



การวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม Mycotoxins ในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้จัดทำ : สิริรัตน์ สิทธิรัตนตรีกุล, จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน, นรมล จิตต์สมหมาย, จิตนภา วรนิติกุล

บทนำ

ไมโคทอกซิน (Mycotoxins) คือสารพิษจากธรรมชาติที่ผลิตโดยเชื้อรา มักพบการปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ตลอดห่วงโซ่การผลิต ตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง ไปจนถึงการเก็บรักษา การปนเปื้อนไมโคทอกซินในอาหารสัตว์ถือเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากส่งผลเสียโดยตรงต่อสุขภาพสัตว์ทั้งด้านการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และคุณภาพผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น นม และไข่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค สารพิษที่พบบ่อย ได้แก่ Aflatoxins, Ochratoxin A, Fumonisin, Deoxynivalenol (DON) และ Zearalenone ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของตับ ไต ระบบประสาท และระบบฮอร์โมน

ประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้น ซึ่งเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างไมโคทอกซิน โดยเฉพาะในวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่สำคัญ เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ถั่วลิสง และกากพืช ดังนั้นการเฝ้าระวังและการวิเคราะห์การปนเปื้อนไมโคทอกซินในอาหารสัตว์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อประเมินระดับความเสี่ยงควบคุมคุณภาพ และสนับสนุนการกำหนดมาตรการด้านความปลอดภัยอาหารสัตว์ของประเทศ การพัฒนาและประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกัน และลดผลกระทบจากไมโคทอกซินต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์และความปลอดภัยด้านอาหารโดยรวม ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 มีการกำหนดค่าการปนเปื้อนไมโคทอกซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์แตกต่างกันตามประเภท เช่น กำหนดค่า Aflatoxins รวมอยู่ในช่วง 40-500 µg/kg ขณะที่มาตรฐานของสหภาพยุโรป (EU) กำหนดปริมาณ Aflatoxin B1 ไม่เกิน 20 µg/kg

เทคนิค LC-MS/MS เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ได้รับความนิยมในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างและสารปนเปื้อน เช่น กลุ่มไมโคทอกซินและอะฟลาทอกซิน เนื่องจากเทคนิค Liquid Chromatography (LC) สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดพร้อมกันและแยกสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเชื่อมต่อกับเครื่อง Mass Spectrometer (MS) ซึ่งมีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Selectivity) สูง จึงสามารถแยก ระบุ และยืนยันชนิดของสารตกค้างและสารปนเปื้อนได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

Liquid Chromatography

แยกสารพิษตกค้างและสารปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และธัญพืช ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography (Thermo Scientific Vanquish Flex Binary Pump) ร่วมกับคอลัมน์ Hypersil GOLD aQ สำหรับการทำงานที่รวดเร็วภายในประมาณ 15 นาที พร้อมค่า Rt ของสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 1

Mass Spectrometry

ขั้นตอนตรวจหามวลของสารพิษตกค้างและสารปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์และธัญพืช วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thermo Scientific รุ่น TSQ Quantis Plus ซึ่งใช้ระบบ Triple Quadrupole และติดตามสัญญาณด้วย Selected Reaction Monitoring ตามที่แสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 เครื่องแยกสารด้วยของเหลว (Liquid Chromatography) ต่อพ่วงเครื่องวิเคราะห์น้ำหนักมวล (Triple Quadrupole Mass Spectrometer)

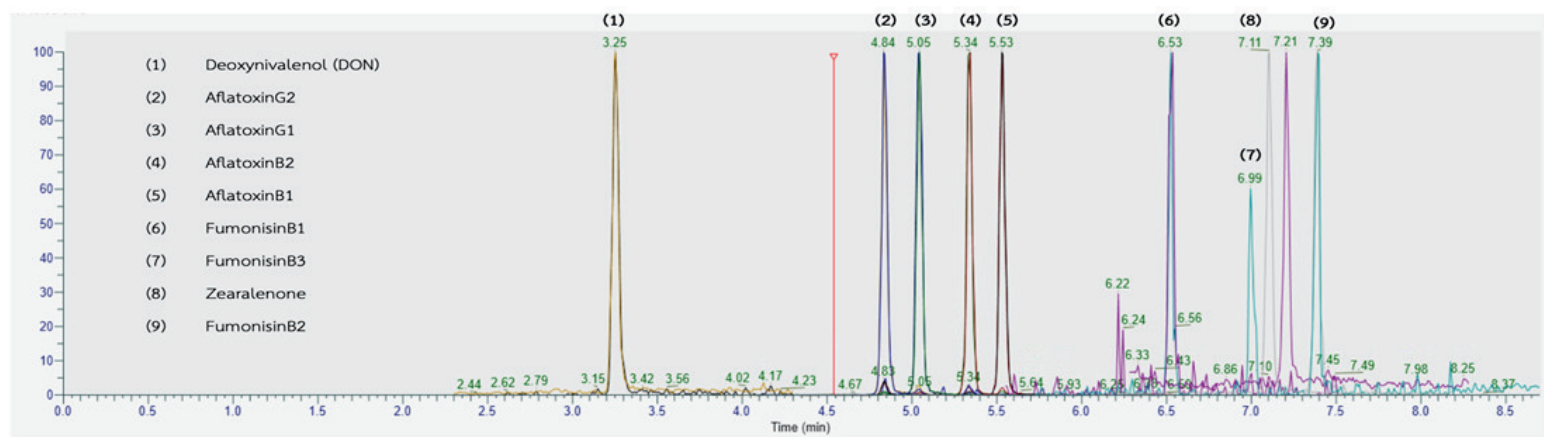
ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์หรือธัญพืช 5 กรัม ลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย 0.1% formic acid in 70% MeOH ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติม mixed ISTD (250 ppb) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง 150 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายอีก 750 ไมโครลิตร เพื่อเจือจางในอัตรา 1:5 เขย่า 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำ 10 นาที ดูดส่วนใส 800 ไมโครลิตร กรองผ่าน PTFE Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดสีชาก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Compound	RT (min)	Precursor Ion (m/z)	RF (V)	Quantitation Ion (m/z)	CE (V)	Confirming Ion1 (m/z)	CE (V)	Confirming Ion2 (m/z)	CE (V)
Deoxynivalenol13C15 (ISTD)	3.28	312.2	118	263.2	12	-	-	-	-
Deoxynivalenol	3.28	297.1	115	249.1	12	203.1	16	231.1	13
AflatoxinG213C17 (ISTD)	4.82	348.1	233	259.2	25	-	-	-	-
AflatoxinG2	4.85	331.1	233	313	24	245.1	33	188.8	40
AflatoxinG113C17 (ISTD)	5.06	346.2	245	212.2	25	-	-	-	-
AflatoxinG1	5.06	329	245	243.1	27	311.1	23	200	42
AflatoxinB213C17 (ISTD)	5.34	332.1	224	303.2	25	-	-	-	-
AflatoxinB2	5.33	315.1	224	287.1	26	259.1	32	243	27
AflatoxinB113C17 (ISTD)	5.54	330.2	243	300.8	25	-	-	-	-
AflatoxinB1	5.55	313.1	243	285.1	23	269	32	241	37
FumonisinB113C34 (ISTD)	6.53	756.4	239	374	30	-	-	-	-
FumonisinB1	6.54	722.5	239	352.5	35	334	35	704.4	25
FumonisinB3	7	706.4	221	336.3	34	318.3	34	354.1	35
Zearalenone13C18 (ISTD)	7.28	337.2	127	319.2	9	-	-	-	-
Zearalenone	7.19	319.2	219	275.3	21	301.1	21	205.1	24
FumonisinB213C34 (ISTD)	7.39	740.5	221	358.3	30	-	-	-	-
FumonisinB2	7.4	706.4	221	336.3	34	318.3	34	354.1	35

ISTD: Internal Standard

ตารางที่ 1 แสดงพารามิเตอร์ของการวิเคราะห์ และ Rt ของไมโคทอกซินแต่ละชนิด



รูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของสารกลุ่มไมโคทอกซินทั้ง 9 ชนิด

ผลการตรวจวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนจากเชื้อรากลุ่ม Mycotoxins ในอาหารสัตว์ ทำการสกัดด้วยวิธี Liquid Phase Extraction และมีการเติม ISTD พบว่าเส้นกราฟมาตรฐานของสารพิษจากเชื้อรา Aflatoxin G2, G1, B2 และ B1 (ช่วงความเข้มข้น 0.078-5 ppb), สารพิษจากเชื้อรา Fumonisin B1, B2 และ B3 (ช่วงความเข้มข้น 0.625-40 ppb), สารพิษจากเชื้อรา Deoxynivalenol (DON) (ช่วงความเข้มข้น 1.25-80 ppb) และสารพิษจากเชื้อรา Zearalenone (ช่วงความเข้มข้น 2.5-160 ppb) มีค่า R-Square (R²) ≥ 0.990

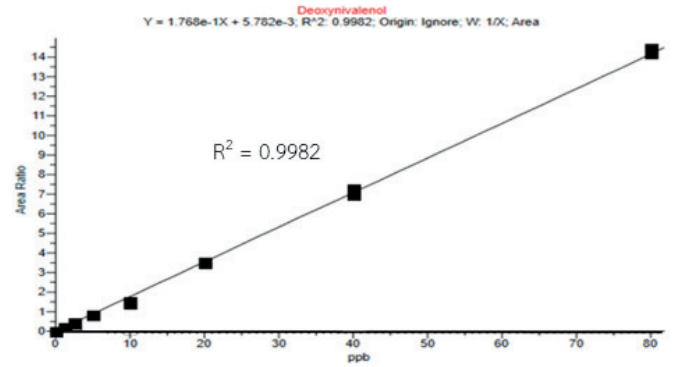
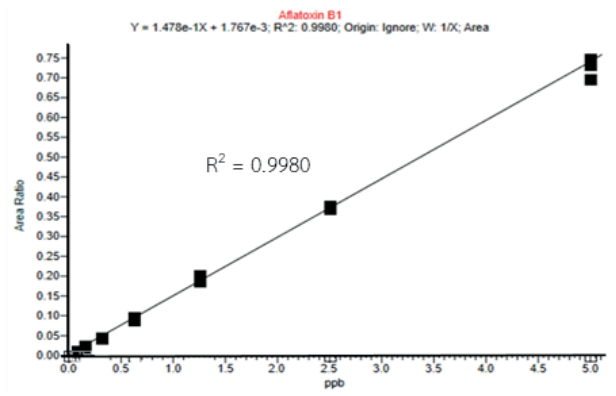
เมื่อนำไปคำนวณและวิเคราะห์ตัวอย่างในเชิงปริมาณ พบว่าผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับและสามารถนำมาใช้รายงานผล Minimum Reporting Level (MRL) ของห้องปฏิบัติการ รวมทั้งสามารถพัฒนาต่อยอดการตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังปริมาณสารพิษจากเชื้อราให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานเพื่ออาหารสัตว์ที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพสัตว์และส่งเสริมให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Compound	R-Square (≥0.990)	Concentration range (ppb)
Deoxynivalenol (DON)	0.9982	1.25 - 80
Aflatoxin G2	0.9986	0.078 - 5
Aflatoxin G1	0.997	0.078 - 5
Aflatoxin B2	0.9994	0.078 - 5
Aflatoxin B1	0.998	0.078 - 5
Fumonisin B1	0.996	0.625 - 40
Fumonisin B3	0.9952	0.625 - 40
Zearalenone	0.9948	2.5 - 160
Fumonisin B2	0.9954	0.625 - 40

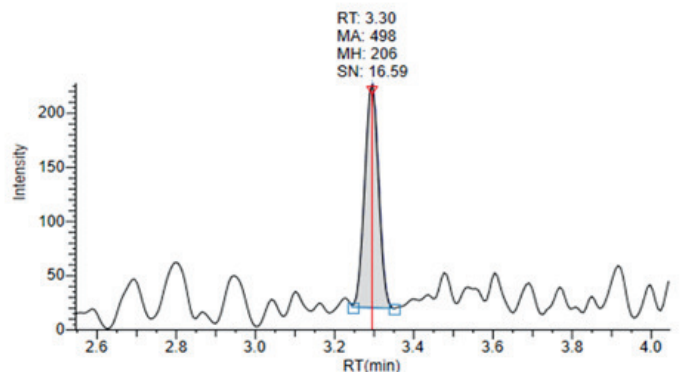
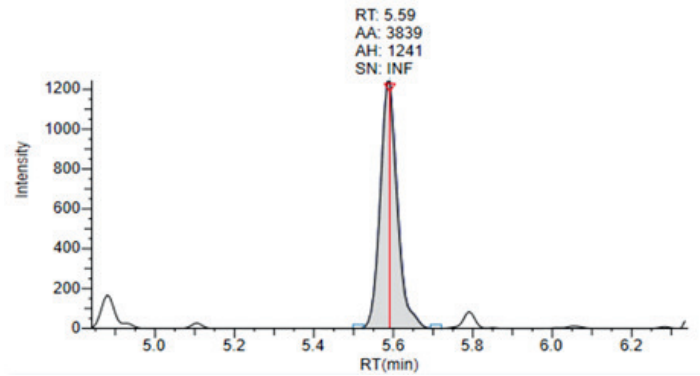
ตารางที่ 2 แสดงค่า R-Square ของสารกลุ่มไมโคทอกซิน

เอกสารอ้างอิง:

- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข(ฉบับที่ 414) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน
- พระราชบัญญัติ ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสาร Aflatoxins B1 (บน) และสาร Deoxynivalenol (DON) (ล่าง)



รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของสาร Aflatoxins B1 ความเข้มข้น 0.078 ppb (บน) และ สาร Deoxynivalenol (DON) ความเข้มข้น 1.25 ppb (ล่าง) การวิเคราะห์สารกลุ่ม Mycotoxins



บริษัท ชายน์ สเปค จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533

thermo
scientific

Authorized Distributor



scispec



@scispec



www.scispec.co.th