

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โอคราทอกซิน เอ  
ในธัญพืชด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography - High Resolution  
Mass Spectrometry  
Development and Method Validation of Ochratoxin A Analysis in Cereals  
using High Performance Liquid Chromatography - High Resolution  
Mass Spectrometry

จิตาภรณ์ รัตริน<sup>1/</sup> อติศร เจตนะจิตร<sup>1/</sup> รัชณี รักษ์สัตยานันท์<sup>1/</sup>

กนกวรรณ พลฉิม<sup>1/</sup> ทวีศักดิ์ ทองงามดี<sup>1/</sup>

Thitaporn Rutrin<sup>1/</sup> Adisorn Jettanajit<sup>1/</sup> Ratchanee Ragsattayan<sup>1/</sup>

Kanokwan Ponchim<sup>1/</sup> Taweesak Tongngamdee<sup>1/</sup>

Received 11 Oct 2019/Revised 19 Jan 2020/Accepted 13 Mar 2020

---

## ABSTRACT

The objective of this study was to develop an analytical method for ochratoxin A in cereals, modified from AOAC official method 2000.03 using high performance liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). The ion polarity (negative and positive mode) and the different ratios between 0.1% formic acid in water (v/v) and acetonitrile in mobile phase at 20:80, 30:70 and 40:60 were studied. We found that optimal conditions for ochratoxin A analysis using HPLC-HRMS were negative mode for ion polarity and 0.1% formic acid in water – acetonitrile ratio of 30: 70 as HPLC mobile phase. The method was then validated to ensure that it would deliver reliable results. The validation results demonstrated that the working range, limit of detection and limit of quantitation were 0.50 – 20 µg/kg, 0.20 µg/kg and 0.50 µg/kg, respectively. Moreover, the accuracy and precision of the method are within acceptance criteria. (%Recovery 72.54 - 116.60, %RSD 13.10 - 13.69). All results demonstrated that the developed method could detect the presence of ochratoxin A in cereals at the level below permitted levels of the importing countries' regulation. The method is accredited ISO/IEC 17025 by Bureau of Laboratory Standards, Department of Medical Sciences. and is being used as a standard method for ochratoxin A analysis in cereal at laboratory of Plant Standard and Certification Division, Department of Agriculture.

**Keywords:** cereal, HPLC-HRMS, method validation, Ochratoxin A, wheat

---

<sup>1/</sup> กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช, กรมวิชาการเกษตร, 50 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

<sup>1/</sup> Plant Standard and Certification Division, Department of Agriculture, 50 Phaholyothin Road, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

\* Corresponding author: rutrin@hotmail.com

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC (2016) 2000.03 โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry (HPLC-HRMS) ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วย HPLC-HRMS คือ โหมดไอออน (ไอออนบวกและไอออนลบ) และอัตราส่วนคงที่ของเฟสเคลื่อนที่ระหว่าง 0.1% formic acid in water (v/v) และ acetonitrile (20:80, 30:70 และ 40:60) จากการศึกษาพบว่า การใช้โหมดไอออนลบ และอัตราส่วนคงที่ระหว่าง 0.1% formic acid in water (v/v) และ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วน 30: 70 เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ จากนั้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือพบว่า ช่วงการใช้งานของการวิเคราะห์ (Working Range) อยู่ในช่วง 0.50 – 20 ไมโครกรัม/กก. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation) มีค่าเท่ากับ 0.20 และ 0.50 ไมโครกรัม/กก. ตามลำดับ ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงตรง (Precision) ของปริมาณที่วิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (%Recovery 72.54 - 116.60, %RSD 13.10-13.69) ดังนั้นสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืชได้โดยมีความแม่นยำในระดับที่ต่ำกว่าขีดกำหนดของมาตรฐานของประเทศผู้นำเข้า ปัจจุบันวิธีดังกล่าวได้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการกองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

กรมวิชาการเกษตร และได้รับการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

**คำสำคัญ :** ธัญพืช, HPLC-HRMS, การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี, โอคราทอกซิน เอ, ข้าวสาลี

## บทนำ

โอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) เป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมขั้นทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* มีสายพันธุ์หลักที่สร้างสารพิษนี้ คือ *Aspergillus ochraceus* *A. carbonarius* *A. niger* และ *Penicillium verrucosum* (WHO, 2008) เนื่องจากโอคราทอกซิน เอ เป็นสารที่ทำให้เกิดพิษต่อไตและตับทั้งในคนและสัตว์ และเป็นพิษต่อระบบอื่น ๆ ในร่างกายด้วย เช่น ระบบประสาท ระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นสารก่อมะเร็งในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น (JECFA, 2008) โอคราทอกซิน เอ ได้ถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B (IARC, 1993) โดย International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้แบ่งสารก่อมะเร็งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 (Carcinogenic to humans) กลุ่ม 2A (Probably carcinogenic to humans) กลุ่ม 2B (Possibly carcinogenic to humans) และ กลุ่ม 3 (Not classifiable as to its carcinogenicity to humans) (IARC, 2020)

สารโอคราทอกซินที่มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เกษตรส่วนใหญ่คือ สารโอคราทอกซิน เอ พบมากในข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าว ถั่วชนิดต่าง ๆ เมล็ดกาแฟ โกโก้ เครื่องเทศ เปียร์ น้ำองุ่น

ไวน์ น้ำผลไม้ และผลไม้อบแห้ง เป็นต้น ในประเทศไทย มีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลไม้อบแห้งที่นำเข้าจากต่างประเทศด้วย (สุพีและคณะ, 2557) การปนเปื้อนของสารพิษสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ก่อนและภายหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตยังมีความชื้นสูงจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมให้เชื้อราที่ปนเปื้อนเจริญและสร้างสารพิษขึ้น (Lund and Frisvad, 2003) เนื่องจากสารโอคราทอกซิน เอ มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้น หน่วยงานที่กำกับดูแลในหลายประเทศ จึงกำหนดปริมาณสูงสุดของโอคราทอกซิน เอ ที่อนุญาตให้ปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ในธัญพืช โดย Codex Alimentarius ได้กำหนดมาตรฐานปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ สูงสุดที่สามารถพบได้ในข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/กก. (Codex Alimentarius, 2018) และสหภาพยุโรปได้มีการกำหนดมาตรฐานปริมาณสูงสุดของสารโอคราทอกซิน เอ ที่สามารถพบได้ในธัญพืชที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/กก. (European Commission, 2006) ประเทศไทยมีการผลิตธัญพืชหลายชนิดเพื่อการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก พบว่า มีการส่งออกประมาณ 11 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 186 แสนล้านบาท ในปี 2561 (กรมศุลกากร, 2563) ดังนั้น เมื่อมีการส่งออกธัญพืชจึงต้องมีการตรวจสอบปริมาณโอคราทอกซิน เอ ในสินค้าชิ้น ๆ ก่อนการส่งออก หากพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซิน เอ ที่เกินมาตรฐานที่กำหนด จะทำให้สินค้าถูกทำลายหรือถูกปฏิเสธจากประเทศผู้นำเข้าได้

การวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืชมีหลายวิธี เช่น Thin-Layer Chromatography และ High Performance Liquid Chromatography-

Fluorescence Detector (HPLC-FLD) เป็นต้น (Latimer, 2016) และการใช้ High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass spectrometry (HPLC-HRMS) ก็เป็นเทคนิคหนึ่งที่ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น (Soleimany *et al.*, 2012) นอกจากนี้ การนำวิธีวิเคราะห์มาใช้ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีนั้น ๆ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสม (Magnusson and rneemark, 2014.) โดยกำหนดคุณลักษณะที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีประกอบด้วย ความจำเพาะ (Specicity) เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์มีความสามารถในการวัดปริมาณสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง โดยไม่เกิดการรบกวนจากสารเจือปนอื่น ๆ ในช่วงการใช้งาน (Working Range) ที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัด รวมถึงขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) ซึ่งเป็นปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) หมายถึงปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และสามารถรายงานปริมาณได้โดยมีความแม่นยำ ความเที่ยงตรง และค่าความไม่แน่นอนอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ความแม่นยำ (Accuracy) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงของผลการทดสอบกับค่าจริง และความเที่ยงตรง (Precision) เป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบที่ได้จากการทดสอบหลาย ๆ ครั้ง โดยแสดงผลเป็นค่าความแปรปรวนที่ได้จากการวัด ที่ผ่านมาทางห้องปฏิบัติการจะใช้วิธีการ HPLC-FLD ในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช แต่พบว่าใช้ระยะเวลาการวิเคราะห์มากกว่า และความจำเพาะเจาะจงต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์โอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC (2016) 2000.03 โดยใช้เครื่อง HPLC-HRMS แทนเครื่อง HPLC-FLD และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นี้ให้มีความเหมาะสมสอดคล้องกับมาตรฐานของประเทศผู้นำเข้า และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในวิธีวิเคราะห์โอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซิน เอ โดยเครื่อง HPLC-HRMS

#### 1.1 HPLC-HRMS condition

การวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS (HPLC รุ่น Ultimate-3000 จากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด) และ Mass spectrometry (รุ่น maXis II จากบริษัท Bruker จำกัด) ใช้ชนิด detector เป็น Mass spectrometer: Electrospray ionization (ESI) / Time-of-Flight mass analyzer (TOF) โดยใช้คอลัมน์ HPLC รุ่น Acclaim™ RSLC 120 C18 ยาว 100 มม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มม. ขนาด 2.2 ไมครอน (บริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด) ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร

#### 1.2 โหมดไอออน (Ion polarity)

ศึกษาโหมดไอออนบวก และโหมดไอออนลบ โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร (Supelco, USA) จำนวน 2 ซ้ำ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS แปรโหมดไอออนของเครื่อง HPLC-HRMS คือ ไอออนบวก และไอออนลบ โดยกำหนดชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (0.1% formic

acid in water (v/v) : acetonitrile อัตราส่วน 20:80 และ water : acetonitrile อัตราส่วน 20 : 80) และชนิดของ Reconstitution solvent (methanol และ methanol : water (1:1)) จากนั้นเปรียบเทียบอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, s/n) และเลือกใช้โหมดไอออน ที่มีค่า s/n สูงที่สุด

### 1.3 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร ใน methanol ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS จำนวน 2 ซ้ำ โดยใช้โหมดไอออนจากผลการทดลองในข้อ 1.2.1 โดยแปรอัตราส่วน acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 0.1% formic acid in water (v/v) : acetonitrile เป็น 20 : 80, 30 : 70 และ 40 : 60 และเลือกใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า s/n สูงที่สุด สำหรับการทดลองต่อไป

### 2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช

เตรียมตัวอย่างธัญพืชอ้างอิงตาม AOAC (2016) 2000.03 โดยชั่งตัวอย่างธัญพืชบดละเอียด 50 กรัม เติมสารละลาย acetonitrile-water (6 : 4, v/v) ปริมาตร 100 มล. ลงใน erlenmeyer flask แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า flask ชนิด wrist action shaker เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และบีบอัดสารละลายที่กรองได้ 10 มล. ใส่ลงใน erlenmeyer flask เติมสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 40 มล. (Vicom, USA) เขย่าให้เข้ากันหากสารละลายที่กรองได้มีลักษณะขุ่นให้กรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองใยแก้ว นำส่วนที่กรองได้ไปกำจัดสารรบกวนด้วย immunoaffinity

column (IAC) (Vicam, USA) โดยใช้สารละลาย ที่สกัดปริมาตร 10 มล. ผ่าน IAC ที่อัตราการไหล 6 มล./นาที ล้าง IAC ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 10 มล. และน้ำ DI ปริมาตร 10 มล. อัตราการไหล 6 มล./นาที จากนั้นทำให้ column แห้ง โดยใช้แรงดันจากปั๊ม หรืออัดอากาศผ่าน syringe

จากนั้น ทำการชะสารโอคราทอกซิน ออกจาก IAC โดยใช้ methanol ปริมาตร 1 มล. จำนวน 4 ครั้ง ใส่ในขวดสีชาขนาด 8 มล. นำสาร ที่ได้ไประเหยจนแห้งภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ละลายส่วนที่เหลือด้วยสารละลาย acetonitrile-water (1:1, v/v) ปริมาตร 1 มล. เขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที กรองผ่าน syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ใส่ HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะของเครื่อง HPLC-HRMS จากผลการทดลองในข้อ 1

### 3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร โอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช

#### 3.1 ความจำเพาะ (Specificity)

ตรวจสอบความจำเพาะต่อการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.50 ไมโครกรัม/ลิตร กับสารสกัด ที่ไม่เติมตัวอย่าง (reagent blank) และสารสกัด ตัวอย่างข้าว ข้าวญี่ปุ่น ข้าวบาสมาดิ ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต และข้าวสาลี ที่ไม่พบสารโอคราทอกซิน เอ (sample blank) วิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยใช้เครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะที่เหมาะสม จากการทดลองในข้อ 1 เกณฑ์การยอมรับ คือค่า พื้นที่ใต้พีกของ reagent blank และ sample blank มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 30 ของพื้นที่ใต้ พีกของสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ

ที่ระดับ LOQ (0.50 ไมโครกรัม/ลิตร) (European Commission, 2017)

#### 3.2 ช่วงการใช้งานของการวิเคราะห์ (Working range)

3.2.1 ช่วงการใช้งานของเครื่องมือ (Instrument working range) โดยนำสารละลาย มาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม/ลิตร มาวิเคราะห์ โอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1) ความเข้มข้นจะ 3 ซ้ำ จากนั้น สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเข้มข้น (แกน X) และค่าพื้นที่ใต้พีก (แกน Y) และพิจารณาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) มีเกณฑ์การยอมรับ คือ  $r \geq 0.995$

3.2.2 ช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (Method working range) ใช้ข้าวสาลีเป็น ตัวอย่างในการวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐาน โอคราทอกซิน เอ ในข้าวสาลีให้มีความเข้มข้นของ สารในตัวอย่าง เป็น 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม/กก. จากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อการ วิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช แล้ว วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะ ที่เหมาะสม (จากข้อ 1) โดยทำการทดลองความ เข้มข้นจะ 3 ซ้ำ จากนั้น สร้างความสัมพันธ์ เชิงเส้นระหว่างค่าความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (แกน X) และค่าความเข้มข้นที่ตรวจพบ (แกน Y) และพิจารณาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) มีเกณฑ์ การยอมรับ คือ  $r \geq 0.995$

#### 3.3. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD)

ใช้ตัวอย่างข้าวสาลีที่เติมสารมาตรฐาน โอคราทอกซิน เอ มีความเข้มข้นของสาร โอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างที่ระดับ LOD คือ 0.20 ไมโครกรัม/กก. จากนั้นเตรียมตัวอย่าง

เพื่อการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช (เช่นเดียวกับข้อ 2.) แล้ววิเคราะห์โอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1.) ทำการทดลอง จำนวน 10 ซ้ำ พิจารณา ค่า s/n ของสารโอคราทอกซิน เอ โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า s/n ของโอคราทอกซิน เอ ต้องไม่น้อยกว่า 3 (Wenzl *et al.*, 2016)

### 3.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช (เช่นเดียวกับข้อ 2) จากนั้น ทำการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1) โดยใช้ตัวอย่างข้าวสาลีที่เติมสารมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ให้มีความเข้มข้นของสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างที่ระดับ LOQ คือ 0.50 ไมโครกรัม/กก. ทำการทดลอง จำนวน 10 ซ้ำ พิจารณา ค่า s/n ของสารโอคราทอกซิน เอ โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า s/n ของสารโอคราทอกซิน เอ ต้องไม่น้อยกว่า 10 (Wenzl *et al.*, 2016) และการพิสูจน์ยืนยัน ค่า LOQ ใช้เกณฑ์ตามความเที่ยงตรงและความแม่นยำ

### 3.5 ความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการศึกษาร้อยละการกลับคืนของผลวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวสาลี โดยใช้ ตัวอย่าง ข้าวสาลีที่เติมสารมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ให้มีความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง คือ 0.50 (LOQ), 10 และ 20 ไมโครกรัม/กก. จากนั้น เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวสาลี (เช่นเดียวกับข้อ 2) จากนั้น วิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1) ทำการวิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหา ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) โดยใช้สมการ

ที่ 1 จากนั้น ประเมินค่าที่ได้ โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 60 – 120 (Latimer, 2016)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_0} \quad (1)$$

เมื่อ  $C_1$  = ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างข้าวสาลีที่เติมสารมาตรฐาน (ไมโครกรัม/กก.)

$C_2$  = ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่าง ข้าว (ไมโครกรัม/กก.)

$C_0$  = ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ของสาร มาตรฐานที่เติมลงไป (ไมโครกรัม/กก.)

### 3.6 ความเที่ยงตรง (Precision)

การหาค่าความเที่ยงตรงจะใช้ข้อมูลที่ได้ จากศึกษาความแม่นยำ (ข้อ 3.5) โดยพิจารณาผลของการทำซ้ำของตัวอย่างข้าวสาลีที่เติมสารมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ที่ทราบค่าความเข้มข้น ทั้ง 3 ระดับ จากนั้นคำนวณค่า HORRAT โดยใช้ สมการที่ 2 เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า HORRAT 1.3 (Latimer, 2016)

$$\text{HORRAT (Horwitz rotio)} = \frac{\% \text{ RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \quad (2)$$

เมื่อ

$$\text{Relative standard deviation (\% RSD)} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100$$

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

โดย C = Concentration ratio ของค่าเฉลี่ย ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่พบใน ตัวอย่างข้าวสาลีที่เติม สารมาตรฐาน

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร โอคราทอกซิน เอ โดยเครื่อง HPLC-HRMS

#### 1.1 โหมดไอออน

ผลจากการทดสอบโหมดไอออนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โอคราทอกซิน เอ โดยใช้เครื่อง HPLC-HRMS ในโหมดไอออนลบ ตั้งค่าตรวจวิเคราะห์ไอออนลบ  $[M-H]^-$  ของสารโอคราทอกซิน เอ โดยใช้ค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ ) เป็น  $402.074 \pm 0.005$  และในโหมดไอออนบวก ตั้งค่าตรวจวิเคราะห์ไอออนบวก  $[M+H]^+$  ของโอคราทอกซิน เอ โดยใช้ค่ามวลต่อประจุ เป็น  $404.089 \pm 0.005$  (Table 1) พบว่าการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในโหมดไอออนลบมีค่า  $s/n$  และพื้นที่ใต้พีกสูงกว่าการวิเคราะห์ในโหมดไอออนบวก ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vartolomi *et al.* (2014) ที่วิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในอาหารโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS

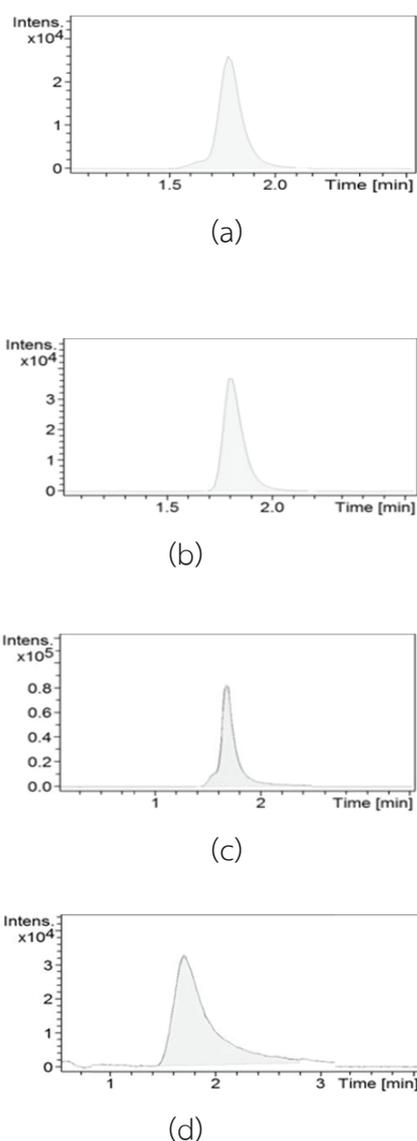
เมื่อพิจารณาค่า  $s/n$  และพื้นที่ใต้พีก

พบว่า การใช้โหมดไอออนลบในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ มีความเหมาะสมกว่าการใช้โหมดไอออนบวก เนื่องจากมีค่า  $s/n$  และพื้นที่ใต้พีกที่สูงกว่าการใช้โหมดไอออนบวก ทำให้สามารถวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ดีกว่าเมื่อพิจารณาลักษณะของพีกพบว่า การใช้โหมดไอออนบวกในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ มีลักษณะพีกของโอคราทอกซิน เอ แห่และสมมาตร ซึ่งเป็นลักษณะพีกที่ดี อีกทั้งมี Baseline ที่เรียบกว่าการใช้โหมดไอออนลบในการวิเคราะห์ (Figure 1) ซึ่งลักษณะพีกของสารโอคราทอกซิน เอ นั้น นอกจากเป็นผลจากการใช้โหมดไอออนที่ต่างกันแล้ว อาจมีปัจจัยมาจากชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้แตกต่างกันด้วย หากปรับปรุงชนิดของเฟสเคลื่อนที่ อาจทำให้ลักษณะพีกของสารโอคราทอกซิน เอ ในโหมดไอออนลบมีลักษณะที่ดีขึ้น ดังนั้น จึงเลือกโหมดไอออนลบในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยเครื่อง HPLC-HRMS ในการทดลองต่อไป

**Table 1** Signal to noise and peak area of ochratoxin A analyzed by HPLC-HRMS in negative and positive mode. ( $n = 2$ )

No.	Ion Polarity	$m/z$	Mobile phase (Ratio)	Reconstitution solvent	RT (min)	Peak area	$s/n$
1	Positive	$404.089 \pm 0.005$	0.1% formic acid in water : ACN (20:80)	MeOH	1.807	$1.977 \times 10^5$	220
2				MeOH : water (1:1)	1.785	$2.412 \times 10^5$	285
3	Negative	$402.074 \pm 0.005$	water : ACN (20:80)	MeOH	1.710	$7.347 \times 10^5$	259
4				MeOH : water (1:1)	1.686	$8.029 \times 10^5$	813

**Note:** MeOH = methanol, ACN = acetonitrile, RT= retention time,  $s/n$  = signal to noise ratio



**Figure 1** Chromatograms of ochratoxin A was analyzed by HPLC-HRMS in negative and positive mode: (a) ion polarity: mode positive and reconstitution solvent: methanol, (b) ion polarity: mode positive and reconstitution solvent: methanol-water (1:1), (c) mode negative and reconstitution solvent: methanol and (d) ion polarity: mode negative and reconstitution solvent: methanol-water (1:1)

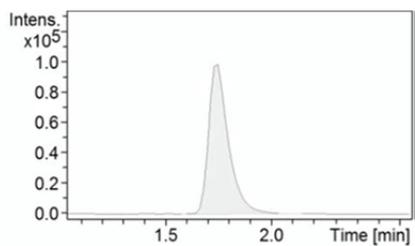
## 1.2 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยศึกษาอัตราส่วนผสมแบบคงที่ของ 0.1% formic acid in water (v/v): acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่ ใช้วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ลิตร ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ด้วยโหมดไอออนลบ พบว่า โครมาโทแกรมของสารโอคราทอกซิน เอ ของทุกภาวะ มีลักษณะของพีคของสารโอคราทอกซิน เอ สมมาตร และมี Baseline เรียบ (Figure 2) เมื่อพิจารณา Retention time ของสารโอคราทอกซิน เอ (Table 2) พบว่า เมื่อสัดส่วนของ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่น้อยลง จะทำให้ Retention time ของสารโอคราทอกซิน เอ มีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณาค่า s/n และค่าพื้นที่ใต้พีค พบว่า อัตราส่วนของ 0.1% formic acid in water (v/v): acetonitrile ที่ 30: 70 มีอัตราส่วนของ s/n และค่าพื้นที่ใต้พีคสูงที่สุด ทำให้สามารถวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ดี

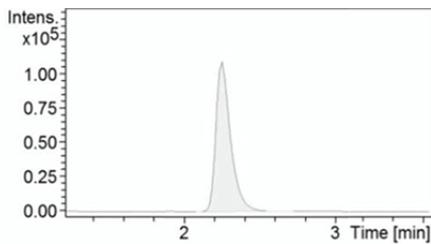
**Table 2** Peak areas and signal to noise of ochratoxin A analyzed by HPLC-HRMS in negative mode and ratio of 0.1% formic acid in water (v/v) : acetonitrile of mobile phase 20 : 80, 30 : 70 and 40 : 60 ( $n = 2$ )

No.	Ratio of 0.1% formic acid in water : ACN	RT (min)	Peak areas	s/n
1	20 : 80	1.761	$6.341 \times 10^5$	938
2	30 : 70	2.255	$7.264 \times 10^5$	1225
3	40 : 60	3.285	$6.959 \times 10^5$	1140

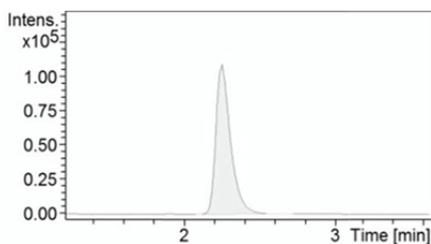
**Note:** ACN = acetonitrile, RT= retention time, s/n = signal to noise ratio



(a)



(b)



(b)

**Figure 2** Chromatograms of ochratoxin A analyzed by HPLC-HRMS in negative mode with different ratio of 0.1% formic acid in water (v/v) : acetonitrile) in mobile phase (a) 20 : 80, (b) 30 : 70, (c) 40 : 60

จากการหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ โดยเครื่อง HPLC-HRMS โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ ได้แก่ โหมดไอออน และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ คือ การใช้โหมดไอออนลบ และอัตราส่วนผสมแบบคงที่ระหว่าง 0.1% formic acid in water (v/v) และ acetonitrile ในเฟสเคลื่อนที่ คือ 30 : 70

## 2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช

### 2.1 ความจำเพาะ

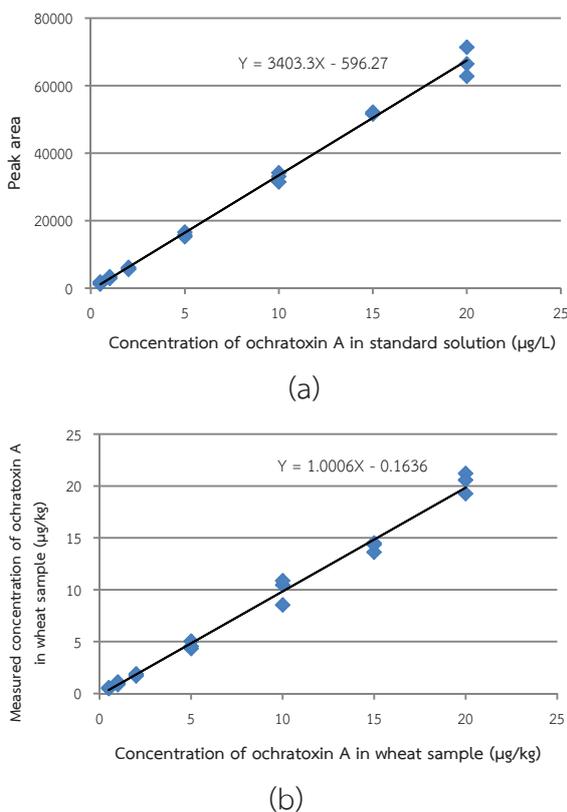
จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ 0.5 ไมโครกรัม/ลิตร โดยใช้เครื่อง HPLC-HRMS ตามภาวะที่เหมาะสม พบว่า Retention time ของสารโอคราทอกซิน เอ มีค่าเท่ากับ 2.014 นาที และพื้นที่ใต้พีกเป็น 1222.20 เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมของ reagent blank และ sample blank ของตัวอย่างข้าว ข้าวญี่ปุ่น ข้าวบาสมาดิ ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต และข้าวสาลี พบว่า ไม่พบสัญญาณของสารโอคราทอกซิน เอ ที่ Retention time  $2.0 \pm 0.1$  นาที ในทุกตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ อีกทั้งมี Baseline เรียบแสดงว่า ในตัวอย่างไม่มีสารรบกวนต่อวิธีวิเคราะห์เลย ดังนั้น สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ มีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืช จึงเลือกใช้ตัวอย่างข้าวสาลีเป็นตัวแทนธัญพืชในการตรวจสอบความใช้ได้ของคุณลักษณะอื่นต่อไป ซึ่งเป็นไปตาม commodity groups for the validation of screening methods ที่ระบุว่าสามารถใช้ข้าวสาลีเป็นตัวแทนของกลุ่มธัญพืช และผลิตภัณฑ์ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (European Commission, 2014)

### 2.2 ช่วงการใช้งานของการวิเคราะห์

2.2.1 Instrument working range การศึกษาช่วงการใช้งานของเครื่องมือในการวิเคราะห์ พบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณของสารมาตรฐานที่วัด (0.50-20 ไมโครกรัม/ลิตร) และสัญญาณที่ตรวจวัดได้ (Figure 3(a)) แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Significance  $F < \alpha = 0.05$ ) สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

คือ  $Y = 3404.33 X - 596.27$  และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) มีค่าเป็น 0.9978 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ( $r \geq 0.995$ )

2.2.2 Method working range การศึกษาช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์พบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (0.50-20 ไมโครกรัม/ลิตร) และค่าความเข้มข้นที่ตรวจพบ มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Significance  $F < \alpha = 0.05$ ) มีสมการเส้นตรงคือ  $Y = 1.0006 X - 0.1636$  และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.9960 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ( $r \geq 0.995$ ) (Figure 3(b))



**Figure 3** (a) Calibration curve of ochratoxin A at 0.50 – 20 g/L (b) Relationship between measured concentration and concentration of ochratoxin A in wheat sample at 0.50 – 20 µg/kg

### 2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ

จากการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบพบว่า ค่า s/n ของสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างข้าวสาลีที่ระดับ LOD (0.20 ไมโครกรัม/กก.) มีค่า  $170.6 \pm 66.3$  (Range: 76-304) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (s/n 3)

### 2.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

จากการศึกษาพบว่า ค่า s/n ของสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างข้าวสาลี ที่มีความเข้มข้นของสารโอคราทอกซิน เอ 0.50 ไมโครกรัม/กก. มีค่า  $136.4 \pm 47.6$  (Range: 85-238) และอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (s/n 10) จากนั้นพิจารณาถึงความแม่นยำ และความเที่ยงตรงต่อไป

### 2.5 ความแม่นยำ

จากการศึกษาความแม่นยำ พบว่า ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวสาลีที่ระดับความเข้มข้นของโอคราทอกซิน เอ 0.50, 10 และ 20 ไมโครกรัม/กก. มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 75.90 – 116.60, 72.54 – 109.84 และ 76.31 – 114.20 ตามลำดับ (Table 4) และทุกค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (%Recovery ที่ยอมรับได้ อยู่ในช่วงร้อยละ 60 – 120 )

### 2.6 ความเที่ยงตรง

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรง พบว่า ค่า HORRAT ของการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในข้าวสาลีที่ระดับความเข้มข้น 0.50, 10 และ 20 ไมโครกรัม/กก. มีความเที่ยงตรงอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (HORRAT Value  $\leq 1.3$ ) แสดงถึงความเบี่ยงเบนของข้อมูลอยู่ในเกณฑ์ที่ดี (Table 4)

**Table 4** Precision and accuracy for ochratoxin A analysis by HPLC-HRMS (n=10)

	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	0.50	10	20
Detected ochratoxin A conc. in sample ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.48 $\pm$ 0.06	9.67 $\pm$ 1.32	19.58 $\pm$ 2.58
%Recovery*	75.90-116.60	72.54-109.84	76.31-114.20
%RSD	13.10	13.69	13.17
Predicted Horwitz RSD	33.40	21.23	19.09
HORRAT Value	0.39	0.65	0.69

\*% Acceptable recovery range = 60 – 120 (Latimer, 2016)

### สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืชที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC (2016) 2000.03 โดยใช้เครื่อง HPLC-HRMS แทนเครื่อง HPLC-FLD พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง HPLC-HRMS ได้แก่ โหมดไอออนลบ และ อัตราส่วนคงที่ของเฟสเคลื่อนที่ระหว่าง 0.1% formic acid in water (v/v) และ acetonitrile คือ 30 : 70 จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ พบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์ โดยช่วงการใช้งานที่มีความเหมาะสม คือ 0.50 – 20 ไมโครกรัม/กก. มีความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง ซีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ มีค่าเท่ากับ 0.20 และ 0.50 ไมโครกรัม/กก. ตามลำดับ นอกจากนี้ การทดสอบความแม่นยำ มีร้อยละการกลับคืนของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 72.54 - 116.60% และความเที่ยงให้ผลการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดย HORRAT Value อยู่ในช่วง 0.39 - 0.69 ดังนั้น สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืชด้วยเทคนิค HPLC-HRMS ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC (2016) 2000.03 มีความถูกต้องและเหมาะสม สอดคล้องกับมาตรฐานของประเทศผู้นำเข้า ได้นำข้อมูลไปใช้ขอการรับรองในขอบข่ายวิธีวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในธัญพืชตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และปัจจุบันได้รับการรับรอง ISO/IEC 17025 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มพัฒนาระบบ ตรวจสอบคุณภาพสินค้า กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนงานวิจัยนี้สำเร็จ ล่วงด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

- กรมศุลกากร. 2563. รายงานสถิติ Type: Export HS-Code: 10 Country: All country Month: December Year: 2018. แหล่งข้อมูล: [http://www.customs.go.th/statistic\\_report.php?show\\_search=1](http://www.customs.go.th/statistic_report.php?show_search=1) สืบค้นเมื่อ: 7 มกราคม 2563.
- สุพิ วนศิริกุล เนตรา สมบูรณ์แก้ว อัจฉราพร ศรีจูดานู และอมรา ชินภูติ. 2557. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในผลไม้อบแห้งและการลดปริมาณสารพิษโดยใช้วิธีทางกายภาพ. *วารสารวิชาการเกษตร*. 32(2): 188-200.
- Codex Alimentarius. 2018. *GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED CODEX STAN 193-1995*. Amended in 2018
- European Commission. 2006. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 364: 5-24.

- European Commission. 2014. COMMISSION REGULATION (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. *Official Journal of the European Union*. 147: 29-43.
- European Commission. 2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed SANTE/11813/2017*. Implemented by 01/01/2018
- IARC. 1993. The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monographs* 56: 489–599
- IARC. 2020. IARC Monographs on the identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Available at : <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> Accessed: January 8, 2020
- JECFA. 2008. *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. TRS 947-JECFA 68/59
- Latimer, G. W. Jr. 2016. Official Method of Analysis of AOAC Page:74-76 *In: International 20<sup>th</sup> edition*. AOAC International. Chapter 49 Appendix F: 1-18
- Lund, F. and J.C. Frisvad. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1117-1123
- Magnusson, B. and U. Örnemark. 2014. *EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Method Validation and Related Topics*, Second edition. Available at: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org). Accessed : Dec 31, 2018.
- Soleimany, F., S. Jinap, A. Faridah and A. Khatib. 2012. A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. *Food Control*. 25: 647-653
- Vartolomi, A., L. Vlase, M. Cuciureanu, R. Cuciureanu and D. Popa. 2014. Determination of ochratoxin A in food by LC-MS/MS. *FARMACIA*. 62(2): 287-298
- Wenzl, T., J. Haedrich, A. Schaechtele, P. Robouch and J. Stroka. 2016. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. Available at: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_\\_mrl\\_\\_guidelines\\_\\_wrkdoc\\_\\_2017-11813.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides__mrl__guidelines__wrkdoc__2017-11813.pdf). Accessed: Dec 31, 2018
- WHO. 2008. Ochratoxin A. Safety evaluations of certain 1 food additives and contaminants. *WHO food additives series*. 59: 357-429