

# การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

## Determination of Aflatoxin B1 in Feeding stuffs without Clean-up Step by High Performance Liquid Chromatography

ศศิประภา ชูช่วย<sup>1</sup>, ประกรณ์ จาละ<sup>2</sup>, ธนภูมิ มณีบุญ<sup>3</sup>, ปารียา อุดมกุศลศรี<sup>4</sup>, ณัฐสิทธิ์ ดันสกุล<sup>4</sup>  
Sasiprapa Choochuay<sup>1</sup>, Prakorn Jala<sup>2</sup>, Thanapoom Maneeboon<sup>3</sup>, Pareeya Udomkunsri<sup>4</sup>  
Natthasit Tansakul<sup>4</sup>

Received: 30 May 2016 ; Accepted: 15 October 2016

### บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งมักปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และทำให้เกิดพิษเพื่อเป็นการเฝ้าระวังการปนเปื้อน จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยวิธีเทคนิคแคชเชอร์ (QuEChERS) ในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษา ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีเฟสอยู่กับที่ชนิด Symmetry<sup>®</sup>C18 3.9x150 mm, 5 µm และเฟสเคลื่อนที่คืออะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล และน้ำ (15:15:70 v/v/v) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ และเกลือที่มีประสิทธิภาพในการสกัดมากที่สุด คือ อะซิโตรไนไตรด์: เมทานอล (40:60 v/v) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ โซเดียมคลอไรด์ : แมกนีเซียมซัลเฟต (1:4 w/w) ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่ามีสัมประสิทธิ์การกำหนดเท่ากับ 0.999 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์แบบทวนซ้ำ (% RSD<sub>r</sub>) และทำซ้ำ (% RSD<sub>r</sub>) น้อยกว่า 5.48 และ 5.77 % ตามลำดับ และมีค่าการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 82.50–96.83% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ ส่วนค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด และค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 0.2 และ 0.3 พีพีบี ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** อะฟลาทอกซินบี 1 วัตถุดิบอาหารสัตว์ กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ เทคนิคแคชเชอร์

### Abstract

Aflatoxin B1 is a mycotoxin produced by *Aspergillus* spp. and it is a natural contaminant in animal feedstuffs which cause of mycotoxicosis. Several toxin detection methods are available. However, for the toxin monitoring, the current project was aimed to develop a rapid and low cost method for AFB1 determination in feeding stuffs based on QuEChERS method. As a result, AFB1 was separated on stationary phase (Symmetry<sup>®</sup>C18 3.9x150 mm 5 µm) with

<sup>1</sup> นิสิตปริญญาโท <sup>4</sup>รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

<sup>2</sup> นักวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม <sup>3</sup>นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ติดต่อได้ที่: ณัฐสิทธิ์ ดันสกุล ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 เบอร์โทรศัพท์: 02-5797537 โทรสาร: 02-5797537 E-mail: natthasitt@yahoo.com; fvetnst@ku.ac.th

<sup>1</sup> Graduate degree student, <sup>4</sup>Assoc. Prof., Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. <sup>2</sup>Scientist, Faculty of Veterinary medicine, Kamphaengsaen campus, Nakhon Pathom <sup>3</sup>Scientist, Kasetsart University Research and Development Institute, Bangkok.

\* Corresponding author: Natthasit Tansakul: Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, 50 Ngaam Wong Eaan Rd, Ladyao, Chatujak, Bangkok, Thailand 10900.Tel: 02-5797537 Fax: 02-5797537 E-mail natthasitt@yahoo.com; fvetnst@ku.ac.th

mobile phase consist of acetonitrile methanol and water (15:15:70 v/v/v) at flow rate 1 ml/min. The sufficient extraction solvent and salt were acetonitrile: methanol (40:60 v/v) and sodium chloride : magnesium sulfate (1:4 w/w), respectively. The linearity showed good coefficient value at 0.999 with relative standard deviation of repeatability (% RSD<sub>r</sub>) and relative standard deviation of reproducibility (% RSD<sub>R</sub>) lower than 5.48 and 5.77%. The recovery values were in the range of 82.50-96.83% which range in acceptable standardized levels. The LOD and LOQ of the method were 0.2 and 0.3 ppb, respectively.

**Keywords:** Aflatoxin B1, Feeding stuffs, Clean-up step, QuEChERS

## บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีการผลิตข้าวเพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก อีกทั้งยังมีการนำผลพลอยได้จากการแปรรูปข้าว เช่น ปลายข้าว ข้าวหัก และรำมาแปรรูปเป็นวัตถุดิบอาหารสำหรับสัตว์ เนื่องจากคุณค่าทางโภชนาการสูง ต้นทุนต่ำ โดยส่วนมากจะพบการเจริญของเชื้อรา และการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราได้น้อย อย่างไรก็ตามหากมีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวไม่เหมาะสม โดยเฉพาะผลผลิตมีความชื้นสูง รวมทั้งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นจะส่งเสริมให้เกิดการเจริญและการสร้างสารพิษจากเชื้อราได้มากขึ้น

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin; AF) เป็นสารเมทาโบไลต์ชนิดทุติยภูมิที่ส่วนมากสร้างจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* โดยตามโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติการเรืองแสงจะแบ่งเป็นอะฟลาทอกซินบี 1 (AFB1), บี 2 (AFB2), จี 1 (AFG1) และจี 2 (AFG2) ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ เกิดการตกค้างในห่วงโซ่อาหารและเกิดปัญหาการกีดกันทางการค้า<sup>2-4</sup> อย่างไรก็ตามอะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารชีวพิษที่รุนแรง โดยองค์การวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) ได้จัดให้สารพิษดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของสารก่อมะเร็ง (group 1 carcinogen) อีกทั้งยังก่อดระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ และอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในมนุษย์และสัตว์<sup>1</sup>

ในหลายประเทศจึงได้มีการกำหนดค่าการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum levels) รวมทั้งมีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตาม วิธีตรวจวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วย immunoaffinity column (IAC) ก่อนวิเคราะห์ด้วย โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง<sup>5</sup> แต่ IAC มีต้นทุนสูง ขั้นตอนยุ่งยาก และใช้เวลานาน<sup>6</sup> ปัจจุบันจึงมีการนำเอาเทคนิคแคชเชอร์ (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe; QuEChERS) ซึ่งเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างฝัก หรือผลไม้

เพื่อวิเคราะห์ยามาแมลงมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรามากขึ้น โดยการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรด์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกชั้นของสารสกัดด้วยเกลืออินทรีย์ จากนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกระจายเฟสของแข็งในตัวอย่าง (dispersive solid phase extraction; dSPE) และวิเคราะห์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี<sup>7,8</sup> ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะนำเทคนิคแคชเชอร์มาใช้พัฒนาการตรวจวัดอะฟลาทอกซินบี 1 เพื่อให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และต้นทุนต่ำในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษา

## วัตถุประสงค์

พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษาเพื่อลดต้นทุนและระยะเวลาในการวิเคราะห์

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

### สารเคมี

สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 10 mg/ml ในเมทานอล (สารมาตรฐานตั้งต้น), อะซิโตรไนไตรด์ (MeCN), เมทานอล (MeOH), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), โซเดียมอะซิเตต (CH<sub>3</sub>COONa) แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) และกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA)

### เครื่องมือ และอุปกรณ์

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ประกอบด้วย เครื่องควบคุม SCL-10AVP Shimadzu system controller, บั๊ม LC-10ADVP Shimadzu liquid chromatography และ FCV-10ALVP, เครื่องกรองก๊าซ DGU-14A Shimadzu degasser, ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ RF-10AXL Shimadzu fluorescence detector, เครื่องควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ CTV-10AVP Shimadzu column oven, เข็มฉีดยาตัวอย่าง SIL-10ADVP auto injector และเครื่องควบคุมศักย์ไฟฟ้า Automatic voltage stabilizer and line conditioner

## สภาวะโครมาโทกราฟีของเหลว

### สมรรถนะสูง

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ประกอบด้วยเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ชนิด Symmetry®C18 3.9x150 mm 5 µm ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไนไตรต์ เมทานอล และน้ำ (15:15:70 v/v/v) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยปริมาตรฉีดที่ 10 ไมโครลิตร และอะฟลาทอกซินบี 1 ถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้นและความยาวคลื่นการคาย คือ 360 และ 440 นาโนเมตร ตามลำดับ

### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

#### อะฟลาทอกซินบี 1

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 1 พีพีบี (สารมาตรฐานใช้งาน) จากสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 10 mg/ml (สารมาตรฐานตั้งต้น) ด้วยเมทานอล และเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 100 พีพีบี จากสารละลายมาตรฐานใช้งาน (1 พีพีบี) ด้วยเมทานอล ก่อนทำอนุพันธ์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก และวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### วิธีการเตรียมตัวอย่าง

ขั้นตอนการสกัด (extraction step) ใช้ตัวอย่างปลาข้าว 10 กรัม สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไนไตรต์กับเมทานอลในอัตราส่วน 40:60 v/v ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที กรณีที่ต้องการหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน จะเติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 1 พีพีบี ลงในตัวอย่าง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์เกิดการระเหย และทำให้ตัวอย่างเกิดการดูดซับสารพิษก่อนการสกัด จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งชั้น (phase partition step) ของสารสกัดด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัม เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที 5 นาที เมื่อเกิดการตกตะกอน จึงนำส่วนใส 1 มิลลิลิตร ไประเหยแห้ง และทำอนุพันธ์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก 100 ไมโครลิตร ในตัวทำละลาย 10% ของอะซิโตนไนไตรต์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และตรวจวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

## การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (validation method) วิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในปลาข้าวจะทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นภายในช่วงของการทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40 และ 100 พีพีบี และประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้กราฟ การทดสอบความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาข้าวที่ปราศจากการปนเปื้อน (sample blank) และเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นต่ำ (5 พีพีบี) จำนวน 5 ซ้ำ พิจารณาค่าการกลับคืน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์จะทดสอบกับตัวอย่างปลาข้าวที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 20, 40 และ 100 พีพีบี ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ประเมินความถูกต้องจากการคำนวณค่าการกลับคืน (% recovery) ประเมินความแม่นยำแบบการทวนซ้ำ (repeatability) และความแม่นยำแบบการทำซ้ำ (reproducibility) ในช่วงเวลา 3 วันจากการคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานสหภาพยุโรป [Commission Regulation (EC) No 401/2006] ส่วนการทดสอบค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (limit of detection; LOD) และค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาข้าวที่ปราศจากการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 10 ซ้ำ และนำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ มาหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร  $LOD = \text{ค่าเฉลี่ยของ sample blank} + 3SD$  และ  $LOQ = \text{sample blank} + 10SD$

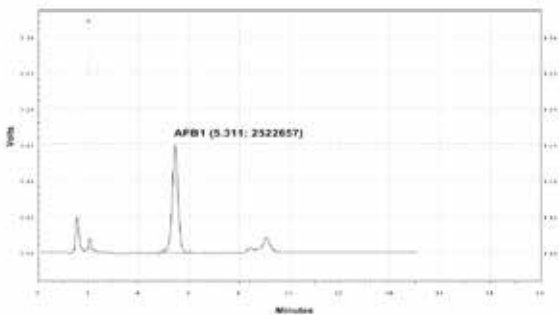
## ผลการศึกษา

### ระบบโครมาโทกราฟีสำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1

เฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่เป็นองค์ประกอบหลักในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยในการศึกษานี้จะเปรียบเทียบเฟสอยู่กับที่ 3 ชนิด ได้แก่ Inertsil C18-ODS 3 4.6x150 mm 5 µm, Symmetry®C18 4.6x150 mm 5 µm และ Symmetry®C18 3.9x150 mm 5 µm โดยในการทดลองนี้พบว่า Symmetry®C18 3.9x150 mm 5 µm เป็นชนิดที่ให้ผลสัญญาณกราฟในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1

ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีเวลาการหน่วงเหนี่ยว (retention time; t) น้อย และให้สัญญาณการตอบสนองหรือพื้นที่ใต้กราฟสูง ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่จะเปรียบเทียบกับสารละลายผสมระหว่าง เมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 50:50 v/v และอะซิโตรไนไตรด์ เมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 15:15:70 v/v/v พบว่า อัตราส่วนของสารละลายผสมอะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล กับน้ำ 15:15:70 v/v/v ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด และทำให้พีคของอะฟลาทอกซินบี 1 สามารถแยกออกจากพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ได้ดี นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบปริมาณที่ฉีดระหว่าง 10, 20 และ 50 ไมโครลิตร พบว่าปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้คือ 10 ไมโครลิตร ซึ่งได้โครมาโทแกรมในลักษณะพีครูประฆังคว่ำที่สมมาตร

อย่างไรก็ตาม อะฟลาทอกซินบี 1 มีคุณสมบัติในการเรืองแสงได้น้อยตามธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดจึงมีการพัฒนาวิธีการทำอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกก่อนการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการเปรียบเทียบผลการทำอนุพันธ์ในสารละลาย อะซิโตรไนไตรด์ที่ 10% และการใช้สารละลายผสมเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล น้ำ 15:15:70 v/v/v) ในการทำสารละลายอนุพันธ์ พบว่าการทำอนุพันธ์ในตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรด์ที่ 10% จะเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ให้ผลสัญญาณการตอบสนองทางโครมาโทกราฟีได้ดี (Figure 1)



**Figure 1** Chromatogram of blank broken rice sample spiked with 100 ppb AFB 1

**การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างปลายข้าว**  
สำหรับการเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างปลายข้าวจำนวน 10 กรัม จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วย อะซิโตรไนไตรด์กับเมทานอล (40:60 v/v) เป็นสารสกัดตัวอย่างร่วมกับเปรียบเทียบการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์หรือโซเดียมอะซิเตต 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัม โดยผลการทดลองพบว่าระหว่างอะซิโตรไนไตรด์กับเมทานอล (40:60 v/v) ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม และแมกนีเซียม

ซัลเฟต 4 กรัม จะให้สัญญาณการตอบสนองทางโครมาโทแกรมได้ดี จากนั้นจึงศึกษาสัดส่วนปริมาตรของสารสกัดที่เหมาะสมต่อตัวอย่าง 10 กรัม โดยทำการเปรียบเทียบปริมาตรสารสกัด 10 และ 20 มิลลิตร ของอะซิโตรไนไตรด์กับเมทานอล (40:60 v/v) พบว่าปริมาตรสารสกัดที่ 20 มิลลิตรต่อตัวอย่าง 10 กรัม จะให้ผลการสกัดดีกว่าการใช้สารสกัดปริมาตร 10 มิลลิตร เนื่องจากจะช่วยเจือจางสารรบกวนในตัวอย่าง และลดความเข้มข้นของสารสกัด

#### การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่าการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นภายในช่วงของการทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40 และ 100 พีพีบี ด้วยสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination;  $R^2$ ) เท่ากับ 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ( $r^2 \geq 0.995$ ) ผลการวิเคราะห์ความไวในการตรวจวัด (sensitivity) จะมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารอะฟลาทอกซินบี 1 มาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 พีพีบี จำนวน 5 ซ้ำ (relative standard deviation; RSD) เท่ากับ 4.36% และมีค่าการกลับคืนเฉลี่ย 100.8% สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์จากการทดสอบกับตัวอย่างปลายข้าวที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น คือ 20, 40 และ 100 พีพีบี ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ในระยะเวลา 3 วัน ประเมินค่าความถูกต้องจากเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (recovery) ของการวิเคราะห์ พบว่าแต่ละตัวอย่างมีค่าอยู่ที่ 79-101% โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 82.50-96.83% (Table 1) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (70-110% ตามเกณฑ์มาตรฐานสหภาพยุโรป; Commission Regulation (EC) No 401/2006) และจากการทดสอบความแม่นยำแบบการทวนซ้ำ และแบบการทำซ้ำ พบว่าอะฟลาทอกซินบี 1 มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์แบบทวนซ้ำ (% RSD) และแบบทำซ้ำ (% RSD<sub>ร</sub>) น้อยกว่า 5.48 และ 5.77% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในระดับที่มีความแม่นยำสูง (% RSD อยู่ในช่วง 1-10%) จากการทดสอบค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (limit of detection; LOD) และค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.2 และ 0.3 พีพีบี ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนที่ง่าย ช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนในการวิเคราะห์อีกด้วย โดยพบว่าในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินด้วยวิธี TLC densitometer และ วิธี IAC-HPLC จะใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง และมีค่าใช้จ่ายประมาณ 2000 บาทต่อตัวอย่าง

สำหรับวิธี ELISA จะใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง โดยมีค่าใช้จ่ายราว 500-2000 บาทต่อตัวอย่าง ขณะที่ QuEChERS-HPLC จะใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมงและมีค่าใช้จ่ายที่ 500-800 บาทต่อตัวอย่าง

## วิจารณ์และสรุปผลงานวิจัย

### วิจารณ์

จากการศึกษาระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 พบว่าสัญญาณโครมาโทแกรมของอะฟลาทอกซินบี 1 สามารถแยกออกจากพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวได้ดี (void peak) เนื่องจากเฟสอยู่กับที่แต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันซึ่งจะส่งผลต่อรูปร่างโครมาโทแกรม ตลอดจนเวลาการหน่วงเหนี่ยวของสารภายในคอลัมน์ พบว่าเฟสอยู่กับที่ในกลุ่ม Symmetry® มีปริมาณคาร์บอน (% carbon load) มากกว่าเฟสอยู่กับที่ชนิด Inertsil C18-ODS 3 4.6x150 mm 5 µm จึงแสดงสภาพความไม่มีขั้วสูงและอาจส่งผลทำให้วิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินบี 1 ในการทดลองนี้ได้ดีขึ้น อีกทั้ง Symmetry® C18 3.9x150 mm 5 µm ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในน้อย จึงช่วยเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ และลดปริมาตรของสารตัวอย่าง

นอกจากนี้การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยอะซิโตน ไนไตรด์ เมทานอล และน้ำในอัตราส่วน 15:15:70 v/v/v ซึ่งมีสภาพความเป็นขั้วสูงกับเฟสอยู่กับที่ชนิด C18 ซึ่งไม่มีขั้วในการวิเคราะห์จะให้สัญญาณโครมาโทแกรมที่ชัดเจน และดีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cistimaleanu<sup>6</sup> อย่างไรก็ตาม โครมาโทแกรมที่ได้อาจมีลักษณะฐานกว้างเล็กน้อยและมีเวลาการหน่วงเหนี่ยวนานขึ้นได้ เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่มาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirhan<sup>8</sup> อย่างไรก็ตามการลดปริมาตรที่ฉีดสารเข้าระบบจะช่วยปรับขนาดของโครมาโทแกรมได้ในขณะที่การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยเมทานอล และน้ำในอัตราส่วน 50:50 v/v พบว่าพีคของสารอะฟลาทอกซินไม่สามารถแยกออกจากพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวภายในคอลัมน์ ส่วนการทำอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินบี 1 ก่อนผ่านเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกเป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1 โดยอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพื่อให้อยู่ในรูปของอะฟลาทอกซินบี 2

เอ (AFB2a) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเรืองแสง และมีสภาพความเป็นขั้วมากยิ่งขึ้นจึงช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัด<sup>5,10</sup> โดยปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์จะเกิดได้ดีในตัวทำละลายอะซิโตน ไตรดี (10%) มากกว่า สารละลายผสมอะซิโตน ไตรดี เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 15:15:70 v/v/v (เฟสเคลื่อนที่) ซึ่งมีเมทานอลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากเมทานอลจะไปรบกวนการเกิดปฏิกิริยา และทำให้อะฟลาทอกซินบี 2 เสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลต่อสัญญาณการตอบสนองและเปอร์เซ็นต์การกลับคืน<sup>11,12</sup>

สำหรับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค แคชเซอร์ พบว่าตัวทำละลายอะซิโตน ไตรดี และ เมทานอล (40:60 v/v) ด้วยปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีกว่าการใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เนื่องจากมีปริมาตรของสารสกัดเพียงพอที่จะนำสารสกัดไปเตรียมตัวอย่าง รวมทั้งช่วยเจือจางสารรบกวนในตัวอย่างให้น้อยลง แต่สารสกัดจะไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเกลือเนื่องจากตัวอย่างละลายช้าที่นำมาวิเคราะห์ไม่ผ่านกระบวนการทำให้ชุ่มด้วยน้ำ (soaking) ก่อนการสกัด อย่างไรก็ตามการใช้เกลือยังมีความจำเป็นต่อการกำจัดสารรบกวน (interferences) และการดูดซับน้ำส่วนเกินที่มีอยู่ในตัวอย่าง ทำให้ได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำ<sup>6,8</sup> โดยพบว่าการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ในการสกัดจะให้สัญญาณโครมาโทแกรมได้ดีกว่าการใช้เกลือโซเดียมอะซิเตตเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากเกลือโซเดียมอะซิเตตควรใช้กับสารสกัดที่มีสภาพเป็นกรด<sup>13</sup>

### สรุปผลงานวิจัย

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษา โดยอาศัยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคแคชเซอร์ จะช่วยให้ประหยัดต้นทุนในการวิเคราะห์ เกิดความรวดเร็วในการวิเคราะห์ด้วยการไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในปลายข้าวอาหารสัตว์ รวมทั้งอาจมีการพัฒนาต่อเพื่อวิเคราะห์สารพิษในวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนต่อไป

**Table 1** Validated parameters of AFB 1 in broken rice samples.

Conc. (ppb)	repeatability(n=6)						reproducibility (n = 3)	
	% recovery			% RSD <sub>r</sub>			% recovery	% RSD <sub>R</sub>
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3		
20	86.83	91.83	96.83	3.52	5.48	3.16	91.83	5.44
40	82.50	89.83	90.83	3.73	4.30	4.25	87.72	5.12
100	84.00	93.66	92.50	3.61	3.35	2.34	90.05	5.77

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ หัวหน้าห้องปฏิบัติการสารพิษจากเชื้อรา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่อนุญาตให้สถานที่และเครื่องมือในการศึกษาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณคุณศศิธร ลิ้มสุวรรณ ที่ให้คำแนะนำและฝึกหัดผู้ทำการศึกษาด้านเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ในช่วงเริ่มต้น

### เอกสารอ้างอิง

- IARC. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human 2002: 82.
- Reiter EV, Vouk F, Bohm J, Razzazi-Fazeli E. Aflatoxins in rice-A limited survey of products marketed in Austria. *Food Contr* 2010; 21:988-991.
- Karajibani M, Merkazee A, Montazerifar F. Determination of aflatoxin in the imported rice in Zahedan, South-East of Iran, 2011. *Health scope* 2013;2(3):125-129.
- Tansakul N, Limsuwan S, Bohm J, Hollman M, Razzazi-Fazeli E. Aflatoxins in Thai selected Thai commodities. *Food Addit Contam B: Surveillance* 2013;6(4):254-259.
- Reiter E, Zentek J, Razzazi E. Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Mol. Nutr* 2009;53(4):508-524.
- Sirhan AY, Tan GH, Al-Shunnaq A, Abdulrauf L, Wong RCS. QuEChERS-HPLC method for aflatoxin detection of domestic and imported feed in Jordan. *J Liq Chrom Relat Tech* 2014;37(3):321-342.
- Arroyo-Manzanares N, Huertas-Perez JF and Garcia-Campana AM. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Contr* 2014;36(1):94-101.
- Gonzalez-Curbelo MA, Socas-Rodriguez B, Herrera-Herrera AV, Gozanez-Salamo J, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA. Evaluation and applications of the QuEChERS method. *TrAC* 2015; 71:169-185.
- Cismaleanu A, Voicu G, Ciuca v, Ionescu M. Determination of aflatoxin B1 in cereal-based feed by a high performance chromatography method. *Lucrari Stiintific Medicina Verinara* 2008;41:565-569.
- Muscarella M, Lammarino M, Nardiello D, Magro S, Palermo C, Centonze D and Palermo, D. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Addit Contam A* 2009;26(10):1402-1410.
- Pearson SM, Candlish AAG, Aidoo KE, Smith JE. Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection. *Biotechnol Tech* 1999;13(2): 97-99.
- Kok WT. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 1994;659(1-2):127-137.
- Rejczak T, Tuzimski T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem* 2015;13(1):980-1010.