

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Deoxynivalenol (DON) ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS

ไกรวุฒิ นวลขาว

กัญเกียรติ ขำขาว

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ DON ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ HPLC และ ระบบ Mass Spectrometer เพื่อดูรูปร่างของ peak, retention time, ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของ calibration curve และค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) การศึกษานี้ได้ใช้ DONTest HPLC (immunoaffinity column; IAC) ในการ clean-up ผลการทดสอบพบว่า เมื่อนำสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 400 ng/mL (5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0, 400.0) รวมทั้งสิ้น 7 ระดับ พบว่าได้ค่า $r^2 = 0.99994$ ซึ่งมากกว่า 0.995 ส่วนการทดสอบค่าการคืนกลับ ได้ผลการทดสอบ ดังนี้ ซ้ำที่ 1 39.6294 ng/mL (%recovery = 99.07) และซ้ำที่ 2 40.0215 ng/mL (%recovery = 100.05) ซึ่ง %recovery ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ 80 - 120%

คำสำคัญ: DON, Immunoaffinity column, Corn

Method Development for Determination of Deoxynivalenol (DON) in Corn by LC-MS/MS

Kraiwut Nualkaw

Kukiat Khamkhaw

Abstract

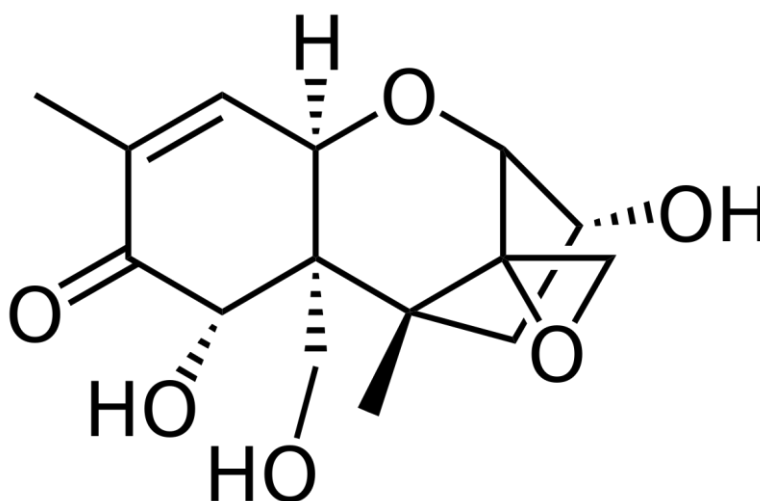
Development of test methods DON in Corn by LC-MS/MS aims to study optimize HPLC conditions and Mass Spectrometer Parameter for reach the good peak, retention time, linearity of calibration curve and %recovery. This study used DONTest HPLC (immunoaffinity column; IAC) as clean-up. The study results showed that standard solution with different concentrates 5.0 - 40.0 ng/mL (5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0, 400.0) to create calibration curve, so result $r^2 = 0.99994$ and recovery percentage testing results showed 99.07% and 100.05% these are accepted in range 80 – 120%

Keywords: DON, Immunoaffinity column, Corn

บทนำ

Deoxynivalenol (DON) หรือที่เรียกกันในอีกชื่อหนึ่งว่า Vomitoxin เป็นสารประกอบทางเคมีจำพวก epoxy-sesquiterpenoid อยู่ในกลุ่ม Trichothecene type B ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมีกลุ่มหนึ่งในสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) สร้างโดยเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium graminearum* และ *Fusarium culmorum* เชื้อราเหล่านี้สามารถปนเปื้อนได้ทั้งในพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าวสาลี บาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ และข้าวโพด เป็นต้น โดยธรรมชาติแล้ว DON เป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors) ลดอัตราการรับกรดอะมิโนบางชนิด เช่น tryptophan นอกจากนี้ DON และสารพิษในกลุ่ม trichothecenes อีกหลายตัวยังส่งผลให้การดูดซึมสารอาหารในลำไส้ลดลงได้อีกด้วย ทั้งนี้ในมนุษย์ยังไม่มีรายงานว่า DON เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)

ในส่วนของปศุสัตว์จะพบว่าสัตว์จะมีอาการไม่อยากอาหาร น้ำหนักลด



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ DON

1. ชื่อโครงการ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ DON ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS

ผู้รับผิดชอบ

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1. นายไกรวุฒิ นวลขาว | นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ |
| 2. นายกู้เกียรติ ขำขาว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา DON ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS

3. ขอบข่าย

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อราชนิด DON ในข้าวโพด และเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อราชนิด DON ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS และนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

5. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

5.1 เครื่องมือ

- 5.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Sciex QTRAP 5500
- 5.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG603-S
- 5.1.3 เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Hanil รุ่น Combi 514R
- 5.1.4 Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2
- 5.1.5 Micro Pipette ขนาด 2 – 20 μ L
- 5.1.6 Micro Pipette ขนาด 10 – 100 μ L
- 5.1.8 Micro Pipette ขนาด 100 - 1,000 μ L
- 5.1.9 Micro Pipette ขนาด 500 - 5,000 μ L
- 5.1.10 Dispenser ขนาด 100 mL
- 5.1.12 เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MF-D
- 5.1.13 ป้อนกรองสารละลาย ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S

5.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

- 5.2.1 Methanol HPLC grade ใช้สำหรับเตรียม Mobile phase
- 5.2.2 Ammonium acetate
- 5.2.3 น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 M Ω -cm
- 5.2.4 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO₃), AR หรือ GR grade
- 5.2.5 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5%

5.3 อุปกรณ์

5.3.1 Column HPLC C₁₈ 3 µm ขนาด 3.0 × 150 มิลลิเมตร, Shimadzu Shim-pack HR-ODS

5.3.2 Erlenmeyer Flask ขนาด 125 และ 250 mL

5.3.3 ซ้อนตักสาร

5.3.4 กรวยกรองสารละลาย

5.3.5 หลอดเซ็นทรีฟิวจ์ชนิด Polypropylene ขนาด 50 mL

5.3.6 กระดาษกรอง Whatman no.4 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18.5 cm.

5.3.7 Rack สำหรับวางหลอดเซ็นทรีฟิวจ์

5.3.9 Syringe พลาสติกขนาด 3 และ 10 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม

5.3.10 Syringe Filters ชนิด Nylon ขนาด 0.20 µm

5.3.11 Clamp พร้อมขาตั้ง หรือชุด hand pump

5.3.13 Immunoaffinity column DONTTest HPLC ยี่ห้อ VICAM

5.3.14 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum

5.3.15 กระบอกตวงขนาด 50, 1000 mL

5.3.16 ปีกเกอร์ขนาด 50, 1000 mL

5.3.17 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mL

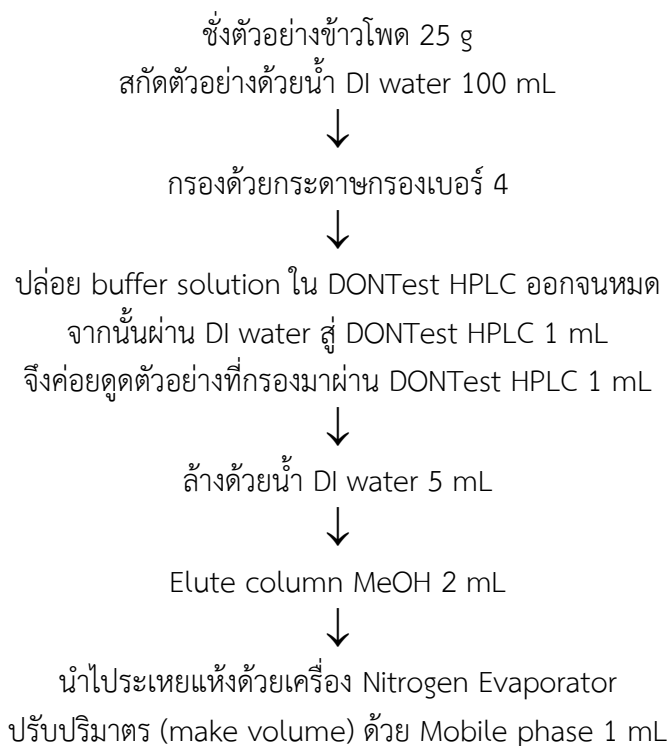
5.3.18 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase

5.3.19 Disposable Cuvettes

5.3.20 Vial ขนาด 1.5 mL

6. วิธีการดำเนินงาน

6.1 วิธีทดสอบ



↓
นำไปฉีดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

6.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง LC-MS/MS

HPLC Conditions

Mobile phases:

MPA: 1 mM CH₃COONH₄ with 0.5% CH₃COOH in DI water

MPB: 1 mM CH₃COONH₄ with 0.5% CH₃COOH in MeOH

MP: 1 mM CH₃COONH₄ with 0.5% CH₃COOH in 40% MeOH

Flow rate: 0.4 mL/min

Inject volume: 5 uL

HPLC Column: Shim-pack HR-ODS 150 x 3.0 mm 3 um

Column temp: 40 °C

Run time: 15 min

ตารางที่ 1 แสดงโปรแกรมการปรับ mobile phase แบบ gradient

Flow programs

No.	Time	Flow (uL/min)	Mobile Phase A	Mobile phase B
1		0.4	45	55
2	3.00	0.4	45	55
3	6.50	0.4	20	80
4	10.00	0.4	20	80
5	11.00	0.4	45	55
6	15.00	0.4	45	55

ตารางที่ 2 แสดงค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา DON

Mass Spectrometer conditions

Mode: MRM (Negative)						
Q1	Q3	RT	DP	EP	CE	CXP
355.30	59.00	2.46	-58.68	-4.79	-20.37	-17.09
355.30	295.00	2.46	-58.68	-4.79	-13.84	-8.34

6.3 การตรวจสอบ Chromatogram และ Retention time

ทำการฉีดสารมาตรฐานเพื่อดู chromatogram และ retention time ที่ถูกต้อง

6.4 การสร้าง Standard Calibration Curve

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 400 ng/mL (5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0, 400.0) ดัง ตารางที่ 3 โดยใช้ 1 mM CH₃COONH₄ with 0.5% CH₃COOH in 40% MeOH เป็นตัวทำละลาย และนำไปสร้างเป็น Calibration curve โดยเมื่อคำนวณค่า $r^2 \geq 0.995$

6.5 ทดสอบหา %recovery

ทำการ spike สารพิษจากเชื้อราชนิด DON ลงในตัวอย่างข้าวโพด ที่ระดับความเข้มข้น 40 ng/mL เพื่อทดสอบหา %recovery ซึ่งต้องอยู่ในเกณฑ์ 80 – 120%

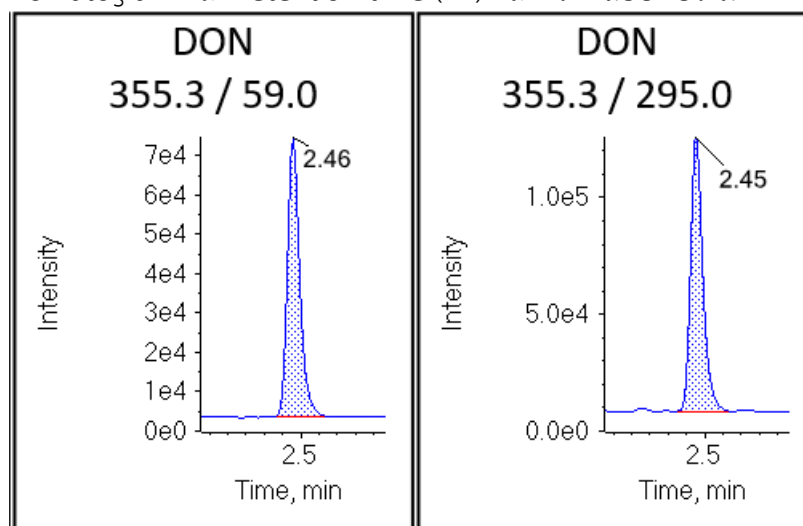
ตารางที่ 3 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารพิษจากเชื้อรา DON

Compounds	Concentration ranges (ng/mL)
DON	5.0 - 400.0 (5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0, 400.0)

7. ผลการทดลอง

7.1 Chromatogram และ Retention time

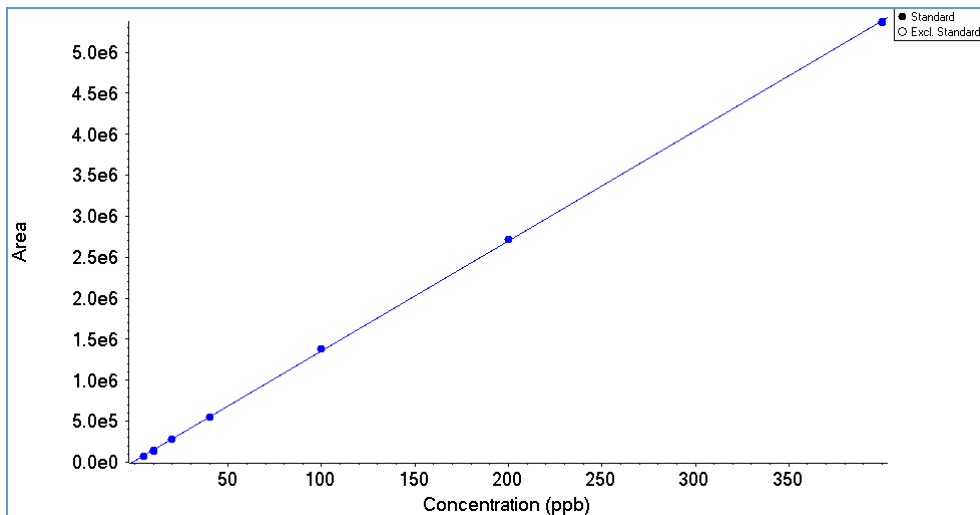
ทำการทดสอบการฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 40 ng/mL (Level 4) เพื่อดูรูปร่างของ chromatogram และ retention time (RT) ผลการทดสอบพบว่ามี RT ที่ 2.46 นาที



ภาพที่ 2 แสดง Chromatogram และ Retention time ของสารพิษจากเชื้อราชนิด DON

7.2 การทดสอบสร้าง Calibration curve

Regression Equation: $y = 13420.47150x + 16303.88932$ ($r = 0.99997$) ($r^2 = 0.99994$)



ภาพที่ 3 แสดง Calibration curve ของสารพิษจากเชื้อราชนิด DON

จากการทดสอบสร้าง calibration curve โดยใช้ค่าที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 5 - 400 ng/mL (5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0, 400.0) รวมทั้งสิ้น 7 จุด พบว่าค่า $r^2 = 0.99994$ ซึ่งมากกว่า 0.995 จึงทำให้สามารถนำไปใช้เป็น calibration curve ได้

7.2 การทดสอบ %recovery

Results Table

Sample Name	Sample Type	Component Name	RT (min)	Cal. Conc. (ppb)	Peak Area (cps)	IS Area (cps)	Area Ratio	SN Ratio	Accuracy (%)	MRM Ratio	MRM Ratio (Pass/Fail)
Blank	Unknown	DON_1	2.3	< 0	4321.2	N/A	N/A	10.7	N/A	-	
		DON_2	-	-	4748.5	-	N/A	13.0	N/A	1.099	Fail
SPLV4_1	Unknown	DON_1	2.5	39.6294	548149.1	N/A	N/A	112.2	N/A	-	
		DON_2	-	-	341801.4	-	N/A	117.7	N/A	0.624	Pass
SPLV4_2	Unknown	DON_1	2.5	40.0215	553410.9	N/A	N/A	105.9	N/A	-	
		DON_2	-	-	344063.4	-	N/A	118.8	N/A	0.622	Pass

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบสารพิษจากเชื้อราชนิด DON

จากการทดสอบหา %recovery ด้วยการเติมสารมาตรฐาน DON ลงไปในตัวอย่างข้าวโพดสำหรับทารก (infant Corn) ที่ระดับความเข้มข้น 40 ng/mL จำนวน 2 ซ้ำได้ผลดังนี้ ซ้ำที่ 1 39.6294 ng/mL (%recovery = 99.07) และซ้ำที่ 2 40.0215 ng/mL (%recovery = 100.05) ซึ่ง %recovery ของตัวอย่างควบคุมทั้งสอง อยู่ในเกณฑ์ 80 - 120%

8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสร้าง calibration curve ภายใต้สภาวะระบบเครื่อง LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นนั้น โดยการฉีดสารมาตรฐาน DON จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 5 - 400 ng/mL (5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0, 200.0, 400.0) ng/mL ได้ค่า $r^2 = 0.99994$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995 สามารถนำไปใช้เป็น calibration curve ได้

การทดสอบหา %recovery ด้วยการเติมสารมาตรฐาน DON ลงไปในตัวอย่างข้าวโพดที่ระดับความเข้มข้น 40 ng/mL พบว่า ได้ค่าเฉลี่ย %recovery = 99.56 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 80 - 120%

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ DON ในข้าวโพด ด้วยวิธี LC-MS/MS ครั้งนี้ ได้ผลการทดสอบที่เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดทุกอย่าง สามารถนำไปใช้ทดสอบ DON ในข้าวโพดได้เป็นอย่างดี และเพื่อเป็น

การเพิ่มความมั่นใจในผลการทดสอบ ควรจะมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) วิธีนี้ด้วย

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC (2016). Appendix K: Part I: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.VICAM. DONTest HPLC & DONTest WB,Instructio Manual.2018.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Vomitoxin>