18.39	91.96	76.68	95.85	161.96	80.98
SD	1.56	7.81	3.94	4.92	14.34	7.17
%RSD	8.49	8.49	5.14	5.14	8.86	8.86
Horwitz equation	19.26	-	15.54	-	13.89	-
HORRAT	0.44	-	0.33	-	0.64	-

5.3.3 ทดสอบความเที่ยงของการทดสอบซ้ำ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน แต่ต่างนักวิเคราะห์และต่างวันที่วิเคราะห์ (Method Reproducibility) โดยทำการทดสอบ sample blank (ข้าวโพด) ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 $\mu\text{g/kg}$ (ระดับต่ำสุด, กลางและสูงสุดของช่วงการทดสอบ) ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ทำตามวิธีทดสอบแล้วนำข้อมูลของทั้งสองคนมารวมกันคำนวณหาค่า % Recovery, % RSD, ค่า HORRAT แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบค่าความเที่ยงของการทดสอบซ้ำ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และต่างวันที่วิเคราะห์ (Method Reproducibility) ที่ระดับ LOQ (ระดับต่ำสุดของช่วงการทดสอบ)

Condition	No.	Zearalenone 20 µg/kg		Zearalenone 80 µg/kg		Zearalenone 200 µg/kg	
		Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery	Conc.	%Recovery
เจ้าหน้าที่ ทดสอบคน ที่ 1	1	19.84	99.20	78.16	97.71	158.79	79.40
	2	17.85	89.26	75.54	94.43	155.72	77.86
	3	16.40	81.98	83.67	104.59	171.16	85.58
	4	17.96	89.82	76.77	95.96	137.02	68.51
	5	18.85	94.26	71.37	89.21	169.34	84.67
	6	20.83	104.17	73.34	91.67	182.39	91.20
	7	17.01	85.05	77.94	97.42	159.30	79.65
เจ้าหน้าที่ ทดสอบคน ที่ 2	8	18.18	90.89	78.03	97.55	209.76	104.88
	9	17.52	87.62	76.05	95.07	196.19	98.10
	10	17.31	86.55	76.17	95.22	197.79	98.90
	11	17.73	88.69	74.90	93.63	200.31	100.16
	12	17.72	88.62	79.00	98.75	183.34	91.67
	13	17.84	89.21	78.65	98.31	194.18	97.09
	14	16.81	84.07	80.94	101.18	189.25	94.63
Average		17.99	89.95	77.18	96.48	178.90	89.45
SD		1.18	5.89	3.07	3.84	20.88	10.44
%RSD		6.55	6.55	3.98	3.98	11.67	11.67
Horwitz equation		29.28	-	23.52	-	20.73	-
HORRAT		0.22	-	0.17	-	0.56	-

5.3.4 สรุปผล การศึกษาความเที่ยงของวิธีทดสอบ

5.3.4.1 การทดสอบความเที่ยงของระบบ (System repeatability)

จากการเตรียมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/mL นำไปวัดด้วยเครื่อง HPLC-FLD โดยทำการวัดซ้ำ 10 ครั้ง มีค่า % RSD ของ Zearalenone = 2.69

5.3.4.2 การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Method repeatability)

5.3.4.2.1 ค่า HORRAT ของ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 µg/kg มีค่าเท่ากับ 0.44, 0.33 และ 0.64 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น้อยกว่า 2

10.3.4.3 การทดสอบความเที่ยงของการทดสอบซ้ำต่างนักวิเคราะห์ และต่างวันที่วิเคราะห์ (Method Reproducibility)

5.3.4.3.1 ค่า HORRAT ของ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 µg/kg มีค่าเท่ากับ 0.22, 0.17 และ 0.56 ตามลำดับซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น้อยกว่า 2

5.4 การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy) โดยการนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 µg/kg ทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คำนวณหา % Recovery โดยค่า % Recovery ที่ได้ต้องอยู่ในช่วง 70 – 120% แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีทดสอบ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 µg/kg

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (µg/kg)	% Recovery	เกณฑ์มาตรฐาน
Zearalenone	20	91.96	70 – 120 %
	80	95.85	
	200	80.98	

สรุปผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์

% Recovery ของการทดสอบ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20, 80 และ 200 µg/kg คือ 91.96, 95.85 และ 80.98 % ตามลำดับ

5.5 Selectivity

การทดสอบความจำเพาะ (Selectivity) ของวิธีทดสอบ เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะกับ Zearalenone สามารถแยกชนิดของสาร Zearalenone ได้ ซึ่งดูได้จาก Retention time (RT) ของพีคของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone โดยใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ตามวิธีทดสอบ Retention

time ของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone 20, 80 และ 200 $\mu\text{g/kg}$ และค่าเฉลี่ย Retention time ของการทดสอบ Zearalenone แสดงอยู่ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 Selectivity ของ Retention time (min) ของการทดสอบ Zearalenone

Concentration ($\mu\text{g/kg}$)	Zearalenone
ระดับที่ 1	8.40
ระดับที่ 2	8.39
ระดับที่ 3	8.40
Average	8.39
SD	0.0057
%RSD	0.069

5.6 Limit of Detection (LOD) Limit of Quantification (LOQ)

การทดสอบเพื่อหาค่า LOD และ ค่า LOQ โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/kg}$ ทำตามวิธีทดสอบ 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า SD โดยคำนวณค่า LOD จาก 3SD และค่า LOQ จาก 10SD

ตารางที่ 10 Data ของตัวอย่าง sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/kg}$.

จำนวนซ้ำ	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
	Zearalenone 10 $\mu\text{g/kg}$
1	10.02
2	10.86
3	12.45
4	15.48
5	9.62
6	9.88
7	13.09
8	11.99
9	14.16
10	12.73
Average	12.03
SD	1.94
LOD	5.82
LOQ	19.40

5.7 การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD)

ทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐาน Zearalenone ความเข้มข้น 10 µg/kg ตามลำดับ ลงในตัวอย่าง sample blank (ข้าวโพด) จำนวน 10 ซ้ำ ทำตามวิธีทดสอบ ผลการทดสอบ ให้ดูระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่า ≥ 3 ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่า signal/noise ของการตรวจเพื่อยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ของสารมาตรฐาน Zearalenone ความเข้มข้น 10 µg/kg ตามลำดับ

ครั้งที่	Signal/noise
	Zearalenone 10 µg/kg
1	8.21
2	7.44
3	9.00
4	8.73
5	9.23
6	10.48
7	10.79
8	11.87
9	8.80
10	6.42
Average	9.09

สรุปผลการยืนยันค่า Limit of Detection (LOD)

ผลการทดสอบค่า LOD ของสารมาตรฐาน Zearalenone ที่ความเข้มข้น 10 µg/kg พบว่าระดับสัญญาณของพีคมีค่า signal/noise มากกว่า 3 ดังนั้นค่า LOD ของการทดสอบ Zearalenone มีค่า 10 µg/kg

5.8 การยืนยันค่า Limit of Quantitation (LOQ)

การทดลองเพื่อยืนยันค่า LOQ โดยทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Zearalenone ความเข้มข้น 20 µg/kg ทำตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า % Recovery, % RSD และค่า HORRAT ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบค่า LOQ ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด โดย HPLC-Fluorescence Detection

จำนวนซ้ำ	Recovery data	
	Zearalenone 20 µg/kg	
	Conc.	%Recovery
1	19.33	96.65
2	20.31	101.55
3	18.42	92.10
4	19.55	97.75
5	18.13	90.65
6	17.68	88.40
7	17.57	87.85
8	19.31	96.55
9	20.22	101.10
10	19.98	99.90
Average	19.05	95.25
SD	1.03	5.14
%RSD	5.40	5.40
Horwitz equation	19.16	-
HORRAT	0.28	-

สรุปผลการการยืนยันค่า Limit of Quantification

1. ค่า HORRAT ของ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20 µg/kg มีค่าเท่ากับ 0.28 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น้อยกว่า 2

2. % Recovery ของการทดสอบ Zearalenone ที่ระดับความเข้มข้น 20 µg/kg คือ 95.25 %

3. สรุปผลการยืนยันค่า LOQ ของการทดสอบ Zearalenone มีค่า 20 µg/kg ดังแสดงตามตารางที่

13

ตารางที่ 13 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ) ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด

โดย HPLC-Fluorescence Detection

LOD Zearalenone (µg/Kg)	LOQ Zearalenone (µg/Kg)
10	20

6. สรุปผลการทดลอง

ผลของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในอาหารสัตว์ โดย HPLC-Fluorescence Detection ในตัวอย่างข้าวโพด เป็นไปตามมาตรฐานของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบดังแสดงในตารางที่ 14

ดังนั้นจากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ สามารถยืนยันได้ว่าวิธีการทดสอบนี้ มีความเหมาะสมในการทดสอบหา Zearalenone ในข้าวโพดด้วย โดย HPLC-Fluorescence Detection สำหรับ Zearalenone

ตารางที่ 14 สรุปผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Zearalenone ในข้าวโพด โดย HPLC-Fluorescence Detection

No.	Parameter	Zearalenone
1	Linearity และ range ของสารมาตรฐาน	$R^2 = 0.9992$ (10 – 200 ng/mL)
2	Linearity และ range ของวิธีทดสอบ	$R^2 = 0.9987$ (20 – 200 $\mu\text{g/kg}$)
3	Precision (Repeatability)	HORRAT 0.33 – 0.64 (20 – 200 $\mu\text{g/kg}$)
4	Precision (Reproducibility)	HORRAT 0.17 – 0.56 (20 – 200 $\mu\text{g/kg}$)
5	Accuracy	% Recovery อยู่ ในช่วง 80.98 – 95.85%
6	LOD	10 $\mu\text{g/kg}$
7	LOQ	20 $\mu\text{g/kg}$

7. ข้อเสนอแนะ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายไพโรจน์ อารังโสภาส ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นายกิตติพงศ์ ศิริสุทธนันท์ ผู้อำนวยการส่วนบริหารจัดการปฏิบัติการ ที่ดำเนินการจัดหาวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี ในการปฏิบัติงาน ข้าราชการทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการปฏิบัติงาน ตลอดจนพนักงานราชการงานสารพิษจากเชื้อรา กลุ่ม ตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่มีส่วนช่วยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525. ฉบับแก้ไข 2545.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดลักษณะของอาหารเสริมคุณภาพ พ.ศ. 2537.

โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. หน้า 102.

สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ. 2553. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

AOAC (2016). Appendix K: Part I: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

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

VICAM Instruction Manual (2013). ZearalaTest and ZearalaTest WB use for HPLC.

Vicam Zearatest Instruction Manual. (2011). ZEARATEST HPLC Procedure For Corn,. P12

G. A. Bennet, Odette L. Shotwell, and William F. Kwolek (1985) Liquid Chromatographic Determination of α -Zearalenol and Zearalenone in corn : Collaborative Study. Journal of Anal. Chem. (VOL. 68, NO. 5, pp 958-961).