

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxins ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS

ไกรวุฒิ นวลขาว กุ้เกียรติ ขำขาว

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ HPLC และ ระบบ Mass Spectrometer เพื่อใช้หา retention time รูปร่างของพีค รวมไปถึงความเป็นเส้นตรง (linearity) ของ calibration curve และค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) การศึกษาพัฒนาวิธีทดสอบในครั้งนี้ได้ใช้ AflaTest HPLC (Immunoaffinity column; IAC) ในการ clean-up

จากการทดสอบหา retention time (RT) พบว่า Aflatoxin B_1 = 5.86, Aflatoxin B_2 = 5.19, Aflatoxin G_1 = 4.42 และ Aflatoxin G_2 = 3.88 ส่วนการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ได้ผล r^2 ดังนี้ Aflatoxin B_1 = 0.99900, Aflatoxin B_2 = 0.99906, Aflatoxin G_1 = 0.99882 และ Aflatoxin G_2 0.99768 พบว่าทั้งหมดนี้มีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบปริมาณของ Aflatoxins ได้ ส่วนการทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) พบว่า Aflatoxin B_1 2.0922 ng/mL (104.61%), Aflatoxin B_2 2.3205 ng/mL (116.02%), Aflatoxin G_1 2.1874 ng/mL (109.37%) และ Aflatoxin G_2 4.7151 ng/mL (94.30%) ซึ่งทั้งหมด %recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 80 – 120%

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน, Immunoaffinity column, ข้าวโพด

Method Development for Determination of Aflatoxins in Corn by LC-MS/MS

Kraiwut Nualkaw

Kukiat Khamkhaw

Abstract

This study for development of test methods Aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) in corn by LC-MS/MS aims to study optimize HPLC conditions and Mass Spectrometer Parameter for reach the good peak, retention time, linearity of calibration curve and %recovery for any type of Aflatoxins. This study used AflaTest HPLC (immunoaffinity column; IAC) as clean-up. The study results showed that standard solution with different concentrates 0.125 – 20.0 ng/mL to create calibration curve, so result $r^2 = 0.99848$ for Aflatoxin B_1 , 0.99906 for Aflatoxin B_2 , 0.99882 for Aflatoxin G_1 and 0.99768 for Aflatoxin G_2 and recovery percentage testing results of Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 and G_2 are 104.61%, 116.02%, 109.37% and 94.30% respectively these are all accepted in range 80 – 120%

Keywords: Aflatoxins, Immunoaffinity column, Corn

บทนำ

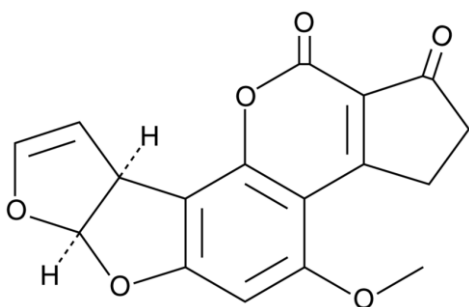
อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เป็นสารเคมีมีพิษและก่อมะเร็งที่ผลิตจากราสำคัญ ๆ หลายชนิด เช่น *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเจริญในดิน พืชพรรณที่ย่อยสลาย ฟางและเมล็ดพืช มักพบในโรคภัยที่สำคัญที่เก็บอย่างไม่เหมาะสม เช่น มันสำปะหลัง พริกไทย ข้าวโพด เมล็ดฝ้าย ข้าวเดือย ถั่วลิสง ข้าวฟ่าง เมล็ดดอกทานตะวัน ผลเปลือกแข็งเมล็ดเดียว ข้าวสาลี และเครื่องเทศหลายชนิด เมื่ออาหารที่ปนเปื้อนถูกแปรรูป อะฟลาทอกซินจะเข้าสู่แหล่งอาหารทั่วไปซึ่งมีการพบทั้งในอาหารคนและสัตว์เช่นเดียวกับในอาหารสัตว์สำหรับสัตว์ทางการเกษตรสัตว์ที่ได้อาหารที่ปนเปื้อนสามารถผ่านผลิตภัณฑ์การแปรรูปอะฟลาทอกซินสู่ไข่ ผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ได้

เด็กได้รับผลกระทบจากการสัมผัสอะฟลาทอกซินมากเป็นพิษ ทำให้การเติบโตช้า พัฒนาการช้า ตับเสียหายและมะเร็งตับ ผู้ใหญ่มีความทนต่อการสัมผัสมากกว่า แต่ก็ยังมีความเสี่ยง ไม่มีสัตว์ชนิดใดมีภูมิคุ้มกัน ต้านทาน อะฟลาทอกซินจัดเป็นสารก่อมะเร็งได้มากที่สุดชนิดหนึ่งเท่าที่ทราบ หลังเข้าสู่ร่างกาย อะฟลาทอกซินจะถูกตับสร้างและสลายเป็นสารตัวกลางอีพอกไซด์กัมมันต์หรือถูกย่อยสลายด้วยน้ำกลายเป็น aflatoxin M₁ ซึ่งเป็นอันตรายน้อยกว่า

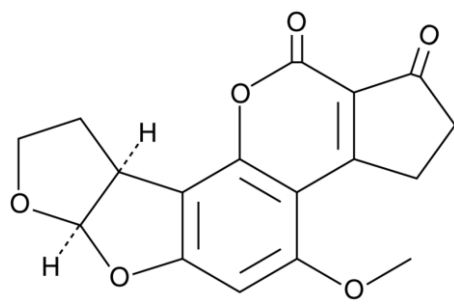
อะฟลาทอกซินส่วนใหญ่ได้จากการกิน แต่ aflatoxin B₁ ซึ่งเป็นพิษมากที่สุด สามารถผ่านเข้าทางผิวหนังได้

ค่าระดับการแสดงฤทธิ์ที่องค์การอาหารและยาสหรัฐ (FDA) กำหนดสำหรับอะฟลาทอกซินในอาหารหรืออาหารสัตว์อยู่ที่ 20 ถึง 300 ส่วนต่อพันล้านส่วน FDA ยังสามารถประกาศเรียกคืนอาหารคนและสัตว์ได้เป็นมาตรการล่วงหน้าเพื่อป้องกันการสัมผัส

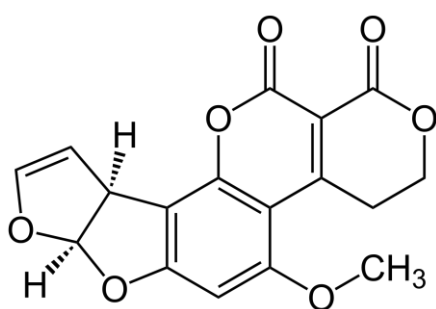
คำว่า "อะฟลาทอกซิน" มาจากชื่อของราตัวหนึ่งที่ผลิตสารนี้ คือ *Aspergillus flavus* มีการประดิษฐ์คำนี้ประมาณ ค.ศ. 1960 หลังการค้นพบว่าสารนี้เป็นบ่อเกิดของ "โรคไก่อ้วนเอ็กซ์" aflatoxins เป็นพิษเห็ดรากลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง



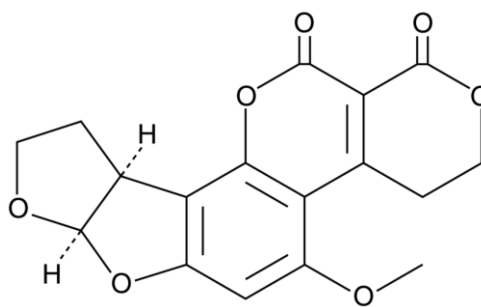
Aflatoxin B1



Aflatoxin B2



Aflatoxin G1



Aflatoxin G2

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂

การเกิดพิษ การเป็นพิษสำหรับ aflatoxins นั้น พบว่ายังไม่มีสัตว์สายพันธุ์ไหนที่มีภูมิคุ้มกันหรือความต้านทานต่อการเกิดพิษของอะฟลาทอกซินเลย ทั้งนี้ การเกิดพิษนั้น พบว่า ยิ่งสัตว์ หรือมนุษย์ที่มีอายุมากกว่า จะมีความเสี่ยงต่อการได้รับอะฟลาทอกซินมากตามไปด้วย โดยการออกฤทธิ์นั้นสามารถสร้างเซลล์มะเร็งได้ สร้างความเสียหายให้กับอวัยวะต่าง ๆ รวมถึงเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในระดับ DNA ได้อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาหาวิธีในการตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราชนิดอะฟลาทอกซินจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะกับกรมปศุสัตว์ ซึ่งการปศุสัตว์หากมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ทั้งในอาหารสัตว์ วัตถุดิบอาหารสัตว์ ก็สามารถส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางปศุสัตว์ที่มนุษย์จะนำมาบริโภคอีกด้วย

การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน นั้นมีหลายวิธี วิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความสามารถ และความแม่นยำสูงที่สุดในขณะนี้ก็คือ Mass Spectrometry

1. ชื่อโครงการ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxins ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS

ผู้รับผิดชอบ

1. นายไกรวุฒิ นวลขาว นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ
2. นายภูเกียรติ ขำขาว นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา Aflatoxins ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS

3. ขอบข่าย

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxins ในข้าวโพด และเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxins ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS และนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

5. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

5.1 เครื่องมือ

- 5.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Sciex QTRAP 5500
- 5.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG603-S
- 5.1.3 เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Hanil รุ่น Combi 514R
- 5.1.4 Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2
- 5.1.5 Micro Pipette ขนาด 2 – 20 μL
- 5.1.6 Micro Pipette ขนาด 10 – 100 μL
- 5.1.8 Micro Pipette ขนาด 100 - 1,000 μL
- 5.1.9 Micro Pipette ขนาด 500 - 5,000 μL
- 5.1.10 Dispenser ขนาด 100 mL
- 5.1.12 เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MF-D
- 5.1.13 ปั่นกรองสารละลาย ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S

+

5.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

- 5.2.1 Methanol HPLC grade ใช้สำหรับเตรียม Mobile phase
- 5.2.2 น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$
- 5.2.3 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3), AR หรือ GR grade
- 5.2.4 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5%

5.3 อุปกรณ์

- 5.3.1 Column HPLC C_{18} 3 μm ขนาด 3.0 $\times$ 150 มิลลิเมตร, Shimadzu Shim-pack HR-ODS
- 5.3.2 Erlenmeyer Flask ขนาด 125 และ 250 mL
- 5.3.3 ซ้อนตักสาร
- 5.3.4 กรวยกรองสารละลาย
- 5.3.5 หลอดเข็นตริฟิวซ์ชนิด Polypropylene ขนาด 50 mL
- 5.3.6 กระดาษกรอง Whatman no.4 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18.5 cm.
- 5.3.7 Rack สำหรับวางหลอดเข็นตริฟิวซ์
- 5.3.9 Syringe พลาสติกขนาด 3 และ 10 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม
- 5.3.10 Syringe Filters ชนิด Nylon ขนาด 0.20 μm
- 5.3.11 Clamp พร้อมขาตั้ง หรือชุด hand pump
- 5.3.13 Immunoaffinity column AflaTest ยี่ห้อ VICAM
- 5.3.14 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum
- 5.3.15 กระบอกตวงขนาด 50, 1000 mL
- 5.3.16 ปีกเกอร์ขนาด 50, 1000 mL
- 5.3.17 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mL

5.3.18 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase

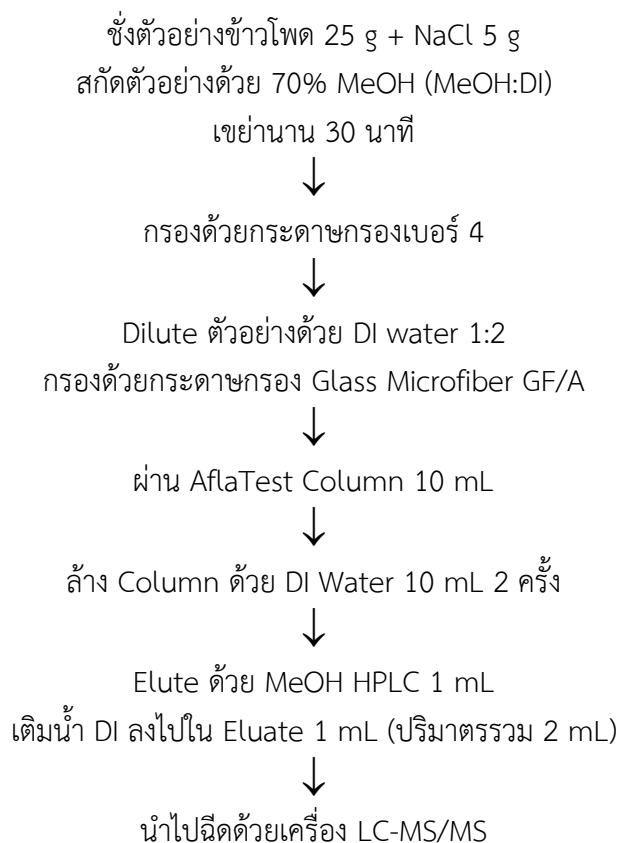
5.3.19 Disposable Cuvettes

5.3.20 Vial ขนาด 1.5 mL

5.3.21 กระดาษกรอง Glass Microfiber GF/A

6. วิธีการดำเนินงาน

6.1 วิธีทดสอบ



6.2 สภาพที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง LC-MS/MS

HPLC Conditions

Mobile phases:

MPA: 1 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ with 0.5% CH_3COOH in DI water

MPB: 1 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ with 0.5% CH_3COOH in MeOH

MP: 1 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ with 0.5% CH_3COOH in 40% MeOH

Flow rate: 0.4 mL/min

Inject volume: 5 μL

HPLC Column: Shim-pack HR-ODS 150 x 3.0 mm 3 μm

Column temp: 40 $^{\circ}\text{C}$

Run time: 15 min

ตารางที่ 1 แสดงโปรแกรมการปรับ mobile phase แบบ gradient

Flow programs

No.	Time	Flow (uL/min)	Mobile Phase A	Mobile phase B
1		0.4	45	55
2	3.00	0.4	45	55
3	6.50	0.4	20	80
4	10.00	0.4	20	80
5	11.00	0.4	45	55
6	15.00	0.4	45	55

ตารางที่ 2 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา Aflatoxins ทั้ง 4 ชนิด

Mass Spectrometer conditions

Mode: MRM (Positive)

ID	Q1	Q3	RT	DP	EP	CE	CXP
AFB1_1	313.0	269.0	5.87	86	6.20	41.92	17.48
AFB1_2	313.0	214.0	5.87	86	6.20	48.00	20.44
AFB2_1	315.0	259.0	5.21	91	5.07	38.26	18.15
AFB2_2	315.0	287.0	5.21	91	5.07	51.03	17.67
AFG1_1	329.0	243.0	4.43	86	7.77	36.69	21.82
AFG1_2	329.0	200.2	4.43	86	7.77	53.44	11.13
AFG2_1	331.1	245.1	3.89	111	3.87	40.56	21.10
AFG2_2	331.1	189.0	3.89	111	3.87	55.61	13.11

6.3 การตรวจสอบ Chromatogram และ Retention time

ทำการนิยามมาตรฐานเพื่อดู chromatogram และ retention time ที่ถูกต้อง

6.4 การสร้าง Standard Calibration Curve

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125 – 20.0 ng/mL (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0) ดัง ตารางที่ 3 โดยใช้ 1 mM CH₃COONH₄ with 0.5% CH₃COOH in 40% MeOH เป็นตัวทำละลาย และนำไปสร้างเป็น Calibration curve โดยเมื่อคำนวณค่า $r^2 \geq 0.995$ จึงจะถือว่ายอมรับได้

6.5 ทดสอบหา %recovery

ทำการ spike สารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxins ทั้ง 4 ชนิด ลงในตัวอย่างข้าวโพด ในระดับความเข้มข้น 2 ng/mL สำหรับ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ 5 ng/mL สำหรับ Aflatoxin G₂ เพื่อทดสอบหา %recovery ซึ่งต้องอยู่ในเกณฑ์ 80 – 120% จึงจะสามารถยอมรับได้

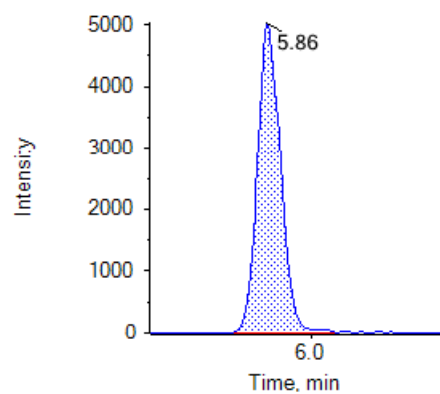
ตารางที่ 3 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารพิษจากเชื้อรา Aflatoxins

Compounds	Concentration ranges (ng/mL)
Aflatoxin B ₁	0.125 - 10 (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0)
Aflatoxin B ₂	0.125 - 10 (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0)
Aflatoxin G ₁	0.125 - 10 (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0)
Aflatoxin G ₂	0.25 - 20 (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0)

7. ผลการทดลอง

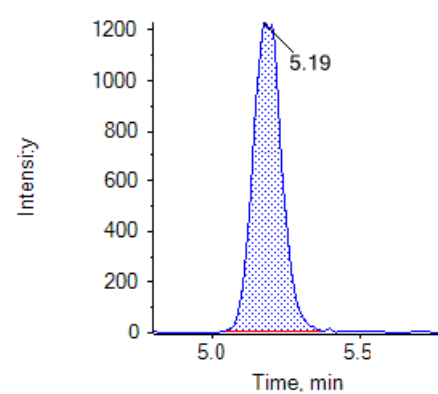
7.1 Chromatogram และ Retention time

ทำการทดสอบการฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ng/mL สำหรับ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ ส่วน Aflatoxin G₂ จะฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ng/mL โดยได้ผลการทดสอบรูปร่างของพีค และ RT ดัง ภาพที่ 2



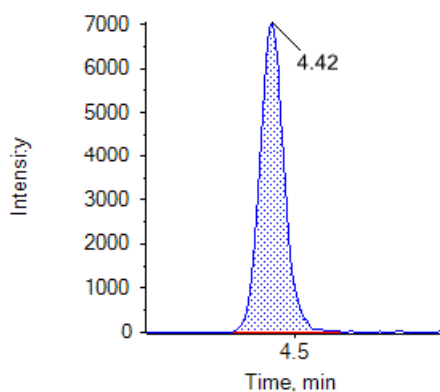
(System Suit_1)

Aflatoxin B₁ RT 5.86



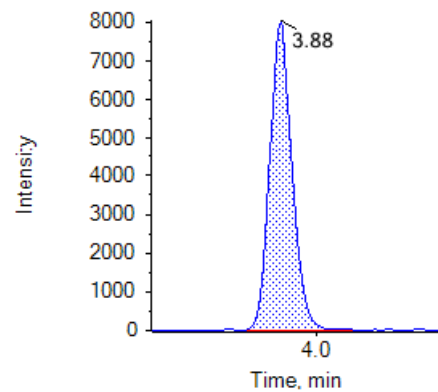
(System Suit_1)

Aflatoxin B₂ RT 5.19



(System Suit_1)

Aflatoxin G₁ RT 4.42



(System Suit_1)

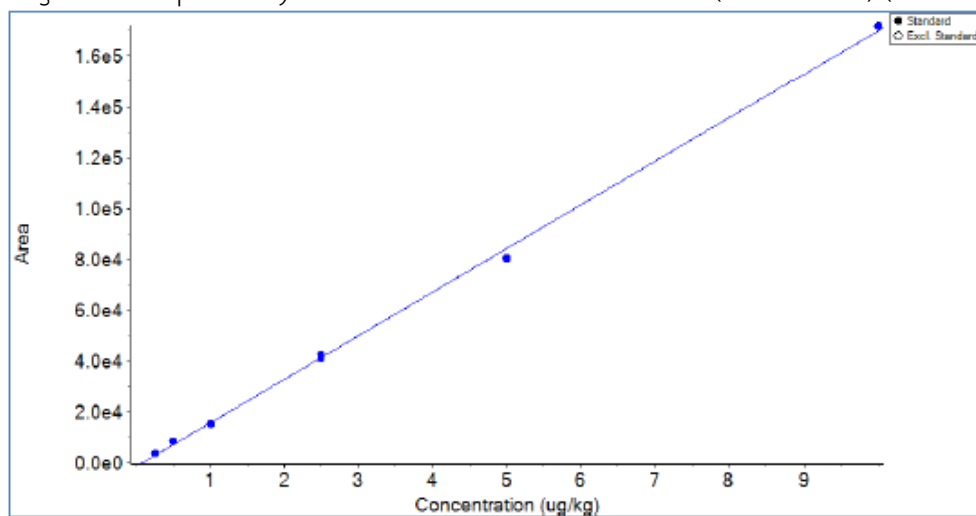
Aflatoxin G₂ RT 3.88

ภาพที่ 2 แสดง Chromatogram และ Retention time ของสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxins

7.2 การทดสอบสร้าง Calibration curve

Aflatoxin B₁

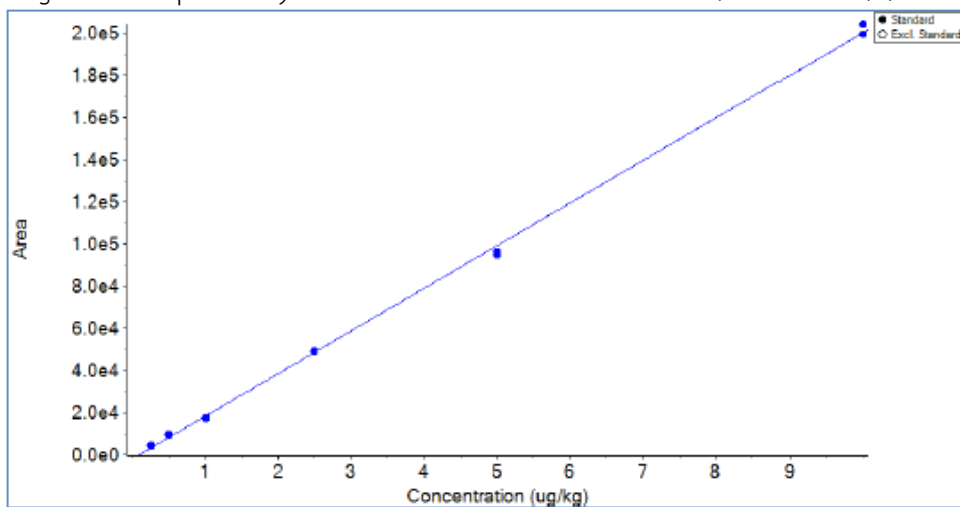
Regression Equation: $y = 17119.54910x + -1290.92627$ ($r = 0.99950$) ($r^2 = 0.99900$)



ภาพที่ 3 แสดงกราฟเส้นตรงของ Aflatoxin B₁

Aflatoxin B₂

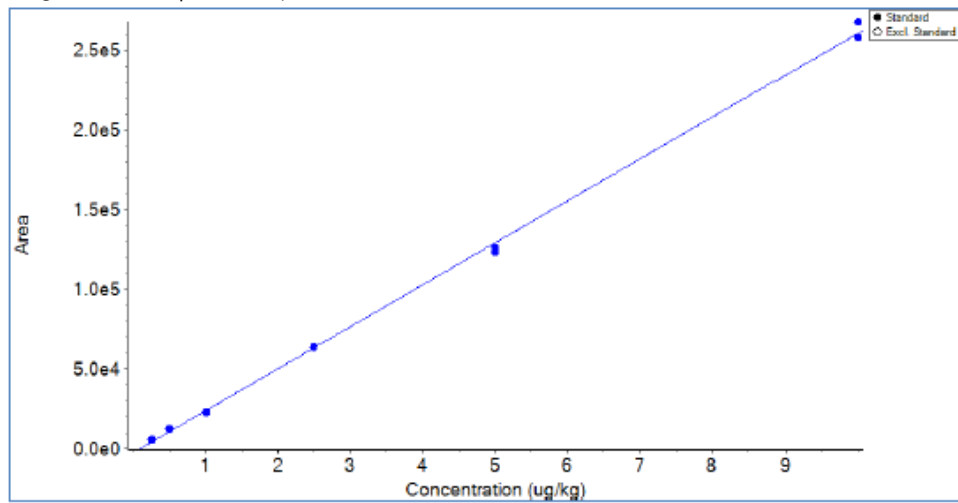
Regression Equation: $y = 20201.39755x + -1809.61092$ ($r = 0.99953$) ($r^2 = 0.99906$)



ภาพที่ 4 แสดงกราฟเส้นตรงของ Aflatoxin B₂

Aflatoxin G₁

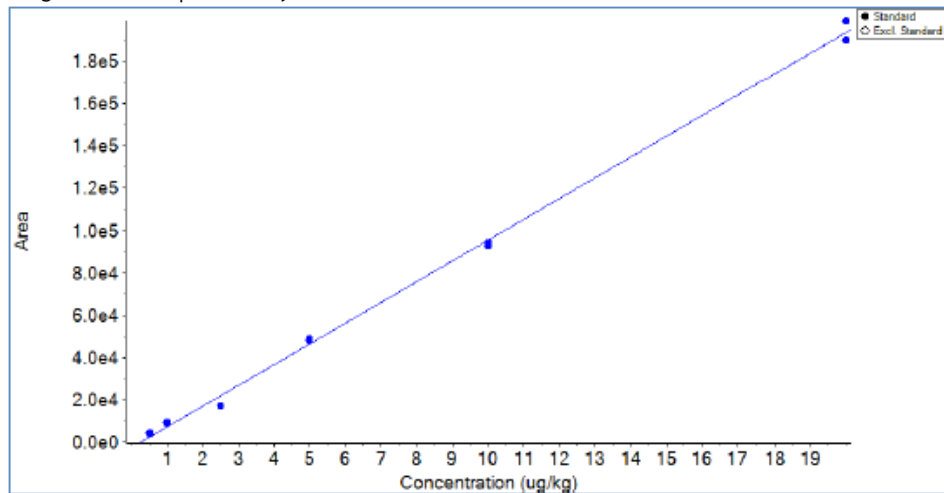
Regression Equation: $y = 26291.39889x + -2282.42901$ ($r = 0.99941$) ($r^2 = 0.99882$)



ภาพที่ 5 แสดงกราฟเส้นตรงของ Aflatoxin G₁

Aflatoxin G₂

Regression Equation: $y = 9792.12637x + -2457.02472$ ($r = 0.99884$) ($r^2 = 0.99768$)



ภาพที่ 6 แสดงกราฟเส้นตรงของ Aflatoxin G₂

จากการทดสอบสร้าง calibration curve โดยใช้ค่าที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.125 - 20.0 ng/mL รวมทั้งสิ้น 7 จุด พบว่าค่า r^2 ของทุกชนิดมีค่ามากกว่า 0.995 จึงทำให้สามารถนำไปใช้เป็น calibration curve ได้

7.2 การทดสอบ %recovery

ตารางที่ 4 แสดงผลวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมของ Aflatoxin B₁

Results Table											
Sample Name	Sample Type	Component Name	RT (min)	Cal. Conc. (ug/kg)	Peak Area (cps)	IS Area (cps)	Area Ratio	SN Ratio	Accuracy (%)	MRM Ratio	MRM Ratio (Pass/ Fail)
SP_2 ppb DLD Prep	Unknown	AFB1_1	5.9	2.0922	16618.2	N/A	N/A	805.5	N/A	-	
		AFB1_2	-	-	11063.5	-	N/A	498.5		0.666	Pass
Sample Blank DLD Prep	Unknown	AFB1_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	
		AFB1_2	-	-	N/A	-	N/A	N/A		0.000	Fail

ตารางที่ 5 แสดงผลวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมของ Aflatoxin B₂

Results Table											
Sample Name	Sample Type	Component Name	RT (min)	Cal. Conc. (ug/kg)	Peak Area (cps)	IS Area (cps)	Area Ratio	SN Ratio	Accuracy (%)	MRM Ratio	MRM Ratio (Pass/ Fail)
SP_2 ppb DLD Prep	Unknown	AFB2_1	5.2	2.3205	21629.5	N/A	N/A	946.6	N/A	-	
		AFB2_2	-	-	3622.8	-	N/A	847.8		0.167	Pass
Sample Blank DLD Prep	Unknown	AFB2_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	
		AFB2_2	-	-	N/A	-	N/A	N/A		0.000	Fail

ตารางที่ 6 แสดงผลวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมของ Aflatoxin G₁

Results Table											
Sample Name	Sample Type	Component Name	RT (min)	Cal. Conc. (ug/kg)	Peak Area (cps)	IS Area (cps)	Area Ratio	SN Ratio	Accuracy (%)	MRM Ratio	MRM Ratio (Pass/ Fail)
SP_2 ppb DLD Prep	Unknown	AFG1_1	4.4	2.1874	26472.3	N/A	N/A	1135.1	N/A	-	
		AFG1_2	-	-	15628.9	-	N/A	920.7		0.590	Pass
Sample Blank DLD Prep	Unknown	AFG1_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	
		AFG1_2	-	-	N/A	-	N/A	N/A		0.000	Fail

ตารางที่ 7 แสดงผลวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมของ Aflatoxin G₂

Results Table											
Sample Name	Sample Type	Component Name	RT (min)	Cal. Conc. (ug/kg)	Peak Area (cps)	IS Area (cps)	Area Ratio	SN Ratio	Accuracy (%)	MRM Ratio	MRM Ratio (Pass/ Fail)
SP_5 ppb DLD Prep	Unknown	AFG2_1	3.9	4.7151	20628.6	N/A	N/A	1235.9	N/A	-	
		AFG2_2	-	-	17930.4	-	N/A	786.8		0.859	Pass
Sample Blank DLD Prep	Unknown	AFG2_1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	
		AFG2_2	-	-	N/A	-	N/A	N/A		0.000	Fail

จากการทดสอบหา %recovery ด้วยการเติมสารมาตรฐาน Aflatoxins ลงไปในตัวอย่างข้าวโพดที่ระดับความเข้มข้น 2 ng/mL สำหรับ Aflatoxin B₁, B₂, G₁ และ 5 ng/mL สำหรับ Aflatoxin G₂ พบว่าได้ค่าดังนี้ Aflatoxin B₁ 2.0922 ng/mL (104.61%), Aflatoxin B₂ 2.3205 ng/mL (116.02%), Aflatoxin G₁ 2.1874 ng/mL (109.37%) และ Aflatoxin G₂ 4.7151 ng/mL (94.30%) ซึ่งทั้งหมด %recovery อยู่ในเกณฑ์ 80 – 120%

8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสร้าง calibration curve ภายใต้สภาวะระบบเครื่อง LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นนั้น โดยการฉีดสารมาตรฐาน Aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.125 - 20.0 (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0) ng/mL ได้ค่า r^2 มากกว่า 0.995 ทุกชนิด สามารถนำไปใช้เป็น calibration curve ได้

การทดสอบหา %recovery ด้วยการเติมสารมาตรฐาน Aflatoxins ลงไปในตัวอย่างข้าวโพดที่ระดับความเข้มข้น 2 ng/mL สำหรับ Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 และ 5 ng/mL สำหรับ Aflatoxin G_2 พบว่าได้ %recovery ของ Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 คือ Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 และ G_2 ได้แก่ 104.61%, 116.02%, 109.37% and 94.30% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 80 – 120%

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxins ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS ครั้งนี้ ได้ผลการทดสอบที่เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดทุกอย่าง สามารถนำไปใช้ทำสอบ Aflatoxins ในข้าวโพดได้เป็นอย่างดี และเพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจในผลการทดสอบ ควรจะมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) วิธีนี้ด้วย

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC (2016). Appendix K: Part I: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. VICAM. AflaTest HPLC, Instruction Manual. 2018. <https://en.m.wikipedia.org/wiki/Aflatoxin>