การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

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

ศศิประภา ชูช่วย[1], ประกรณ์ จาละ[2], ธนภูมิ มณีบุญ[3], ปารียา อุดมกุศลศรี[4], ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล[4]

Sasiprapa Choochuay[1], Prakorn Jala[2], Thanapoom Maneeboon[3], Pareeya Udomkusonsri[4]

Natthasit Tansakul[4]

Received: 30 May 2016 ; Accepted: 15 October 2016

บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งมักปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และทำให้เกิดพิษ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการปนเปื้อน จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยวิธีเทคนิคแคชเชอร์ (QuEChERS) ในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษา ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่มีเฟสอยู่กับที่ชนิด Symmetry®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_r) และทำซ้ำ (% RSD_R) 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®C18 3.9x150 mm 5 µm) with

---

[1] นิสิตปริญญาโท [4]รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

[2] นักวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม [3]นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ติดต่อได้ที่: ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล 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

[1] Graduate degree student, [4]Assoc. Prof., Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. [2]Scientist, Faculty of Veterinary medicine, Kamphaengsaen campus, Nakhon Pathom [3]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 acetronitrile methanol and water (15:15:70 v/v/v) at flow rate 1 ml/min. The sufficient extraction solvent and salt were acetronitrile: 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_r) and relative standard deviation of reproducibility (% RSD_R) 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 รวมทั้งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นจะส่งเสริมให้เกิดการเจริญและมีการสร้างสารพิษจากเชื้อราได้มากขึ้น

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

ในหลายประเทศจึงได้มีการกำหนดค่าการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum levels) รวมทั้งมีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตาม วิธีตรวจวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วย immunoaffinity column (IAC) ก่อนวิเคราะห์ด้วย โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง[5] แต่ IAC มีต้นทุนสูง ขั้นตอนยุ่งยาก และใช้เวลานาน[6] ปัจจุบันจึงมีการนำเอาเทคนิคแคชเชอร์ (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe; QuEChERS) ซึ่งเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างผัก หรือผลไม้เพื่อวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรามากขึ้น โดยการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรล์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกชั้นของสารสกัดด้วยเกลืออนินทรีย์ จากนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกระจายเฟสของแข็งในตัวอย่าง (dispersive solid phase extraction; dSPE) และวิเคราะห์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี[7,8] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะนำเทคนิคแคชเชอร์มาใช้พัฒนาการตรวจวัดอะฟลาทอกซินบี 1 เพื่อให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และต้นทุนต่ำในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษา

วัตถุประสงค์

พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษาเพื่อลดต้นทุนและระยะเวลาในการวิเคราะห์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

สารเคมี

สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 10 mg/ml ในเมทานอล (สารมาตรฐานตั้งต้น), อะซิโตรไนไตรล์ (MeCN), เมทานอล (MeOH), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), โซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) และกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA)

เครื่องมือ และอุปกรณ์

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

สภาวะโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

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

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 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) ใช้ตัวอย่างปลายข้าว 10 กรัม สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตรไนไตรล์กับเมทานอลในอัตราส่วน 40:60 v/v ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที กรณีที่ต้องการหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน จะเติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 1 พีพีบี ลงในตัวอย่างและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์เกิดการระเหย และทำให้ตัวอย่างเกิดการดูดซับสารพิษก่อนการสกัด จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งชั้น (phase partition step) ของสารสกัดด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัม เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที 5 นาที เมื่อเกิดการตกตะกอน จึงนำส่วนใส 1 มิลลิลิตร ไประเหยแห้ง และทำอนุพันธ์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก 100 ไมโครลิตร ในตัวทำละลาย 10% ของอะซิโตรไนไตรล์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และตรวจวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (validation method) วิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในปลายข้าวจะทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นภายในช่วงของการทดสอบ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40 และ 100 พีพีบี และประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้กราฟ การทดสอบความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลายข้าวที่ปราศจากการปนเปื้อน (sample blank) และเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้นต่ำ (5 พีพีบี) จำนวน 5 ซ้ำ พิจารณาค่าการกลับคืน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์จะทดสอบกับตัวอย่างปลายข้าวที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 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) ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลายข้าวที่ปราศจากการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 10 ซ้ำ และนำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ มาหาค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร LOD = ค่าเฉลี่ยของ sample blank + 3SD และ LOQ = sample blank + 10SD

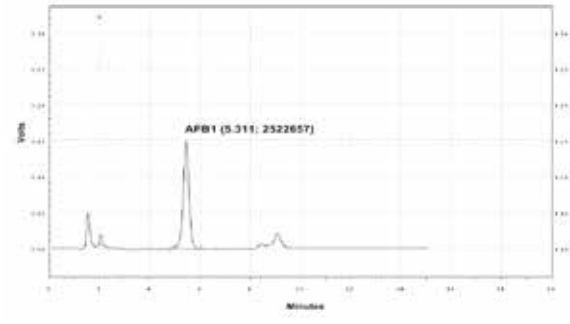
ผลการศึกษา

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_r) น้อย และให้สัญญาณการตอบสนองหรือพื้นที่ใต้กราฟสูง ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่จะเปรียบเทียบสารละลายผสมระหว่าง เมทานอล กับน้ำในอัตราส่วน 50:50 v/v และอะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล กับน้ำในอัตราส่วน 15:15:70 v/v/v พบว่า อัตราส่วนของสารละลายผสมอะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล กับน้ำ 15:15:70 v/v/v ให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด และทำให้พีคของอะฟลาทอกซินบี 1 สามารถแยกออกจากพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ได้ดี นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบปริมาตรที่ฉีดระหว่าง 10, 20 และ 50 ไมโครลิตร พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้คือ 10 ไมโครลิตร ซึ่งได้โครมาโทแกรมในลักษณะพีครูประฆังคว่ำที่สมมาตร

อย่างไรก็ตาม อะฟลาทอกซินบี 1 มีคุณสมบัติในการเรืองแสงได้น้อยตามธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดจึงมีการพัฒนาวิธีการทำอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินบี1 ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกก่อนการวิคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการเปรียบเทียบผลการทำอนุพันธ์ในสารละลาย อะซิโตรไนไตรด์ที่ 10% และการใช้สารละลายผสมเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล น้ำ 15:15:70 v/v/v) ในการทำสารละลายอนุพันธ์ พบว่าการทำอนุพันธ์ในตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรด์ที่ 10% จะเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ให้ผลสัญญาณการตอบสนองทางโครมาโทกราฟีได้ดี (Figure 1)



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

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างปลายข้าว

สำหรับการเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่างปลายข้าวจำนวน 10 กรัม จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วย อะซิโตรไนไตรด์กับเมทานอล (40:60 v/v) เป็นสารสกัดตัวอย่างร่วมกับเปรียบเทียบการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์หรือโซเดียมอะซีเตต 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัม โดยผลการทดลองพบว่าระหว่างอะซิโตรไนไตรด์กับเมทานอล (40:60 v/v) ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัม จะให้สัญญาณการตอบสนองทางโครมาโทแกรมได้ดี จากนั้นจึงศึกษาสัดส่วนปริมาตรของสารสกัดที่เหมาะสมต่อตัวอย่าง 10 กรัม โดยทำการเปรียบเทียบปริมาตรสารสกัด 10 และ 20 มิลลิลิตร ของอะซิโตรไนไตรด์กับเมทานอล (40:60 v/v) พบว่าปริมาตรสารสกัดที่ 20 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 10 กรัม จะให้ผลการสกัดดีกว่าการใช้สารสกัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เนื่องจากจะช่วยเจือจางสารรบกวนในตัวอย่าง และลดความข้นหนืดของสารสกัด

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 ในช่วงเวลา 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_r) และแบบทำซ้ำ (% RSD_R) 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 ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในน้อย จึงช่วยเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ และลดปริมาตรของสารตัวอย่าง

นอกจากนี้การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยอะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล และน้ำในอัตราส่วน 15:15:70 v/v/v ซึ่งมีสภาพความเป็นขั้วสูงกับเฟสอยู่กับที่ชนิด C18 ซึ่งไม่มีขั้วในการวิเคราะห์จะให้สัญญาณโครมาโทแกรมที่ชัดเจน และดีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cistimaleanu[9]อย่างไรก็ตาม โครมาโทแกรมที่ได้อาจมีลักษณะฐานกว้างเล็กน้อยและมีเวลาการหน่วงเหนี่ยวนานขึ้นได้ เนื่องมาจากเฟสเคลื่อนที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปริมาตรที่มาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirhan[6]อย่างไรก็ตามการลดปริมาตรที่ฉีดสารเข้าระบบจะช่วยปรับขนาดของโครมาโทแกรมได้ ในขณะที่การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยเมทานอล และน้ำในอัตราส่วน 50:50 v/v พบว่าพีคของสารอะฟลาทอกซิน ไม่สามารถแยกออกจากพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวภายในคอลัมน์ ส่วนการทำอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินบี 1 ก่อนผ่านเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกเป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1 โดยอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพื่อให้อยู่ในรูปของอะฟลาทอกซินบี 2 เอ (AFB2a) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเรืองแสง และมีสภาพความเป็นขั้วมากยิ่งขึ้นจึงช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวัด[5,10] โดยปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์จะเกิดได้ดีในตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรด์ (10%) มากกว่า สารละลายผสมอะซิโตรไนไตรด์ เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 15:15:70 v/v/v (เฟสเคลื่อนที่) ซึ่งมีเมทานอลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากเมทานอลจะไปรบกวนการเกิดปฏิกิริยา และทำให้อะฟลาทอกซินบี 2 เอเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลต่อสัญญาณการตอบสนองและเปอร์เซ็นต์การกลับคืน[11,12]

สำหรับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค แคชเชอร์ พบว่าตัวทำละลายอะซิโตรไนไตรด์ และ เมทานอล (40:60 v/v) ด้วยปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีกว่าการใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เนื่องจากมีปริมาตรของสารสกัดเพียงพอที่จะนำสารสกัดไปเตรียมตัวอย่าง รวมทั้งช่วยเจือจางสารรบกวนในตัวอย่างให้น้อยลง แต่สารสกัดจะไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเกลือเนื่องจากตัวอย่างปลายข้าวที่นำมาวิเคราะห์ไม่ผ่านกระบวนการทำให้ชุ่มด้วยน้ำ (soaking) ก่อนการสกัด อย่างไรก็ตามการใช้เกลือยังมีความจำเป็นต่อการกำจัดสารรบกวน (interferences) และการดูดซับน้ำส่วนเกินที่มีอยู่ในตัวอย่าง ทำให้ได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งส่งผลให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำ[6,8] โดยพบว่าการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ในการสกัดจะให้สัญญาณโครมาโทแกรมได้ดีกว่าการใช้เกลือโซเดียมอะซีเตตเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากเกลือโซเดียมอะซิเตตควรใช้กับสารสกัดที่มีสภาพเป็นกรด[13]

สรุปผลงานวิจัย

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งใช้ปลายข้าวเป็นต้นแบบในการศึกษา โดยอาศัยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคแคชเชอร์ จะช่วยให้ประหยัดต้นทุนในการวิเคราะห์ เกิดความรวดเร็วในการวิเคราะห์ด้วยการไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ในปลายข้าวอาหารสัตว์ รวมทั้งอาจมีการพัฒนาต่อเพื่อวิเคราะห์สารพิษในวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนต่อไป

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

Conc. (ppb)	repeatability(n=6)						reproducibility (n = 3)	
	% recovery			% RSD_r				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	% recovery	% RSD_R
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

1. IARC. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human 2002: 82.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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. Biotechrol Tech 1999;13(2): 97-99.
12. Kok WT. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B 1994;659(1-2):127-137.
13. Rejczak T, Tuzimski T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. Open Chem 2015;13(1):980-1010.