รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : -

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์พืชแปรรูป

กิจกรรม : กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาวิธีทดสอบด้านเคมี

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การทดลองที่ 1.1 พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอะฟลาทอกซินในสินค้าพืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Method Validation of Aflatoxin Analysis in Plant Product

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายพิศาล เอี่ยมศิริ สังกัด สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

ผู้ร่วมงาน : นางลิลลี่ พรานุสร สังกัด สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

นาอดิศร เจตนะจิตร สังกัด สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

5. บทคัดย่อ

การศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบอะฟลาทอกซิน ในเมล็ดแมงลัก ลูกเดือย และพริกแห้ง โดยอาศัยวิธีมาตรฐาน คือ การหาอะฟลาทอกซินในถั่วและข้าวโพด AOAC 993.17 (2005) ทำการพัฒนาวิธีทดสอบ สรุปว่าต้องใช้ Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่ดีที่สุด สามารถแสดงภาพถ่ายที่ชัดเจน ให้ค่าการเอาคืนกลับของสารได้ดีที่สุด ทำให้การคำนวนผลได้อย่างแม่นยำ

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

เมล็ดแมงลัก(B_1,B_2,G_1,G_2) LOD(อยู่ในช่วง 0.03-0.43) LOQ(อยู่ในช่วง 0.09-1.43)

%Recovery(อยู่ในช่วง 60-107) HORRAT(อยู่ในช่วง 0.13-0.40)

เมล็ดลูกเดือย(B_1,B_2,G_1,G_2) LOD(อยู่ในช่วง 0.10-0.39) LOQ(อยู่ในช่วง 0.33-1.32)

%Recovery(อยู่ในช่วง 63-115) HORRAT(อยู่ในช่วง 0.28-0.58)

เมล็ดพริกแห้ง(B_1,B_2,G_1,G_2) LOD(อยู่ในช่วง 0.08-0.65) LOQ(อยู่ในช่วง 0.29-2.18)

%Recovery(อยู่ในช่วง 61-103) HORRAT(อยู่ในช่วง 0.15-0.33)

ค่าต่างๆดังกล่าวข้างต้น อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ในการทดสอบหา อะฟลาทอกซินในเมล็ดแมงลัก ลูกเดือย และพริกแห้ง ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

6. คำนำ

อะฟลาทอกซินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพ หรือขบวนการเมตาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ของเชื้อรา จัดเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ หากมีการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษดังกล่าว อะฟลาทอกซิน พบในธรรมชาติ 4 ชนิด คือ บี 1 และ บี 2 เรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet) ในช่วงความยาวคลื่น 256 – 365 นาโนเมตร และ ชนิด จี1 และ จี 2 เรืองแสง สีเขียวภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet) ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน เป็นสารที่ทนค่อความร้อนสูงถึง 250 องศาเซลเซียส สร้างโดยเชื้อรากลุ่มแอสเปอร์จิลลัส เชื้อ

ราเหล่านี้เจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น เนื่องจากประเทศไทยมีสภาวะอากาศดังกล่าว คือ อุณหภูมิประมาณ 28 – 35 องศาเซลเซียส และ ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 75 – 85 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราดังกล่าวและการสร้างอะฟลาทอกซินเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มสินค้าพืช ทำให้คุณภาพของผลิตผลลดลง และส่งผลกระทบในทางลบต่อการส่งออกของประเทศไทย เช่น เมล็ดแมงลัก (Psylium) เป็นพืชล้มลุกที่จัดอยู่ในตระกูล Plantaginaceae ที่มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า Plantago psyllium มีเยื่อหุ้มเมล็ด (Husk) ซึ่งจะให้ใยอาหารหรือไฟเบอร์ ที่มีคุณสมบัติดูดซับน้ำได้ถึง 25 เท่าของน้ำหนักตัวเอง และเมื่อดูดซับน้ำไว้แล้วจะมีลักษณะเป็นเยื่อเมือกลื่นที่เรียกว่า Mucillage และส่วนนี้เองที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และโภชนาการอย่างกว้างขวางในปัจจุบันชาวญี่ปุ่นนิยมรับประทานเนื่องจากมีความเชื่อว่าเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ใช้เป็นอาหารเสริมในการลดน้ำหนักได้ เช่นเดียวกับลูกเดือยที่ถูกจัดเป็นอาหารสุขภาพซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคกันมากในประเทศญี่ปุ่น จึงมีการนำเข้าจากประเทศไทยเพิ่มขึ้น แต่มักพบปัญหาการถูกปฏิเสธสินค้าเนื่องจากพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในปริมาณที่เกินเกณฑ์มาตรฐานของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งกำหนดให้พบอะฟลาทอกซิน บี 1 ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม ดังนั้นกรมวิชาการเกษตร โดยห้องปฏิบัติการสารพิษ สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช ต้องทดสอบ กำกับดูแลและออกใบรับรองสุขอนามัยให้กับผู้ประกอบการที่ต้องการส่งออกสินค้าพืชกลุ่มดังกล่าวไปยังประเทศญี่ปุ่นตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ.2552 ในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนพิเศษ 63ง ประกาศวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2552 กำหนดให้ เมล็ดแมงลัก ลูกเดือย และพริกแห้ง เป็นพืชควบคุมเฉพาะสำหรับการส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น ต้องผ่านการตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน และวิธีทดสอบปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบเฉพาะขอบข่ายผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง เนื่องจากคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างไปจากถั่วลิสงของพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เมล็ดแมงลักที่สามารถดูดซับน้ำได้ดี ความเหนียวของแป้งในลูกเดือย และสีแดงสดของพริกแห้ง อาจส่งผลให้กระบวนการวิเคราะห์ทางเคมีที่ต้องการสกัดสารอะฟลาทอกซินที่อาจปนเปื้อนอยู่ออกมาเพื่อหาปริมาณผิดพลาดได้ จึงต้องพัฒนาวิธีทดสอบ และพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบที่ได้ว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมกับคุณสมบัติดังกล่าว

7. วิธีดำเนินการ

แผนการดำเนินงานวิจัย

- ดำเนินการสุ่มหาตัวอย่าง และทำการทดสอบโดยใช้วิธีมาตรฐาน AOAC 993.17 (2005)
- พัฒนาวิธีทดสอบเพื่อให้ได้วิธีที่ดีที่สุด
- ดำเนินการทดสอบโดยใช้วิธีที่พัฒนามาแล้ว นำผลมาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยอาศัยหลัก EURACHEM

แผนการทดลอง

- ได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนแล้ว ทำการทดสอบหาอะฟลาทอกซินโดยใช้วิธีมาตรฐาน AOAC 993.17 (2005)

วิธีการทดสอบ

- ทำการพัฒนาทดสอบเปรียบเทียบระหว่าง สารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในขั้นตอนการวิเคราะห์สารพิษด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ดังนี้

1) Chloroform : Acetone (9:1)

2) Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)

3) Benzene : Methanol : Acetic acid (90:5:5)

4) Chloroform : Acetone : Water (88:12:1.5)

อุปกรณ์

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา ได้แก่ Methanol, Acetonitrile, Diethyl ether, Chloroform, Benzene เป็นต้น

สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1 บี2 จี1 และจี2

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา ได้แก่ Fluorodensitometer, UV-visible spectrophotometer เป็นต้น

วิธีการ

1. การสุ่มเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ และทดสอบตัวอย่างตามวิธีทดสอบอะฟลาทอกซินที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสารพิษ เพื่อหาตัวอย่างที่ไม่มีสารพิษอะฟลาทอกซิน

2. ทดสอบหาปริมาณอะฟลาทอกซินตัวอย่างโดยพัฒนาจากวิธีมาตรฐาน AOAC 993.17

2.1 การทดสอบตัวอย่างโดยการสกัดอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของน้ำกับเมธานอลโดยเขย่าด้วยเครื่อง กรองส่วนสกัดที่ได้และเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ แยกไขมันออกด้วยเฮกเซนและแยกสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยคลอโรฟอร์มในขั้นตอนของ Liquid-Liquid Partition นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Solid phase extraction Column ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล

2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี1และจี1 เป็น 0.50 ug/mL และความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี2และจี2 เป็น 0.25 ug/mL

2.3 นำสารละลายที่สกัดได้ตามข้อ 2.1 และสารมาตรฐานตามข้อ 2.2 มา spot ลงแผ่น TLC และนำแผ่น TLC ไปแช่ใน Developing Tang ที่มีสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นนำแผ่น TLC มาอ่านค่าปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยเครื่อง Fluorodensitometer

2.4 ทำการเปรียบเทียบสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในขั้นตอนการวิเคราะห์สารพิษด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ดังนี้

1) Chloroform : Acetone (9:1)

2) Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)

3) Benzene : Methanol : Acetic acid (90:5:5)

4) Chloroform : Acetone : Water (88:12:1.5)

3. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน ตามวิธีที่ได้พัฒนาแล้ว เตรียมตัวอย่างเพื่อหาประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน(%Recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับความเข้นข้น ทำ 10 ซ้ำ และนำผลที่ได้มาพิสูจน์ยืนยันความใช้ได้ของวิธีตามหลักการของ EURACHEM ดังนี้

3.1 ความแม่นยำ (Accuracy) ของผลทดสอบที่ได้ โดยดูจากค่าประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน (%Recovery)

3.2 ความเที่ยง (Precision) ของผลทดสอบที่ทำ 10 ซ้ำ นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (X) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และใช้เกณฑ์การตัดสินจาก HORRAT (Horwitz’s Ratio)

3.3 ค่าปริมาณต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างได้ (LOD, Limit of Detection)

3.4 ค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานค่าได้อย่างถูกต้อง (LOQ, Limit of Quantitation)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการสารพิษ กลุ่มพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพสินค้า สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองย่อยที่ 1.1.1พัฒนาวิธีทดสอบอะฟลาทอกซินในเมล็ดแมงลัก

การทดสอบ หาประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน	เฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ทดสอบ / % Recovery			
	Chloroform : Acetone (9:1)	Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)	Benzene : Methanol : Acetic acid (90:5:5)	Chloroform : Acetone : Water (88:12:1.5)

ความเข้มข้นที่ 1	72-78	72-80	52-76	64-68
ความเข้มข้นที่ 2	66-69	71-73	50-73	70-73
ความเข้มข้นที่ 3	69-74	72-73	53-71	70-73

ผลการทดลองย่อยที่ 1.1.2พัฒนาวิธีทดสอบอะฟลาทอกซินในลูกเดือย

การทดสอบ หาประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน	เฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ทดสอบ / % Recovery			
	Chloroform : Acetone (9:1)	Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)	Benzene : Methanol : Acetic acid (90:5:5)	Chloroform : Acetone : Water (88:12:1.5)
ความเข้มข้นที่ 1	80-91	80-100	60-89	73-90
ความเข้มข้นที่ 2	71-83	76-88	54-84	73-84
ความเข้มข้นที่ 3	73-80	78-81	56-78	73-81

ผลการทดลองย่อยที่ 1.1.3พัฒนาวิธีทดสอบอะฟลาทอกซินในพริก

การทดสอบ หาประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน	เฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ทดสอบ / % Recovery			
	Chloroform : Acetone (9:1)	Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)	Benzene : Methanol : Acetic acid (90:5:5)	Chloroform : Acetone : Water (88:12:1.5)
ความเข้มข้นที่ 1	77-89	81-99	57-88	69-80
ความเข้มข้นที่ 2	69-75	74-83	52-72	68-79
ความเข้มข้นที่ 3	70-76	72-84	53-74	70-76

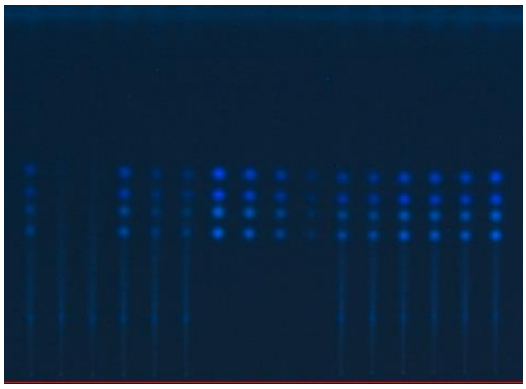
ความเข้มข้นที่ 1 B1G1 = 2 ug/Kg,B2G2 = 1 ug/Kg

ความเข้มข้นที่ 2 B1G1 = 4 ug/Kg,B2G2 = 2 ug/Kg

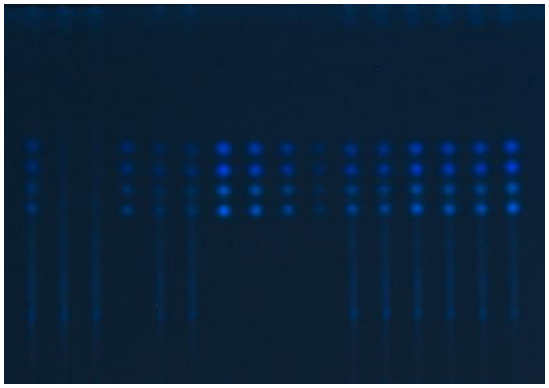
ความเข้มข้นที่ 3 B1G1 = 6 ug/Kg,B2G2 = 3 ug/Kg

แสดงภาพถ่าย ตามเฟสเคลื่อนที่ ที่แตกต่างกัน

Chloroform : Acetone : Water (88:12:1.5)

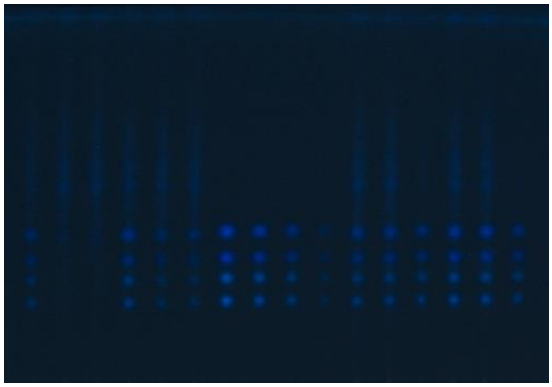


Chloroform : Acetone (9:1)



Benzene : Methanol : Acetic acid (90:5:5)

Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)



จากการทดสอบเปรียบเทียบพบว่า **Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1)** นั้นทั้งสามการทดลองสามารถแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการเอาสารคืนกลับมาได้ดีที่สุด และนอกจากนั้น ผลที่ปรากฏในรูปแบบ ของภาพถ่ายของเครื่องมือทดสอบ พบว่าภาพที่ได้นั้นไม่มีสารรบกวนมา สามารถทำให้อ่านค่าได้อย่างแม่นยำ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดแมงลัก

พารามิเตอร์	ค่าชี้วัด	เกณฑ์การยอมรับ	อะฟลาทอกซิน			
			บี1	บี2	จี1	จี2

Precision	HORRAT	≤ 2	0.25-0.40	0.20-0.23	0.13-0.25	0.20-0.28
Accuracy	%Recovery	60-115	60-107	64-86	62-77	63-84
LOD	-	-	0.43 μg/kg	0.03 μg/kg	0.17 μg/kg	0.06 μg/kg
LOQ	-	-	1.43 μg/kg	0.09 μg/kg	0.58 μg/kg	0.20 μg/kg

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในลูกเดือย

พารามิเตอร์	ค่าชี้วัด	เกณฑ์การยอมรับ	อะฟลาทอกซิน			
			บี1	บี2	จี1	จี2
Precision	HORRAT	≤ 2	0.30-0.43	0.57-0.58	0.28-0.55	0.41-0.55
Accuracy	%Recovery	60-115	82-111	70-106	63-108	73-115
LOD	-	-	0.11 μg/kg	0.10 μg/kg	0.40 μg/kg	0.17 μg/kg
LOQ	-	-	0.36 μg/kg	0.33 μg/kg	1.32 μg/kg	0.58 μg/kg

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

พารามิเตอร์	ค่าชี้วัด	เกณฑ์การยอมรับ	อะฟลาทอกซิน			
			บี1	บี2	จี1	จี2
Precision	HORRAT	≤ 2	0.18-0.27	0.15-0.22	0.16-0.45	0.22-0.33

Accuracy	%Recovery	60-115	61-90	65-94	63-103	68-95
LOD	-	-	0.43 μg/kg	0.09 μg/kg	0.65 μg/kg	0.08 μg/kg
LOQ	-	-	1.44 μg/kg	0.31 μg/kg	2.18 μg/kg	0.29 μg/kg

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ อะฟลาทอกซินใน เมล็ดแมงลัก ลูกเดือย และพริกแห้ง ทำการพัฒนาจาก วิธีมาตรฐาน AOAC 993.17 พบว่าใช้ Diethyl Ether : Methanol : Water (96:3:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด ได้ผลการคำนวนที่ถูกต้องและแม่นยำ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ โดยอาศัยหลัก EURACHEM ผลที่ได้ Precision,Accuracy,LOD,LOQ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตามหลักสากล สรุปว่าวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ อะฟลาทอกซินใน เมล็ดแมงลัก ลูกเดือย และพริกแห้ง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ได้วิธีที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ
- ห้องปฏิบัติการได้คู่มือวิธีทดสอบ
- เป็นการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการสู่การได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางลิลลี่ พรานุสร นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ หัวหน้าห้องปฏิบัติการสารพิษ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความเรียบร้อย และ นางสาวรัชนี ทวีผล นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ นางสาวเพราพิลาส ขวาสระแก้ว นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ นายอดิศร เจตนะจิตร วิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ นายทวีศักดิ์ ทองงามดี นักวิทยาศาสตร์ และนางรัชนี ศรีภูมิ พนักงานประจำห้องทดลอง กลุ่มพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพสินค้า สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช สำหรับความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. ๒๕๕๒. ประกาศ ณ วันที่ ๒๓ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๒ โดยนายธีระ วงศ์สมุทร รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม ๑๒๖ ตอนพิเศษ ๖๓ ง หน้า ๕๔. ๒๙ เมษายน ๒๕๕๒

Michael E.Stack.1998.Thin-Layer Chromatography(TLC)Analysis. for Aflatoxin Analysis.

AOAC International 2005. Official Method of Analysis of AOAC International.18thEdition Chapter 49 Natural Toxin.

Stanley Nesheim and Mary W. Trucksess. 1986. Thin-Layer Chromatography/High-Performance Thin-Layer Chromatography as a Tool for Mycotoxin Determination. Academic Press, New York. P. 240-260

13. ภาคผนวก

การตรวจสอบ Precision

1 ศึกษา Precision

1.1 นำตัวอย่าง มาบดละเอียดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.2 ชั่งตัวอย่างซ้ำละ 50 กรัม โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ชุด

- Sample Blank จำนวน 10 ซ้ำ
- Spiked Sample 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ10 ซ้ำ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 : ระดับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินที่เติมในตัวอย่าง

ชนิดอะฟลาทอกซิน	ระดับความเข้มข้นที่เติมในตัวอย่าง (μg/kg)		
	ระดับที่ 1	ระดับที่ 2	ระดับที่ 3
บี1	2	4	6
บี2	1	2	3
จี1	2	4	6
จี2	1	2	3

โดยการเติม Spiking Standard Solution (ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี1และจี1 เป็น 2.0 μg/mL และความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี2และจี2 เป็น 1.0 μg/mL) ลงในตัวอย่างปริมาตร 50,100 และ 150 ไมโครลิตร ตามลำดับ

1.3 ทดสอบตัวอย่างตามวิธีทดสอบที่ได้ทำการพัฒนามาแล้ว

1.4 คำนวณค่าความเข้มข้นในตัวอย่างทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ($\overline{X}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และคำนวณค่า Horwitz's ratio (HORRAT) แล้วประเมินค่าที่ได้ตามเกณฑ์การยอมรับ

การคำนวณ HORRAT (Horwitz's Ratio)

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\text{RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

เมื่อ

$$\%\ \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\overline{X}} \times 100$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

โดย C = concentration ratio ของค่าเฉลี่ยปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบใน Spiked Sample

การตรวจสอบ Accuracy

1.ศึกษาประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน (%Recovery)

2.คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ($\overline{X}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ %Recovery แล้วประเมินค่าที่ได้ตามเกณฑ์การยอมรับ

ประสิทธิภาพการเอาสารกลับคืน (%Recovery)

$$\%\text{Recovery} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_0}$$

เมื่อ C_1 = ปริมาณอะฟลาทอกซินใน Spiked Sample (ng/g หรือ μg/kg)

C_2 = ปริมาณอะฟลาทอกซินใน Sample Blank (ng/g หรือ μg/kg)

C_0 = ปริมาณอะฟลาทอกซินของสารมาตรฐานที่เติมลงไป (ng/g หรือ μg/kg)

ศึกษา Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

1.ทำเช่นเดียวกันกับการเอาสารกลับคืน (%Recoveryและคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ($\overline{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของผลการทดสอบแต่ละความเข้มข้น

2.สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (แกนX) กับค่า SD (แกนY)

3.หาค่า S_0 หรือจุดตัดแกน Y จากสมการเส้นตรง

4.คำนวณค่า LOD และ LOQ

Limit of Detection (LOD)

$$LOD = 3S_0$$

Limit of Quantitation (LOQ)

$$LOQ = 10S_0$$