

การพัฒนาวิธีทดสอบ T-2/HT-2 Toxin ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS

นายไกรวุฒิ นวลขาว^{1/} นายวิทยา สังข์ทอง^{1/} นายกู้เกียรติ ขำขาว^{1/}

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบสาร T-2 และ HT-2 toxin ในตัวอย่างข้าวโพด ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) โดยเลือกใช้ SIM Mode (Selected Ion Monitoring) สกัดตัวอย่างในข้าวโพดด้วย 80% เมทานอล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Immunoaffinity Column (IAC) และทดลองสร้างกราฟมาตรฐานในช่วง 5.01 – 1,037 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Determination, r^2) อยู่ระหว่าง 0.99994 – 0.99998 และทำการทดสอบด้วยตัวอย่าง Fortified Sample ให้ค่า %recovery อยู่ระหว่าง 89.82 – 106.31% และทำการทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพรหัสตัวอย่าง 22137 ให้ค่า %recovery อยู่ระหว่าง 79.47 – 96.71% จากผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อใช้วิเคราะห์สาร T-2 และ HT-2 ในตัวอย่างข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS ต่อไป

คำสำคัญ: T-2, HT-2, LC-MS, Immunoaffinity Column, ข้าวโพด

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development for Simultaneous Determination of T-2 and HT-2 toxin in Maize By Immunoaffinity Column (IAC) clean up with ESI-LC-MS

Kraiwut Nualkaw^{1/} Witaya Sungthong^{1/} Kukiatt Khamkhaw^{1/}

Abstract

Method development for simultaneous determination of T-2 and HT-2 toxin in maize was conducted using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) with selected ion monitoring (SIM) mode. Maize samples were extracted with 80% methanol and purified using immunoaffinity column (IAC). The standard calibration curves were evaluated over the concentration range of 5.01 – 1,037 µg/L with the coefficient of determination (r^2) were between 0.99994 – 0.99998 The developed method was tested with a fortified sample that showed the %recovery were between 89.82 – 106.31%, and was tested with the quality control sample from FAPAS code 22137 that showed the %recovery were between 79.47 – 96.71% The results showed that suitable for method validation for simultaneous determination for T-2 and HT-2 toxin in maize with LC-MS.

Keywords: Fumonisin, LC-MS, Immunoaffinity Column, Maize

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
Department of Livestock Development

**การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร T-2 และ HT-2 toxin ในข้าวโพด
ด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) clean up และ ESI-LC-MS**

นายไกรวุฒิ นวลขาว^{1/} นายวิทยา สังข์ทอง^{1/} นายภูเกียรติ ขำขาว^{1/}

บทนำ

T-2/HT-2 เป็นสารพิษจากเชื้อราซึ่งถูกสร้างโดยเชื้อราตระกูล *Fusarium* และเชื้อราตระกูลใกล้เคียง โดยเชื้อราเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิเย็นจัดไปจนถึงสูงสุดราว 30 องศาเซลเซียส และสารพิษเหล่านี้ส่งผลต่อสุขภาพสัตว์โดยตรง โดยเฉพาะ T-2 toxin ที่มีการปนเปื้อนเพียง 1 – 3 ppm จะส่งผลให้สัตว์ปีกป่วย เปลือกของไข่ จะ บาง น้ำหนักลดลง

T-2 and HT-2 mycotoxins are produced by *Fusarium* and other mold species that can commonly attack grains and can grow at temperatures from slightly above freezing to about 86 °F (30 °C). All domestic animals are susceptible to injury by dietary intake of T-2 in the range of a few ppm. In poultry, feed contaminated with 1.0 to 3.5 ppm of T-2 has produced lesions at the edges of the beaks, abnormal feathering in chicks, a drastic and sudden drop in egg production, egg with thin shells, reduced weight gains, and mortality. (VICAM, 2018.)

รายงานความก้าวหน้าโครงการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ต.ค. 2560 - มี.ค. 2561

1. ชื่อโครงการ

การพัฒนาวิธีทดสอบ T-2/HT-2 Toxin ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS

ผู้รับผิดชอบ

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| 1. นายวิทยา สังข์ทอง | นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นายไกรวุฒิ นวลขาว | นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ |
| 3. นายกู้เกียรติ ขำขาว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 Toxin ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS

3. ขอบข่าย

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม T-2/HT-2 Toxin ในข้าวโพด และเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม T-2/HT-2 Toxin ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS และนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

5. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

5.1 เครื่องมือ

- 5.1.1 เครื่อง LC-MS ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 Infinity
- 5.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG603-S
- 5.1.3 ชุดปั่นตัวอย่างยี่ห้อ WARING รุ่น HGB2WT พร้อมโม
- 5.1.4 Vortex Mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie 2
- 5.1.5 Micropipette ขนาด 10 – 100 uL
- 5.1.6 Micropipette ขนาด 500 uL
- 5.1.7 Micropipette ขนาด 100 – 1,000 uL
- 5.1.8 Micropipette ขนาด 1,000 – 5,000 uL
- 5.1.9 Dispenser ยี่ห้อ Genius รุ่น Simplex ขนาด 50 mL
- 5.1.10 เครื่อง Ultra sonic ยี่ห้อ Branson รุ่น 8200
- 5.1.11 ปั่นกรองสารละลาย ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-25

5.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

5.2.1 Acetic acid HPLC grade

5.2.2 Methanol AR หรือ GR grade

5.2.3 Methanol HPLC grade

5.2.4 NaCl AR หรือ GR grade

5.2.5 Standard T-2 Toxin ยี่ห้อ Biopure Lot:

5.2.6 Standard HT-2 Toxin ยี่ห้อ LGC Lot: L15444H

5.3 อุปกรณ์

5.3.1 Column Inertsil C18 2.1 x 150 mm. 5 μ m.

5.3.2 น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 Ω (Deionized water)

5.3.3 ซ้อนตักสาร

5.3.4 Syringe Filters ขนาด 0.45 μ m ชนิด Nylon

5.3.5 กรวยกรองสารละลาย ชนิด Polypropylene

5.3.6 หลอดเซ็นติฟิวจ์ ชนิด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร

5.3.7 กระดาษกรอง Whatman No. 4 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

18.5 เซนติเมตร

5.3.8 Rack สำหรับวางหลอดเซ็นติฟิวจ์

5.3.9 Glass Micro-fiber filter ขนาด 1.5 ไมโครเมตร หรือเทียบเท่า

5.3.10 Disposable Syringe พลาสติกชนิดไม่มีหัวเข็มขนาด 10 มิลลิลิตร

5.3.11 Clamp พร้อมขาตั้ง หรือชุด hand pump

5.3.12 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum

5.3.13 Aluminium foil

5.3.14 Immunoaffinity column T-2/HT-2 HPLC, ยี่ห้อ VICAM

5.3.15 Cylinder ขนาด 10, 50, 1000 มิลลิลิตร

5.3.16 Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร

5.3.17 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100 มิลลิลิตร

5.3.18 Disposable Cuvettes

5.3.19 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase

6. วิธีดำเนินการ

6.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วยเทคนิค Liquid Chromatography ในการตรวจวัดสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 Toxin ดัดแปลงจาก (Gottschalk C, 2007) และ (Lattanzio V., 2007)

6.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องตรวจวัด Mass Spectrometer ในการตรวจวัดสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 Toxin ดัดแปลงจาก (Gottschalk C., 2007) และ (Lattanzio V., 2007)

6.3 ทดสอบสร้าง Standard Calibration Curve ของสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 ทั้งหมด 8 ระดับความเข้มข้นและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS นำพื้นที่ใต้กราฟ และความเข้มข้นไปสร้าง calibration curve หาค่า r^2 (Coefficient of Determination) โดยค่า $r^2 \geq 0.995$ (AOAC, 2016) ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 Toxin

Compounds	Concentration ranges (ng/mL)
T-2	5.18 – 1,037.0 (5.18, 10.37, 20.74, 51.85, 103.7, 207.4, 518.5, 1,037.0)
HT-2	5.01 – 1,002.0 (5.01, 10.02, 20.04, 50.1, 100.2, 200.4, 501.0, 1,002.0)

6.4 ทดลองเตรียมตัวอย่างข้าวโพด (Blank Maize) ในการตรวจวัดสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 toxin ดัดแปลงจาก AOAC Official Method 2001.04, 2016 (AOAC, 2016) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ชั่งตัวอย่าง 25.0 g + Sodium chloride 1 g ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL



เติม 80% Methanol 100 mL เขย่าเป็นเวลา 30 นาที



กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4



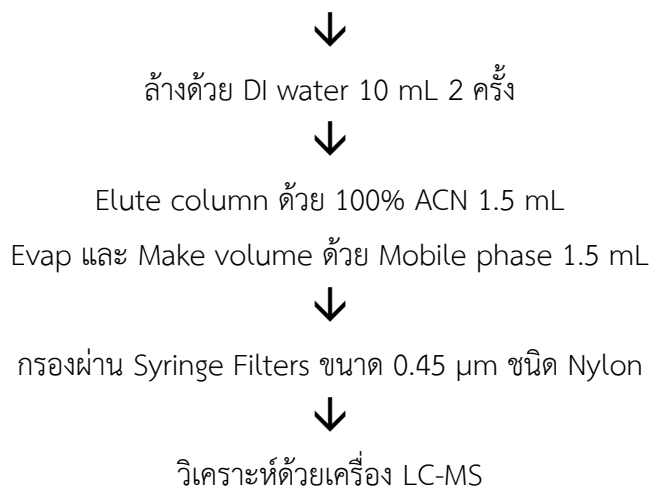
ทำการ dilute ตัวอย่าง ในสัดส่วน 1 : 4 ด้วย DI water



กรองด้วยกระดาษกรอง GF/A



Load ตัวอย่าง 10 mL ผ่าน Immunoaffinity Column T-2/HT-2 HPLC



6.5 ทดสอบ Fortified Sample โดยเติมสารมาตรฐาน T-2/HT-2 toxin ลงในตัวอย่างข้าวโพด ให้มีความเข้มข้นของ T-2/HT-2 toxin แต่ละชนิดเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 6.4 และประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบจากค่า %Recovery โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ระหว่าง 60 - 120% (European Commission EC. 41/2006, 2006)

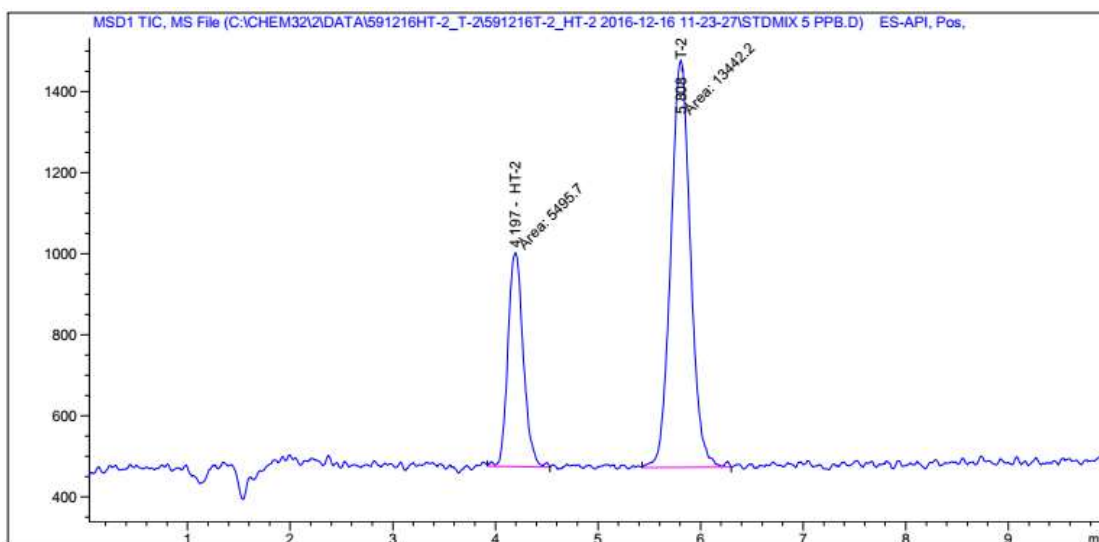
6.6 ทดสอบตัวอย่างอ้างอิง (QC Sample) รหัส 22137 และทำการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 5.4 และประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบจากค่า %Recovery โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ระหว่าง 60 - 120% (European Commission EC. 41/2006, 2006)

7. ผลการทดลอง

7.1 ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 Toxin ด้วย Liquid Chromatography ตามตารางที่ 2 และ รูปที่ 1

ตารางที่ 2 แสดง LC Conditions สำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 Toxin โดยใช้คอลัมน์ Inertsil C18 2.1 x 150 mm. 5 µm.

Parameters	Values
Mobile phase	MPA = 1 mM Ammonium Acetate with 0.5% Acetic acid in H ₂ O MPB = 1 mM Ammonium Acetate with 0.5% Acetic acid in MeOH
Elution mode	Isocratic elution with 65% MPB
Flow rate	0.25 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection volume	20 µL
Run time	10 min
Retention time (min)	T-2 = 5.686, HT-2 = 4.129



รูปที่ 1 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ของสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 ที่ความเข้มข้น 5 ng/mL

7.2 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Mass Spectrometer ในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2 ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่เหมาะสมของ Mass Spectrometer

Parameters	Values
SIM mode (m/z)	T-2 $[M + NH_4]^+ = 484.20$ HT-2 $[M + NH_4]^+ = 442.20$
ESI source	Positive mode
Dwell time	290 msec
Drying gas	13.0 L/min
Nebulizer pressure	60 psig
Dry gas temperature	350 °C
Capillary voltage (+)	4,000 V
Fragmentor	T-2 = 95 V, HT-2 = 90 V

7.3 ผลการทดสอบ Standard Calibration Curve ของสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม T-2/HT-2 ตามตารางที่ 4 และ รูปที่ 2-3

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบแสดงค่าความเป็นเส้นตรงของสารพิษจากเชื้อรา T-2/HT-2

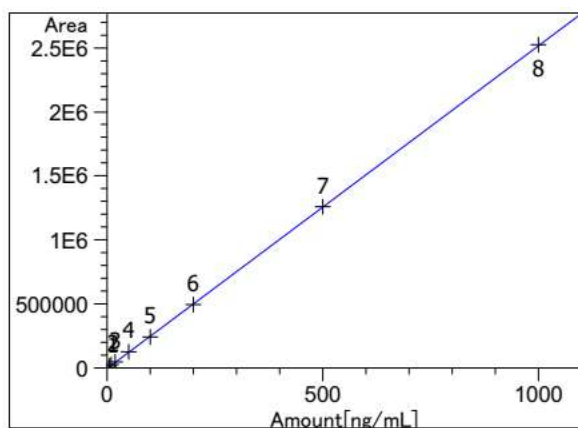
Compounds	Slope	Intercept	r^2
T-2	2528.14380	-5056.93333	0.99998

HT-2

922.73350

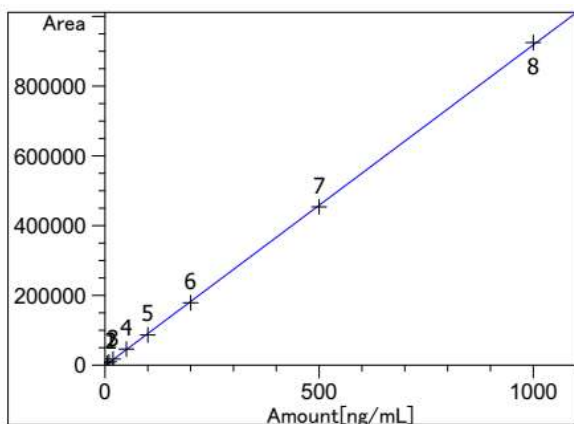
-2298.47919

0.99994



T-2 at exp. RT: 5.686
 MSD1 TIC, MS File
 Correlation: 0.99998
 Residual Std. Dev.: 5912.79190
 Formula: $y = mx + b$
 m: 2528.14380
 b: -5056.93333
 x: Amount
 y: Area

รูปที่ 2 แสดง Calibration curve ของ T-2 ที่ระดับความเข้มข้น 5.18 – 1,037.0 ng/mL



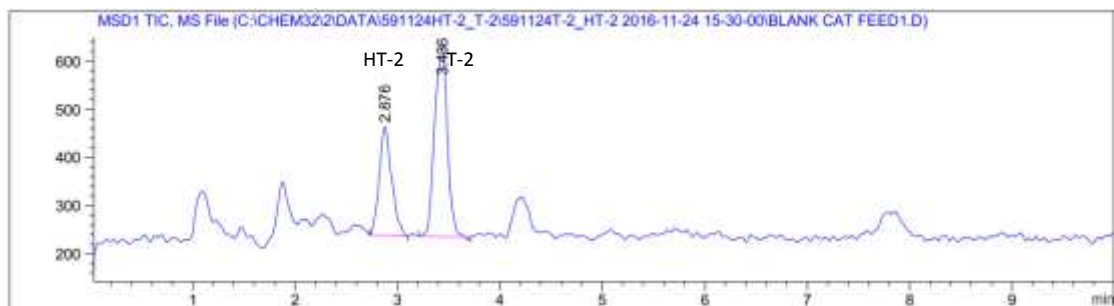
HT-2 at exp. RT: 4.129
 MSD1 TIC, MS File
 Correlation: 0.99994
 Residual Std. Dev.: 3626.84798
 Formula: $y = mx + b$
 m: 922.73350
 b: -2298.47919
 x: Amount
 y: Area

รูปที่ 3 แสดง Calibration curve ของ HT-2 ที่ระดับความเข้มข้น 5.01 – 1,002.0 ng/mL

7.4 ผลทดสอบข้าวโพด (Blank Maize) ตามตารางที่ 5 และรูปที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างข้าวโพด (Blank maize)

Compounds	Result (ug/kg)	S/N
T-2	-	-
HT-2	-	-

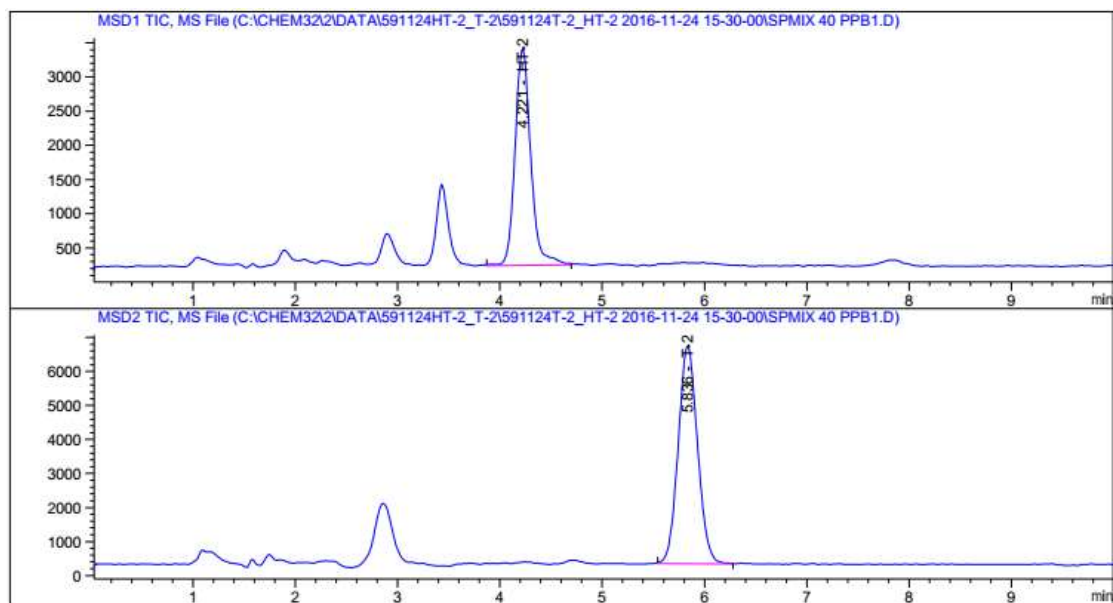


รูปที่ 5 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ในตัวอย่าง Sample blank ของสารพิษจากเชื้อรา T-2 และ HT-2 toxin

7.5 ผลทดสอบ Fortified Sample ตามตารางที่ 6 และ รูปที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบ Fortified sample

Compounds	Fortified conc. (ug/kg)	Results (ug/kg)	%recovery
T-2	41.48	37.26	89.82
HT-2	40.08	42.61	106.31

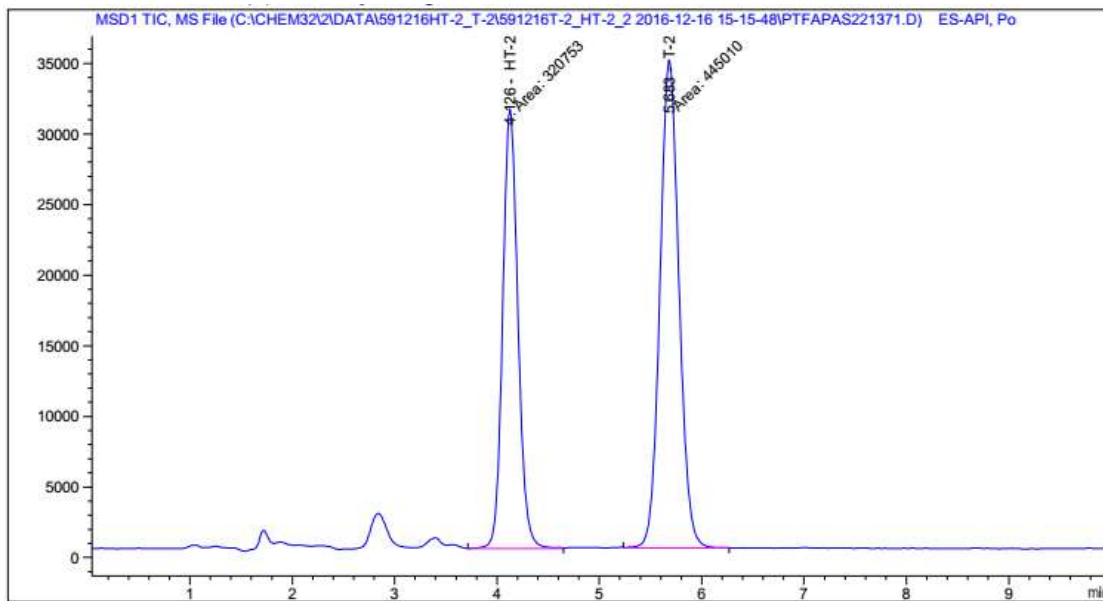


รูปที่ 6 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ในตัวอย่าง Sample blank ของสารพิษจากเชื้อรา T-2 และ HT-2

7.6 ผลการทดสอบตัวอย่างอ้างอิง (QC Sample) รหัส 22137 ตามตารางที่ 7 และ รูปที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบ QC Sample

Compounds	Fortified conc. (ug/kg)	Results (ug/kg)	%recovery
T-2	224	178.03	79.47
HT-2	362	350.12	96.71



รูปที่ 7 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ในตัวอย่าง QC Sample (22137) ของสารพิษจากเชื้อรา T-2 และ HT-2

8. สรุปผลการทดลอง

7.1 ผลการทดสอบเตรียมสารมาตรฐาน T-2 และ HT-2 ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 - 1,000 ng/mL นำไปสร้าง calibration curve ภายใต้สภาวะระบบเครื่อง LC-MS ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้น ได้ค่า $r^2 = 0.99998$ สำหรับ T-2, $r^2 = 0.99994$ สำหรับ HT-2 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995 (AOAC, 2016)

7.2 ผลการทดสอบ Sample blank โดยใช้ตัวอย่างอาหารแมว (cat feed) พบว่า ตัวอย่างไม่พบปริมาณสารพิษ T-2 และ HT-2

7.3 ผลการทดสอบ fortified sample โดยการเติมสารพิษ T-2 = 41.48 ug/kg และ HT-2 = 40.08 ug/kg นั้น ได้ผลการทดลองดังนี้ T-2 = 37.26 ug/kg (%recovery = 89.82) และ HT-2 = 42.61 ug/kg (%recovery = 106.31) %recovery ที่ได้ทั้งหมด อยู่ในเกณฑ์ 60 - 120% (AOAC, 2016)

7.4 ผลการทดสอบ QC Sample รหัส 22137 Animal Feed ที่มีค่า Assign value ของสารพิษจากเชื้อรา T-2 = 224 ug/kg และ HT-2 = 362 ug/kg ตรวจพบปริมาณ T-2 = 178.03 ug/kg

(%recovery 79.47) และ HT-2 = 350.12 ug/kg (%recovery 96.71) ซึ่ง %recovery อยู่ในเกณฑ์ 60 – 120% (AOAC, 2016)

7.5 จากผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายไพโรจน์ อารังโสภา ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุทธิพร พิริยานนท์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ส่วนบริหารจัดการห้องปฏิบัติการที่ดำเนินงานจัดหาวัสดุ อุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษาครั้งนี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

- AOAC (2016). Appendix K: Part I: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.
- Gottschalk C., Barthel J., Engelhardt G., Bauer J., Meyer K. (2007). Occurrence of type A Trichothecenes in conventionally and organically produced oats and Oat products. Mol. Nutr. Food Res. 2007, 51, 1547 – 1553.
- Lattanzio V., Solfrizzo M., Powers S., Visconti A. (2007). Simultaneous determination of Aflatoxin, Ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry after Multitoxin immunoaffinity cleanup, Rapid Commun. Mass Spectrometry, 2007; 21: 3253-3261.
- VICAM T-2/HT-2 HPLC Instruction manual. (2008) T-2/HT-2 HPLC procedure For Cereals.