เอกสารวิชาการ

เรื่องที่ 1

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในคราวเดียว ในข้าวโพดสำหรับสัตว์ โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

โดย

นายไกรวุฒิ นวลขาว

นางสาวสุรัตนา บุญใส

เลขทะเบียนวิชาการ 64(2)-0304-116

สถานที่ดำเนินการ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2563 - ตุลาคม 2564

การเผยแพร่ เว็บไซต์สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

http://qcontrol.dld.go.th

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในคราวเดียวในข้าวโพดสำหรับสัตว์โดยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ไกรวุฒิ นวลขาว สุรัตนา บุญใส

บทคัดย่อ

สารพิษจากเชื้อราเป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีความเป็นพิษสร้างจากเชื้อราที่สร้างเส้นใยหลายชนิดซึ่งมักพบปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราแบบหลายชนิดที่มีความถูกต้อง ความไว และความน่าเชื่อถือสำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในคราวเดียวในข้าวโพดสำหรับสัตว์ โดยใช้เทคนิคเจือจางไอโซโทปที่เสถียร และเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดแมสสเปกโทรเมทรี โดยอาศัยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งประกอบด้วยการแช่ตัวอย่างด้วย 1% กรดฟอร์มิก ตามด้วยการสกัดตัวอย่างด้วยอะซิโตไนไตรล์ และ salting out ด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวดูดซับชนิดคาร์บอน-18 และเติมสารมาตรฐานภายในแบบไอโซโทปชนิดคาร์บอน-13 ก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งใช้สภาวะการชะตัวอย่างแบบเกรเดียน ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของสหภาพยุโรป SANTE/12682/2019 ที่ค่าความแม่นโดยค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 70-120% ค่าความเที่ยงโดยค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20% ค่าขีดความสามารถของการตรวจพบอยู่ระหว่าง 0.125-12.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมค่าขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 0.625-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมและค่าผลกระทบจากเมทริกซ์มีค่า %signal suppression and enhancement อยู่ระหว่าง 80-120% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการตรวจยืนยันชนิดและปริมาณสารพิษจากเชื้อราทั้ง 17 ชนิด ในข้าวโพดสำหรับสัตว์

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารพิษจากเชื้อรา ข้าวโพดสำหรับสัตว์ LC-MS/MS

เลขทะเบียนวิชาการ: 64(2)-0304-116

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

Method development and validation for simultaneous determination of 17 mycotoxins in maize for animals by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Kraiwut Nualkaw Surattana Boonsai

Abstract

Mycotoxins, toxic secondary metabolites, are mainly produced by microscopic filamentous fungi that often found in agricultural commodities. The objective of this study was to develop and validate a reliable, sensitive, and accurate multiple mycotoxins method for the simultaneous determination of 17 mycotoxins in maize using stable isotope dilution internal standard (^{13}C-ISTD) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). A simple QuEChERS-based method was developed consisting of soaking with a solution of 1% formic acid followed by extraction with acetonitrile, salting-out with $MgSO_4$ and NaCl, clean-up with C18 sorbent and finally adding ^{13}C-ISTD before the LC-MS/MS analysis. The chromatographic condition was optimized for separation and detection of the 17 mycotoxins using gradient elution. The method's performance complied with the SANTE/12682/2019 guideline and had mean recovery accuracies in the range of 70–120% and precision testing of percent relative standard deviation (RSD) <20%. The limit of detection and limit of quantification values ranged from 0.125 to 12.5 µg/kg and 0.625 to 50 µg/kg, respectively. The matrix effect testing of %signal suppression and enhancement (SSE) in the range of 80-120%. This indicated that the method may be used for identification and quantification of 17 mycotoxins in maize for animals.

Keyword: Method development, Method validation, Mycotoxin, Maize for animals, LC-MS/MS

Scientific No.: 64(2)-0304-116

Feed Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products

91 Moo 4, Tiwanon Rd., Bangkadi, Mueng, Pathumthani, 12000

บทนำ

สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อราและพบการปนเปื้อนได้ในผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันมีการค้นพบสารพิษจากเชื้อรามากกว่า 200 ชนิด โดยเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษที่สำคัญคือ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus spp.* เช่น *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxins; AFs) ส่วน *Aspergillus ochraceus* สร้างสารพิษโอคราทอกซิน เอ (ochratoxin A; OTA) นอกจากนี้ยังมีเชื้อรากลุ่ม *Fusarium spp.* เช่น *Fusarium graminearum* สร้างสารพิษดีออกซีนิวาลินอล (deoxynivalenol; DON) ซีราลีโนน (zearalenone; ZEN) ที-2 (T-2) และฟูโมนิซิน (fumonisins; FBs) เป็นต้น (Rice *et al*., 1994) เมื่อสัตว์ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา จะเกิดความเป็นพิษและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากสารพิษจากเชื้อรา เรียกว่า mycotoxicosis ซึ่งความเป็นพิษต่อสัตว์สามารถเกิดขึ้นได้หลายลักษณะ ขึ้นกับชนิดและปริมาณของสารพิษจากเชื้อราที่ได้รับ รวมถึงชนิดของสัตว์ที่สัมผัสกับสารพิษจากเชื้อราชนิดนั้น ๆ เช่น อะฟลาทอกซิน บี1 (AFB1) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ โอคราทอกซิน เอ (OTA) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต ซีราลีโนน (ZEN) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ ที-2 (T-2) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ดีออกซีนิวาลินอล (DON) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาท และฟูโมนิซิน (FBs) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น (Kongkapan *et al*., 2016)

สำหรับประเทศไทยพบปัญหาการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าวโพดซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารสัตว์ (รักไทย และคณะ, 2563) ปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในข้าวโพดซึ่งเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์เป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหารสัตว์ ส่งผลให้เกิดการผลิตอาหารสัตว์ที่ไม่ได้มาตรฐาน ในปัจจุบันการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ มีความเข้มงวด โดยประเทศไทยมีการกำหนดมาตรฐานสำหรับ total aflatoxin ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ พ.ศ. 2559 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559) สำหรับมาตรฐานของสหภาพยุโรปกำหนดมาตรฐานสำหรับ AFB1, ZEN, OTA, FB1+FB2 และ T-2+HT-2 (Commission Regulation 2002/32/EC, 2002; Commission Recommendation 2006/576/EC, 2006) ในข้าวโพดและอาหารสัตว์สำเร็จรูปรายละเอียดตาม**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 ค่ามาตรฐานการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราตามประกาศกระทรวงเกษตรฯ และสหภาพยุโรป ในข้าวโพดและอาหารสัตว์

สารพิษจากเชื้อรา	ประกาศกระทรวงเกษตรฯ (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)				สหภาพยุโรป (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)			
	ข้าวโพด	อาหารสุกร	อาหารไก่	อาหารโคนม	ข้าวโพด	อาหารสุกร	อาหารไก่	อาหารโคนม
Total aflatoxin	100	50	100	100	-	-	-	-
AFB1	-	-	-	-	0.02	0.02	0.02	0.005
ZEN	-	-	-	-	3	0.1	-	0.25
OTA	-	-	-	-	0.25	0.05	0.1	-
DON	-	-	-	-	12	0.9	-	2
FB1+FB2	-	-	-	-	60	5	20	-
T-2+HT-2	-	-	-	-	0.5	0.25	0.25	0.25

เนื่องด้วยในปัจจุบันการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารสัตว์ในหลายประเทศทั่วโลก มีความเข้มงวด และกำหนดชนิดของสารพิษจากเชื้อรามากกว่าหนึ่งชนิด ทำให้มีความจำเป็นที่ต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ มีความถูกต้อง เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถบังคับใช้มาตรฐานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Varga *et al*., 2012) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ สารพิษจากเชื้อราด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของ AOAC ให้ได้หลายชนิดภายใต้การเตรียมตัวอย่างครั้งเดียวนั้นมีข้อจำกัดในการเตรียมตัวอย่าง เช่น ต้องใช้วิธีเตรียมอนุพันธ์ (derivatization) ด้วย post-column photochemical reaction สำหรับสารกลุ่ม AFs (AOAC 2003.02, 2016) และใช้ pre-column chemical derivatization โดย o-phthaldialdehyde (OPA) สำหรับ FB1 และ FB2 (AOAC 2001.04, 2016) และ 1-anthroylnitrile(1-AN) สำหรับT-2 + HT-2 (Visconti *et al.*, 2005) เพื่อให้สามารถตรวจวัดได้ด้วย fluorescence detection นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecenes type B ได้แก่ DON และ NIV ไม่มีคุณสมบัติในการเรืองแสง fluorescence จึงต้องใช้เทคนิคการตรวจวัดด้วย ultraviolet detection (Neumann *et al*., 2009) ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน นำมาซึ่งการแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยใช้เทคนิคการตรวจวัดที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราให้ได้ในการเตรียมตัวอย่างในคราวเดียว ซึ่งปัจจุบันเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นทางเลือกสำหรับการได้มาซึ่งความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantification) สำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราแบบหลายชนิด (multiple mycotoxins) ในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ คือ เทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) โดยเทคนิคดังกล่าวเป็นการวิเคราะห์สารซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดมวลของสารในรูปแบบของไอออน ทั้งนี้หลักการพื้นฐานประกอบด้วยการเปลี่ยนรูปโมเลกุลของสารให้กลายเป็น

ไอออน และทำให้ไอออนที่เกิดขึ้นนี้แตกตัวกลายเป็นไอออนย่อย ๆ ต่อไป จากนั้นจึงทำการแยกและตรวจวัดไอออนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) อย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้สามารถใช้ยืนยันชนิดของสาร (identification) และวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantification)ได้อย่างแม่นยำ อย่างไรก็ดีความท้าทายที่สำคัญของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยการใช้เทคนิคดังกล่าวในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อรา ได้แก่ การพัฒนาขั้นตอนที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) วิธีการสกัด (extraction method) ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ ต้องสามารถสกัดแยกสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดจากในตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ค่าความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability) ค่าระดับต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification) ในเกณฑ์มาตรฐาน (Dzuman *et al*., 2014)

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS หรือ Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, และ Safe เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันสำหรับการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง (pesticides) ในตัวอย่างผักและผลไม้ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย acetonitrile: water ตามด้วย salting-out สิ่งที่จะวิเคราะห์ (analytes) ให้อยู่ในส่วนของ acetonitrile phase เพื่อแยกสิ่งสกัดที่มีขั้วออกจากตัวอย่าง (polar matrix co-extract) (Anastassiades *et al*.,2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา (Dzuman *et al*., 2014; Lacina *et al*., 2012; Mol *et al*., 2008; Zachariasova *et al*., 2010)

การตรวจวิเคราะห์ทางโครมาโตกราฟีจำเป็นต้องคำนึงถึงผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นสามารถพบได้กับการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีความซับซ้อน ได้แก่ อาหารสัตว์ เนื่องจากมีการผสมของวัตถุดิบทางการเกษตรที่หลากหลาย (Li *et al*., 2011) ส่วนการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS ก็มีโอกาสเกิด matrix effect เนื่องจากกระบวนการแยกตัวเป็นไอออน (ionization) ของสารที่จะตรวจวัด อาจเกิดการชะร่วมกัน (coeluted) กับส่วนประกอบของเมทริกซ์ ส่งผลให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้ในกราฟมาตรฐานที่เตรียมในสารละลาย กับที่อยู่ในเมทริกซ์มีความแตกต่างกัน (Souverain *et al*., 2004) การเกิด matrix effect นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สารที่จะวิเคราะห์ ชนิดของตัวอย่าง สภาวะของเครื่อง หรืออาจรวมถึงวิธีการเตรียมตัวอย่าง แต่ถึงขณะนี้ก็ยังไม่สามารถหาวิธีการที่จะทำนายธรรมชาติการเกิดของ matrix effect (Trufelli *et al*., 2011) แต่วิธีการชดเชยผลของเมทริกซ์ สามารถทำได้โดย การเติมสารมาตรฐาน (standard addition) (Stuber *et al*., 2004) การดัดแปลงวิธีการเตรียมตัวอย่าง (Mallet *et al*., 2004) การสร้างกราฟมาตรฐานจากเมทริกซ์ (matrix-matched calibration) (Zhang *et al*., 2011) หรือใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard, ISTD) (Wang *et al*., 2007)

งานพิษวิทยาและชีวเคมี กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา เห็นถึงประสิทธิภาพและความสำคัญในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราทั้ง 17 ชนิด ในคราวเดียวกัน ซึ่งครอบคลุมตามประกาศกระทรวงเกษตรและ

สหกรณ์ ได้แก่ ผลรวมของอะฟลาทอกซิน (total aflatoxin) ประกอบด้วย AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 มาตรฐานของสหภาพยุโรป ได้แก่ AFB1, OTA, ZEN, DON, T-2, HT-2, FB1 และ FB2 รวมถึงสารพิษจากเชื้อราอีก 6 ชนิด ได้แก่ 15-AcDON, 3-AcDON, FusX, NEO, NIV และ DAS ซึ่งเป็นสารที่สหภาพยุโรปมีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์จากฟาร์ม (Zachariasova *et al.,* 2014) สำหรับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี้ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาและชีวเคมีได้ใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS ร่วมกับการใช้เทคนิค Stable Isotope Dilution Assay, SIDA โดยใช้ $^{13}C_{17}$-AFB1, $^{13}C_{17}$-AFB2, $^{13}C_{17}$-AFG1, $^{13}C_{17}$-AFG2, $^{13}C_{34}$-FB1, $^{13}C_{34}$-FB2, $^{13}C_{18}$-ZEN, $^{13}C_{20}$-OTA, $^{13}C_{24}$-T-2, $^{13}C_{22}$-HT-2, $^{13}C_{19}$-DAS, $^{13}C_{15}$-DON, $^{13}C_{15}$-NIV, $^{13}C_{17}$-3-AcDON และ $^{13}C_{17}$-15-AcDON เป็น ISTD เพื่อลด matrix effect และเพิ่มความถูกต้องสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในข้าวโพดสำหรับสัตว์ แล้วตรวจยืนยันชนิดและปริมาณด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้ในคราวเดียวกัน โดยเริ่มศึกษาหาความเข้มข้นของกรดฟอร์มิก (formic acid, FA) ที่เหมาะสมในการแช่ตัวอย่าง (soaking) ชนิดของ dispersive solid phase extraction (dSPE) ในขั้นตอนการ clean-up ตัวอย่าง รวมถึงสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ประสิทธิภาพตามเกณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว ผู้วิจัยจึงวางแผนพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในข้าวโพดสำหรับสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS ให้มีความไวเพียงพอที่จะตรวจสารพิษจากเชื้อรากลุ่มดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้นตามมาตรฐานของสหภาพยุโรป และประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ของปริมาณสารพิษจากเชื้อราสูงสุดที่ยอมให้พบได้ (maximum level, ML) ในข้าวโพดสำหรับสัตว์ และสามารถยืนยันชนิดและปริมาณของสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดได้ โดยมีค่าความแม่น (accuracy) และ ค่าความเที่ยง (precision) ผ่านตามเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของสหภาพยุโรป (SANTE/12682/2019, 2019) เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ สอดคล้องกับแนวทางที่เป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ และสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในข้าวโพดสำหรับสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารเคมีเกรด LC-MS ได้แก่ methanol (MeOH), ammonium acetate (AmAc), ammonium formate (AmF), acetic acid (AA), formic acid (FA), acetonitrile (ACN)

1.1.2 สารเคมีเกรด AR ได้แก่ sodium chloride (NaCl), magnesium sulfate ($MgSO_4$)

1.1.3 dispersive solid phase extraction (dSPE sorbent) ได้แก่ graphite carbon black (GCB), primary secondary amine (PSA), Bondesil C18

1.1.4 น้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI)

1.2 สารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา (reference standards of mycotoxins) 17 ชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซิน บี1 (aflatoxin B1, AFB1) อะฟลาทอกซิน บี2 (aflatoxin B2, AFB2) อะฟลาทอกซิน จี1 (aflatoxin G1, AFG1) อะฟลาทอกซิน จี2 (aflatoxin G2) ฟูโมนิซิน บี1 (fumonisin B1, FB1) ฟูโมนิซิน บี2 (fumonisin B2) โอคราทอกซิน เอ (ochratoxin A, OTA) ที-2 (T-2) เอสที-2 (HT-2) ไดอะเซทอกซีสเคอร์ปินอล (diacetoxyscirpenol, DAS) นีโอโซลานิออล (neosolaniol, NEO) นิวาลินอล (nivalenol, NIV) ดีออกซีนิวาลินอล (deoxynivalenol, DON) 3-อะซีติลดีออกซีนิวาลินอล (3-acetyldeoxynivalenol, 3-AcDON) 15-อะซีติลดีออกซีนีวาลินอล (15-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON)ฟูซารีนอน เอ็กซ์ (fusarenon X, FusX) และซีลารีโนน (zearalenone, ZEN)

1.3 สารมาตรฐานภายใน (internal standard, ISTD) 15 ชนิดได้แก่ $^{13}C_{17}$-AFB1,$^{13}C_{17}$-AFB2, $^{13}C_{17}$-AFG1, $^{13}C_{17}$-AFG2, $^{13}C_{34}$-FB1, $^{13}C_{34}$-FB2, $^{13}C_{18}$-ZEN, $^{13}C_{20}$-OTA, $^{13}C_{24}$-T-2, $^{13}C_{22}$-HT-2, $^{13}C_{19}$-DAS, $^{13}C_{15}$-DON, $^{13}C_{15}$-NIV, $^{13}C_{17}$-3-AcDON และ$^{13}C_{17}$-15-AcDON

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 LC-MS/MS (AB Sciex, USA)

2.2 HPLC column Accucore C18, 2.6 µm 2.1 x 100 mm (Thermo Scientific, USA)

2.3 Laboratory Shaker (Gerhardt, Germany)

2.4 Centrifuge (Hanil, Korea)

2.5 Vortex Mixer (Genie, USA)

2.6 Nitrogen Evaporator (Organomation, USA)

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์ที่ส่งมาตรวจที่สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ โดยตัวอย่างดังกล่าวได้ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS แล้วว่าไม่พบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด จำนวน 120 ตัวอย่าง

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) ใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS โดยมีการดัดแปลงขั้นตอนจาก Dzuman และคณะ (2014) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 ชั่งตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์ที่บดแล้ว 2 กรัม ลงในหลอดพอลีโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร

4.1.2 เติมกรดฟอร์มิกเจือจาง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 30 นาที

4.1.3 เติม 100% ACN ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาทีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่าง (shaker)

4.1.4 เติมเกลือสำหรับ salting outด้วย 4g $MgSO_4$ + 1g NaCl เขย่าอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 30 วินาที ด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

4.1.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.1.6 ปิเปตส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดพอลีโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี $MgSO_4$ และ dSPE

4.1.7 เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาทีด้วยเครื่องผสมสารละลาย

4.1.8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.1.9 นำส่วนใสไประเหยแห้งด้วยเครื่อง nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.1.10 เติม ^{13}C-ISTD ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ 20% MeOH ปริมาตร920 ไมโครลิตร

4.1.11 กรองตัวอย่างด้วย syringe membrane filter ชนิดไนลอน ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

4.1.12 ฉีดตัวอย่างปริมาตร 3 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง LC-MS/MS

5. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

5.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

5.1.1 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะของเครื่อง mass spectrometer

เตรียมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 500 ng/mL และ ^{13}C-ISTD 15 ชนิด แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 ng/mL ใน 20% MeOH ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรง และเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive ionization) และไอออนลบ (negative ionization) เพื่อหาค่าพลังงาน declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP) และ ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ parent ion และ daughter ion ที่ให้สัญญาณสูงสุดในการวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM)

5.1.2 ทดสอบชนิดของ mobile phase

ทำการทดสอบชนิดของ mobile phase 2 แบบในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราแบบ multiple toxins ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยดัดแปลงจาก Dzuman และคณะ (2015) โดยใช้ 5 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in MeOH and DI water และ 5 mM ammonium acetate with 0.1% acetic acid in MeOH and DI water ในการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ reverse phase chromatography โดยเตรียมสารมาตรฐานผสมของสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด และ ^{13}C-ISTD 15 ชนิดที่ความเข้มข้นดังนี้

สารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด

- 1 ng/mL สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- 80 ng/mL สำหรับ DON, 15-AcDON, FusX และ NIV
- 16 ng/mL สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA
- 60 ng/mL สำหรับ FB1 และ FB2

- 2 ng/mL สำหรับ ZEN
- 40 ng/mL สำหรับ 3-AcDON

สารมาตรฐานภายใน ^{13}C-ISTD 15 ชนิด

- 0.8 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{17}$-AFB1, $^{13}C_{17}$-AFB2, $^{13}C_{17}$-AFG1 และ $^{13}C_{17}$-AFG2
- 10 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{24}$-T-2 และ $^{13}C_{19}$-DAS
- 16 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{20}$-OTA และ $^{13}C_{17}$-15-AcDON
- 40 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{15}$-DON, $^{13}C_{15}$-NIV, $^{13}C_{17}$-3-AcDON และ $^{13}C_{34}$-FB1
- 8 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{34}$-FB2
- 4 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{18}$-ZEN
- 20 ng/mL สำหรับ $^{13}C_{22}$-HT-2

โดยการศึกษาชนิดของ mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกแบบ reverse phase chromatography ของเครื่อง LC-MS/MS ศึกษาภายใต้สภาวะของเครื่องมือจาก Dzuman และคณะ (2015) ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS

Parameters	**Conditions**
HPLC Column	Thermo Scientific Accucore C18 2.1 x 100 mm. i.d., 2.6 µm
Flow rate	0.4 mL/min
Injection volume	3.0 µL
Column Oven	25 °C
Elution mode	Gradient elution
Flow program	Initial 0.0% B; 4.0 min 20% B; 9.5 min 40% B; 10.5-13.0 min
	100% B; 13.10-16.0 min 0.0% B
Run time	16 min
Interface	ESI (+) and ESI (-)
Needle voltage	ESI (+) = 4500 V, ESI (-) = -4500
Gas temperature	500 °C
Curtain gas	30 psi
Turbo gas	55 psi
Nebulizer gas	55 psi

5.2 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

5.2.1 ความเข้มข้นของกรดฟอร์มิก (formic acid, FA) ที่เหมาะสมในการแช่ตัวอย่าง (soaking)

ในการศึกษาครั้งนี้อาศัยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERSโดยทดสอบ formic acid ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 1 และ 2% ในขั้นตอนการแช่ตัวอย่าง เนื่องจากมีรายงานการใช้ formic acid หลายความเข้มข้นเพื่อควบคุม pH ให้เหมาะสมกับชนิดตัวอย่าง รวมถึงสารพิษจากเชื้อราที่มีความไวต่อค่า pH ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดตัวอย่างดีขึ้น (Lacina *et al*., 2012) จากนั้นเตรียมตัวอย่างตามข้อ 4.1โดยใช้เกลือผสมของ 4g $MgSO_4$ + 1g NaCl สำหรับ salting out และ dSPE C18 สำหรับ clean-up เมื่อได้ความเข้มข้นของ formic acid ที่เหมาะสมแล้วจึงดำเนินการศึกษาชนิด dSPE ที่เหมาะสมตามข้อ 5.2.2

5.2.2 ชนิดของ dispersive solid phase extraction (dSPE) ในการ clean-up

โดยทำการทดสอบตามข้อ 4.1 จากนั้นทำการทดสอบโดยเปลี่ยนชนิดของ dSPE 3 ชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติในการกำจัดสิ่งรบกวนที่แตกต่างกันได้แก่ C18, PSA และ GCB (ข้อ 4.1.6)

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมขั้นตอนตามข้อ 5.2.1 และ ข้อ 5.2.2โดยเติมสารมาตรฐานผสมของสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด ในตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์จำนวน 3 ซ้ำ ของแต่ละการทดสอบ ที่ความเข้มข้นดังนี้

- 5 µg/kg สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- 400 µg/kg สำหรับ DON, 15-AcDON, FusX และ NIV
- 80 µg/kg สำหรับT-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA
- 300 µg/kg สำหรับ FB1 และ FB2
- 10 µg/kg สำหรับ ZEN
- 200 µg/kg สำหรับ 3-AcDON

เทียบกับกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย (solution calibration curve, SCC) ที่ 6 ความเข้มข้นดังนี้

- 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5 และ 5 ng/mL สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- 2, 4, 8, 16, 40 และ 80 ng/mL สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA
- 10, 20, 40, 80, 200 และ 400 ng/mL สำหรับ DON, NIV, FusX และ 15-AcDON
- 7.5, 15, 30, 60, 150 และ 300 ng/mL สำหรับ FB1 และ FB2
- 5, 10, 20, 40, 100 และ 200 ng/mL สำหรับ 3-AcDON
- 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 ng/mL สำหรับ ZEN

จากนั้นนำมาคำนวณค่าความแม่น (accuracy) จากค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) และค่าความเที่ยง (precision) จากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) โดยพิจารณาเกณฑ์การประเมิน %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% และ %RSD ≤ 20% ของเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของสหภาพยุโรป (SANTE/12682/2019, 2019)

โดยการศึกษาการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง และการพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ทำการศึกษาภายใต้สภาวะของเครื่องมือที่เหมาะสมตามข้อ 5.1

6. การพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์

เมื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้ตามเกณฑ์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการยืนยันประสิทธิภาพของวิธีโดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยดำเนินการตามขั้นตอนของเกณฑ์การประเมินสมรรถนะของสหภาพยุโรป SANTE/12682/2019 ดังนี้

6.1 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

โดยการเตรียมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อราในตัวทำละลาย 20% MeOH ตามข้อ 5.2.2 เปรียบเทียบกับในสิ่งสกัดข้าวโพดสำหรับสัตว์เตรียมโดยเติมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อราหลังจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างข้อ 4.1.9 จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น (matrix-match calibration curve, MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 0.125-5 ng/mL สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 ที่ความเข้มข้น 2-80 ng/mL สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA ที่ความเข้มข้น 10-400 ng/mL สำหรับ DON, NIV, FusX และ 15-AcDON ที่ความเข้มข้น 7.5-300 ng/mL สำหรับ FB1 และ FB2 ที่ความเข้มข้น 5-200 ng/mL สำหรับ 3-AcDON และ ที่ความเข้มข้น 0.25-10 ng/mL สำหรับ ZEN และประเมินจาก %signal suppression and enhancement (%SSE) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย ซึ่งค่าการยอมรับอยู่ระหว่าง 80-120% (SANTE/12682/2019, 2019)

$$\%SSE = \frac{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย}} \text{x } 100$$

6.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

สร้างกราฟมาตรฐานในตัวละลาย ประกอบด้วย 6 ระดับความเข้มข้น ตามข้อ 6.1โดยกราฟมาตรฐานจะสร้างระหว่างแกน y คือ area ratio ระหว่างสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อราแต่ละชนิด กับ ^{13}C-ISTD ยกเว้น FuSX และ NEO และ แกน X คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อราแต่ละชนิด ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($y = mx + c$) และ ประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995 ($r \geq 0.995$) (สุจิตรา, 2555) เพื่อกำหนดเป็นค่าความเข้มข้นที่ใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์

6.3 ค่าการทวนซ้ำของการวัด (repeatability)

ทดสอบโดยเตรียมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์จำนวน 5 ซ้ำ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น จากนั้นเตรียมตัวอย่างโดยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ความแม่นของการทวนซ้ำได้ของการวัด (repeatability) พิจารณาจาก $\%RSD_r$ ของแต่ละระดับความเข้มข้น ดังนี้

- 1.25, 5 และ 25 µg/kg สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- 20, 80 และ 400 µg/kg สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA
- 100, 400 และ 2000 µg/kg สำหรับ DON, NIV, FusX และ 15-AcDON

- 75, 300 และ 1500 µg/kg สำหรับ FB1 และ FB2
- 50, 200 และ 1000 µg/kg สำหรับ 3-AcDON
- 2.5, 10 และ 50 µg/kg สำหรับ ZEN

$$\%RSD_r = \frac{\text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ}} \times 100$$

โดยผ่านเกณฑ์การประเมินที่ %RSD ≤ 20 (SANTE/12682/2019, 2019)

6.4 ค่าการทำซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์จำนวน 15 ซ้ำ 3 ระดับความเข้มข้นตามข้อ 6.3 โดยทำการวิเคราะห์ต่างวัน และต่างผู้วิเคราะห์ พิจารณาจาก $\%RSD_{wr}$ โดยผ่านเกณฑ์การประเมินที่ $\%RSD_{wr} \leq 20$ (SANTE/12682/2019, 2019)

$$\%RSD_{wr} = \frac{\text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ}} \times 100$$

6.5 ความแม่น (accuracy) พิจารณาจาก %recovery

ทดสอบโดยนำข้อมูลมาจากการทดสอบในข้อ 6.3

$$\%recovery = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (µg/kg)}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง (µg/kg)}} \times 100$$

โดยผ่านเกณฑ์การประเมินที่ %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% (SANTE/12682/2019, 2019)

6.6 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ)

6.6.1 การทดสอบหาค่า LOD

ค่า LOD สามารถประมาณได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ spike sample ที่ให้ค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนมากกว่าหรือเท่ากับ 3:1 (signal-to-noise, S/N ≥ 3:1) (Sulyok *et al.*, 2007) ซึ่งทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อราจำนวน 10 ซ้ำลงในตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์ เตรียมตัวอย่างโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้นดังนี้

- 0.125 µg/kg สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- 0.25 µg/kg สำหรับ ZEN
- 2 µg/kg สำหรับ DAS, T-2 และ NEO
- 2.5 µg/kg สำหรับ OTA
- 5 µg/kg สำหรับ HT-2 และ 3-AcDON

- 9.375 µg/kg สำหรับ FB1 และ FB2
- 10 µg/kg สำหรับ 15-AcDON, DON และ NIV
- 12.5 µg/kg สำหรับ FusX

โดย LOD ได้จากความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N ≥ 3:1 และ ค่า ion ratio อยู่ระหว่าง ±30% เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (SANTE/12682/2019, 2019)

6.6.2 การทดสอบหาค่า LOQ

การทดสอบหาค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อราจำนวน 10 ซ้ำลงในตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์ เตรียมตัวอย่างโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความความเข้มข้นเทียบเท่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน (Dzuman *et al.*, 2014) ดังนี้

- 0.625 µg/kg สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- 1.25 µg/kg สำหรับ ZEN
- 10 µg/kg สำหรับ DAS, T-2, NEO, HT-2 และ OTA
- 25 µg/kg สำหรับ 3-AcDON
- 37.5 µg/kg สำหรับ FB1 และ FB2
- 50 µg/kg สำหรับ 15-AcDON, DON, NIVและ FusX

โดย LOQ ได้จากความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N ≥ 10:1, ion ratio อยู่ระหว่าง ±30%, %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% และ %RSD ≤ 20% (SANTE/12682/2019, 2019)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

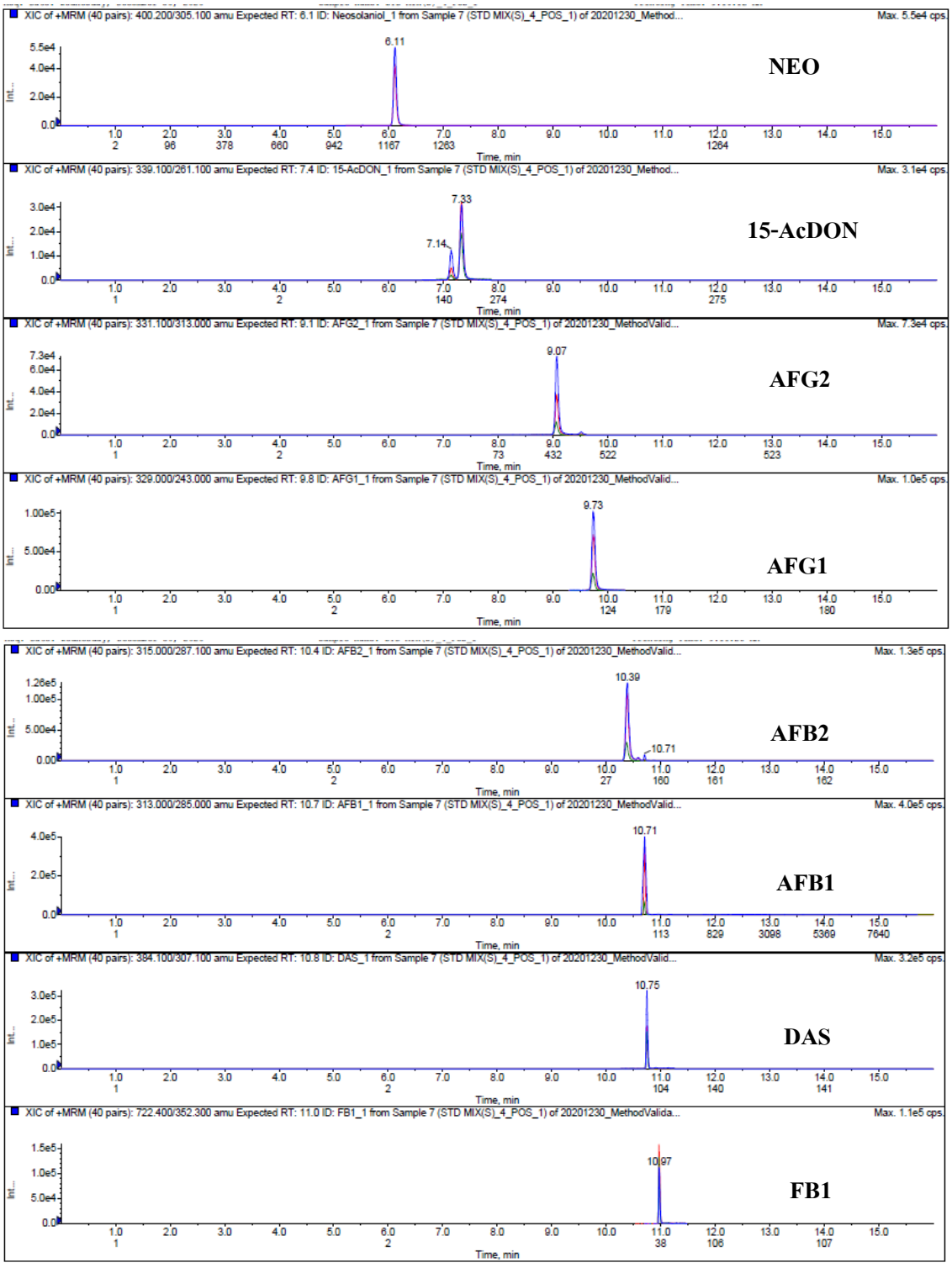
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ LC-MS/MS

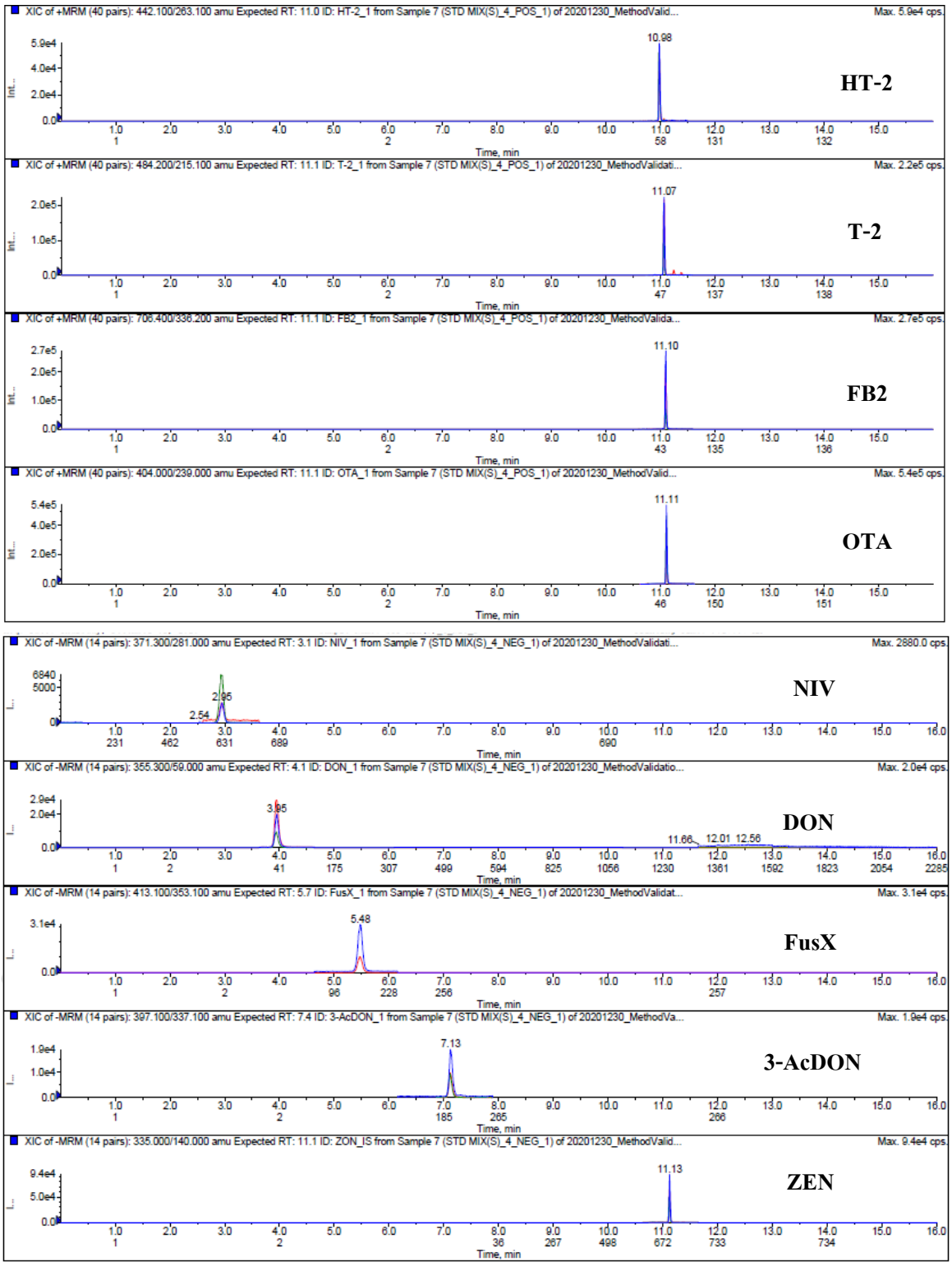
การวิเคราะห์ใน positive ionization mode พบว่า เมื่อใช้ ammonium formate buffer เป็น mobile phase สารพิษจากเชื้อรากลุ่ม AFs ทั้ง 4 ชนิด ให้สัญญาณสูงกว่า 10 เท่า เมื่อเทียบกับสารละลายของ acetate buffer นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม FBs, type A trichothecenes, OTA ให้โครมาโทแกรมที่ดีและสัญญาณที่สูงกว่า 3-4 เท่า เมื่อใช้ ammonium formate buffer เป็น mobile phase เกิดเป็น protonate adduct $[M+H]^+$ สำหรับ AFs, FBs, OTA, และ 15-AcDON และเกิดเป็น ammonium adduct $[M+NH_4]^+$ สำหรับ type A trichothecenes ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dzuman และคณะ (2014); Lacina และคณะ (2012) ที่ใช้ ammonium formate buffer ใน MeOH และ DI water เป็น mobile phase สำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่ม AFs, type A trichothecenes, FBs, OTA ในอาหารสัตว์ และธัญพืช ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งพบว่าให้สัญญาณสูงเช่นเดียวกัน

การวิเคราะห์ใน negative ionization mode พบว่า เมื่อใช้ ammonium acetate buffer เป็น mobile phase สารกลุ่ม type B trichothecenes ได้แก่ DON, NIV, FusX และ 3-AcDON จะสามารถเกิด acetate adduct $[M+CH_3COO]^-$ และให้สัญญาณที่สูง เช่นเดียวกับสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม ZEN ก็ให้สัญญาณที่สูงซึ่งถูกตรวจวัดในแบบ deprotonate form $[M-H]^-$ เมื่อเทียบกับการตรวจวัดโดยใช้ positive ionization ด้วย ammonium formate buffer ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Malachova และคณะ (2014); Sulyok และคณะ (2007) ที่ใช้ ammonium acetate buffer ใน MeOH และ DI water เป็น mobile phase สำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่ม type B trichothecenes และ ZEN ในข้าวโพด เฮเซนนัท แอปเปิ้ลบด และพริกหยวกด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งพบว่าให้สัญญาณสูงเช่นเดียวกัน

โดยในการศึกษาครั้งนี้ ได้ข้อสรุปในการเลือกใช้ mobile phase คือ ใช้ 5 mM ammonium formate ที่มี 0.1% formic acid ใน DI water และ MeOH สำหรับการทำ positive ionization สำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 12 ชนิด ได้แก่ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, 15-AcDON, FB1, FB2, T-2, HT-2, NEO, DAS และ OTA และใช้ 5 mM ammonium acetate ที่มี 0.1% acetic acidใน DI water และ MeOH สำหรับการทำ negative ionization สำหรับสารพิษจากเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ DON, NIV, 3-AcDON, FusX และ ZEN นอกจากนี้เพื่อเป็นการรักษา ionic strength ของการแยก และรักษา retention time ให้มีความคงที่ จะใช้การชะสารในแบบ gradient elution โดย **รูปที่ 1** แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด ในตัวทำละลาย ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/mL สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 ; 16 ng/mL สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA ; 80 ng/mL สำหรับ DON, 15-AcDON, NIV และ FusX ; 60 ng/mL สำหรับ FB1 และ FB2 ; 2 ng/mL สำหรับ ZEN และ 40 ng/mL สำหรับ 3-AcDON ตามลำดับ ตาม **ตารางที่ 3** แสดงสภาวะที่เหมาะสมของ MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา และ ^{13}C-ISTD



รูปที่ 1 โครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด และ ^{13}C-ISTD 15 ชนิด



รูปที่ 1 โครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐานสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด และ ^{13}C-ISTD 15 ชนิด (ต่อ)

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมของ MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด

Compounds	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	RT (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
AFB1	313.0 $[M+H]^+$	285.0*	10.71	136.00	6.20	33.00	20.00
	313.0	241.0		136.00	6.20	51.00	20.00
$^{13}C_{17}$-AFB1	330.1	255.1	10.71	94.50	7.65	50.25	13.48
AFB2	315.0 $[M+H]^+$	287.1*	10.39	141.00	5.07	37.00	20.00
	315.0	259.0		141.00	5.07	41.00	24.00
$^{13}C_{17}$-AFB2	332.1	303.2	10.39	97.10	7.59	36.83	25.01
AFG1	329.0 $[M+H]^+$	243.0*	9.73	138.00	7.77	34.00	20.00
	329.0	200.0		138.00	7.77	51.00	18.00
$^{13}C_{17}$-AFG1	346.2	212.1	9.73	99.9	4.9	54.23	18.07
AFG2	331.1 $[M+H]^+$	313.0*	9.07	136.00	3.87	35.00	18.00
	331.1	189.0		136.00	3.87	57.00	12.00
$^{13}C_{17}$-AFG2	348.1	259.2	9.07	95.89	5.49	43.56	16.08
T-2	484.2$[M+NH_4]^+$	215.1*	10.98	69.93	6.05	25.04	14.81
	484.2	185.1		69.93	6.05	28.91	16.14
$^{13}C_{24}$-T-2	508.3	229.2	10.98	77.55	7.77	26.66	16.82
HT-2	442.1$[M+NH_4]^+$	263.1*	11.07	66.45	4.86	18.03	23.98
	442.1	215.0		66.45	4.86	18.61	24.47
$^{13}C_{22}$-HT-2	464.3	229.1	11.07	69.99	6.10	18.14	17.49
OTA	404.0$[M+H]^+$	239.0	11.11	80.00	5.78	30.93	20.96
	404.0	221.0		80.00	5.78	47.37	16.96
$^{13}C_{20}$-OTA	424.2	250.1	11.11	85.09	7.95	32.30	21.42
FB1	722.4$[M+H]^+$	352.3*	10.97	100.00	10.00	61.00	17.00
	722.4	334.3		100.00	10.00	65.00	17.00
$^{13}C_{34}$-FB1	756.5	356.4	10.97	100.00	10.00	58.00	9.00
FB2	706.4$[M+H]^+$	336.2*	11.10	100.00	10.00	61.00	17.00
	706.4	318.3		100.00	10.00	61.00	15.00
$^{13}C_{34}$-FB2	740.6	358.4	11.10	100.00	10.00	51.00	28.00
DAS	384.1$[M+NH_4]^+$	307.1*	10.75	68.81	7.67	15.64	22.66
	384.1	247.2		68.81	7.67	18.64	17.91
$^{13}C_{19}$-DAS	403.2	324.1	10.75	70.21	5.67	15.59	10.14
15-AcDON	339.1$[M+H]^+$	261.1*	7.33	68.75	6.16	14.20	12.87
	339.1	137.0		68.75	6.16	15.79	19.91
$^{13}C_{17}$-15-AcDON	373.2	338.1	7.33	60.86	8.27	17.58	23.25
Neosolaniol	400.2$[M+NH_4]^+$	305.1*	6.11	64.17	5.94	16.38	9.38
	400.2	215.1		64.17	5.94	23.82	14.87

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมของ MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด (ต่อ)

Compounds	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	RT (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
DON	355.3[M+CH_3COO]$^-$	59.0*	3.95	-58.68	-4.79	-20.37	-17.09
	355.3	295.0		-58.68	-4.79	-13.84	-8.34
$^{13}C_{15}$-DON	370.4	310.1	3.95	-57.72	-2.72	-14.37	-9.14
NIV	371.3[M+CH_3COO]$^-$	281.0*	2.95	-61.69	-2.97	-20.26	-24.79
	371.3	311.0		-61.69	-2.97	-14.29	-20.01
$^{13}C_{15}$-NIV	386.0	295.2	2.95	-50.15	-3.76	-20.60	-8.37
3-AcDON	397.1[M+CH_3COO]$^-$	337.1*	7.13	-60.07	-5.91	-20.22	-9.04
	397.1	307.0		-60.07	-5.91	-12.47	-9.94
$^{13}C_{17}$-3-AcDON	414.0	323.2	7.13	-59.25	-5.60	-20.04	-9.25
ZEN	317.0[M-H]$^-$	175.0*	11.13	-172.91	-3.57	-32.59	-9.20
	317.0	131.0		-172.91	-3.57	-38.00	-13.00
$^{13}C_{18}$-ZEN	335.0	140.0	11.13	-161.92	-8.80	-39.16	-7.28
FusX	413.1[M+CH_3COO]$^-$	353.1*	5.48	-50.00	-10.00	-14.00	-17.00
	413.1	263.0		-50.00	-10.00	-20.00	-17.00

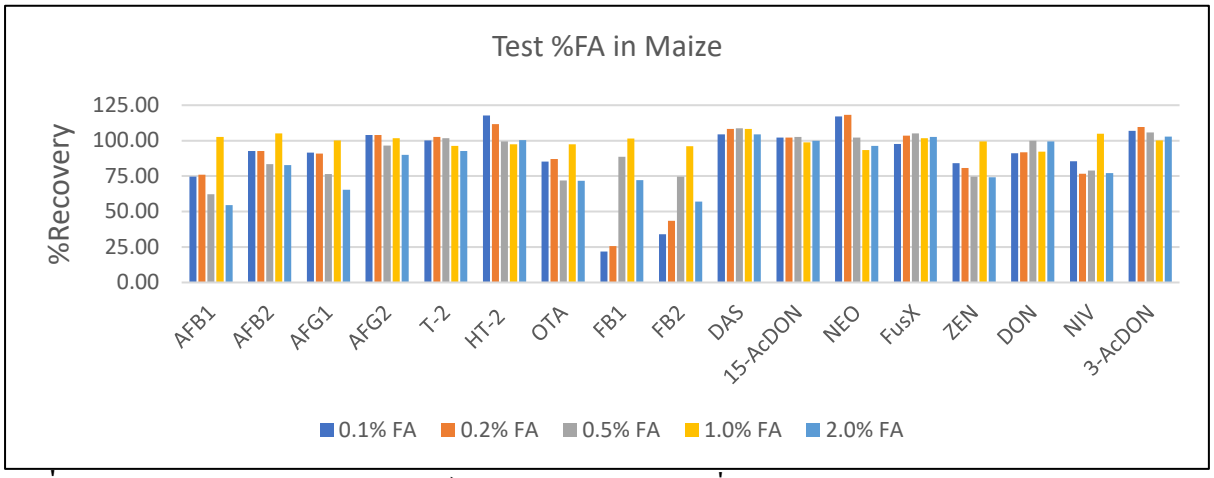
หมายเหตุ * = quantifier

2. การเตรียมตัวอย่าง

2.1 ความเข้มข้นของกรดฟอร์มิก (formic acid, FA) ที่เหมาะสมในการแช่ตัวอย่าง

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง โดยทดสอบความเข้มข้นของ formic acid ในขั้นตอนการแช่ตัวอย่าง (soaking) ก่อนทำการสกัดด้วย ACNโดยการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบที่ 5 ระดับความเข้มข้นของ formic acid ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.5, 1 และ 2% พบว่า FB1 และ FB2 ที่ 0.1 % และ 0.2% formic acid ให้ %recovery มีค่า <45% และ ที่ 2.0% formic acid ให้ %recovery < 60% สำหรับ FB2 นอกจากนี้พบว่า AFB1 มีค่า %recovery < 65% ที่ 0.5 % และ 2 % formic acid ส่วนที่ความเข้มข้น 1% formic acid ให้ %recovery ของสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดอยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วง 70-120% โดยค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 92.4 (DON)- 108.2% (DAS) ซึ่งขั้นตอน soaking ช่วยลดการสูญเสียไปของสารที่จะวิเคราะห์บางชนิด ที่มีความไวต่อ pH และช่วยเพิ่ม %recovery อย่างมีนัยสำคัญสำหรับสารพิษจากเชื้อราที่มีขั้วสูงได้แก่ NIV และมีคุณสมบัติเป็นกรด ได้แก่ FB1, FB2, OTA และ AFB1 รวมถึงการสกัดสารพิษจากเชื้อราจากตัวอย่างที่มี pH สูง (Lacina *et al*., 2012; Mol *et al*., 2008; Romero-González *et al*., 2011)

ทั้งนี้ได้เลือกใช้ 1% formic acid ซึ่งให้ %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับในช่วง 70-120%โดยค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 92.4 (DON)-108.2% (DAS) ตาม**รูปที่ 2** สำหรับแช่ตัวอย่างในการเตรียมตัวอย่างในการพิสูจน์ความใช้ได้ต่อไป

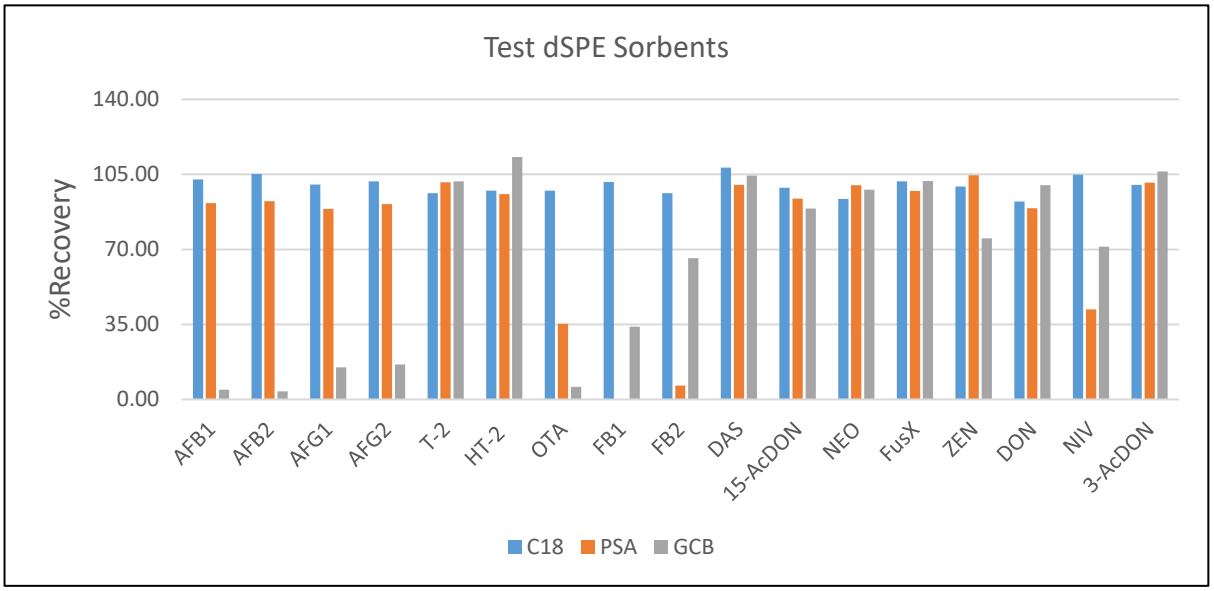


รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นของกรดฟอร์มิกในการสกัดตัวอย่างที่5 ระดับความเข้มข้น0.1, 0.2,0.5, 1 และ 2%

2.2 ชนิดของ dSPE ในการ clean-up ตัวอย่าง

ในการทดสอบชนิดของ dSPE ที่เหมาะสมในขั้นตอน clean-upได้แก่ PSA, GCB และ C18 ร่วมกับการดึง aqueous phase ใน organic phase ออกจากสิ่งสกัดด้วย $MgSO_4$ พบว่า เมื่อใช้ GCB% recovery ของสารพิษจากเชื้อราบางชนิดมีค่าต่ำ ได้แก่ AFB1 (4.6%), AFB2 (3.8%), AFG1 (14.9%), AFG2 (16.4%), OTA (5.9%), FB1(33.9%) และ FB2 (65.9%) ซึ่งเป็นไปตามคุณสมบัติของ GCB ในการเกิด strong affinity กับสารจำพวก polar aromatic และ planar molecules (Anastassiades *et al.*,2003) อย่างไรก็ดี GCB ให้ผล %recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ 70-120% ของสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม trichothecenes ที่ %recovery อยู่ระหว่าง 71.3(NIV)-113.1%(T-2) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dzuman และคณะ (2014) ที่พบว่าการใช้ GCB จะดูดซับสารพิษจากเชื้อราบางชนิด ได้แก่ OTA, AFs และ ZEN มากถึง 80-110% ส่งผลให้ %recovery ต่ำสำหรับการใช้ primary secondary amine (PSA) พบว่า สารพิษจากเชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็นกรดและมีขั้วให้ %recovery ในระดับต่ำ ได้แก่ OTA (35.3%), NIV (42%), FB1(0%) และ FB2 (6.5%) ซึ่งเป็นไปตามคุณสมบัติของ PSA ในการเกิด strong affinity กับสารจำพวก organic acid, polar pigment และ sugar (Anastassiades *et al.*,2003; Zachariasova *et al.*,2010) อย่างไรก็ดี PSA ให้ผล %recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ70-120% ของสารพิษจากเชื้อรากลุ่มอื่นๆ ที่ %recovery อยู่ระหว่าง 88.9 (AFG1)-104.6% (ZEN) ตามลำดับ

ส่วนการใช้ C18 ในการ clean-up พบว่า %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 70-120%สำหรับสารพิษจากเชื้อราทั้ง 17 ชนิด อยู่ระหว่าง 92.4 (DON)-108.2% (DAS) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dzuman และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าในการ clean-up ด้วย C18 มีการดูดซับสารพิษจากเชื้อราบางชนิดในระดับต่ำ ได้แก่ enniatins (30-40%) และ ergot alkaloids (10%) นอกจากนี้ยังสามารถขจัดสิ่งรบกวนจาก เมทริกซ์ประเภท non-polar di- และ triglycerides ในตัวอย่างประเภท DDGS และ อาหารสัตว์ สามารถยืดอายุการใช้งาน HPLC column ให้ยาวนานขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ dSPE ชนิด C18 ร่วมกับ $MgSO_4$ ในขั้นตอน clean-up ของการเตรียมตัวอย่างเพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ต่อไปรายละเอียดตาม **รูปที่ 3**



รูปที่ 3 ผลการทดสอบ dSPE ทั้ง 3 ชนิดในขั้นตอนการ clean-up ตัวอย่าง

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1. ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ทำการศึกษาผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่มักเกิดขึ้นและควรหาวิธีหลีกเลี่ยงเนื่องจากส่งผลกระทบต่อความสามารถในการทำ ionization ด้วยเทคนิค ESI ของเครื่องแมสสเปกโทรเมทรี ซึ่งการศึกษานี้ใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard, ISTD) ซึ่งได้เลือกใช้ internal standards ของสารพิษจากเชื้อรา จำนวน 15 ชนิด ด้วยเทคนิคการเจือจางไอโซโทปที่เสถียร (stable isotope dilution assay, SIDA) พบว่าสามารถช่วยลด matrix effect ได้อย่างมีประสิทธิภาพยกเว้น FusX และ NEO เนื่องจากไม่มีจำหน่ายตามท้องตลาด แต่อย่างไรก็ดีก็ไม่พบว่ามี matrix effect ของสารดังกล่าวอยู่นอกเกณฑ์การยอมรับ โดยพบว่า %SSE อยู่ในช่วง 95.3 (AFG2, AFB1)-97.2% (AFB2) สำหรับ AFs, 97.0 (HT-2)-111.7% (NEO) สำหรับ type A trichothecenes, 94.2 (DON)-99.5% (FusX) สำหรับ type B trichothecenes, 93.5(FB1)-93.3%(FB2) สำหรับ FBs, 101.4% สำหรับ OTA และ 101.9% สำหรับ ZEN ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 80-120% (SANTE/12682/2019, 2019) ดังนั้น จึงเลือกใช้ solvent solution calibration ร่วมกับ ISTD เป็นกราฟมาตรฐาน ยกเว้น FusX และ NEO จะใช้กราฟมาตรฐานที่ไม่มี ISTD ในการพิสูจน์ความใช้ได้ต่อไปรายละเอียดตาม **ตารางที่ 4**

2. ความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบประเมินโดยการสร้างกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย (solvent calibration curve) 6 ระดับความเข้มข้น ที่ระดับความเข้มข้น 0.125-5 ng/mL สำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 ที่ความเข้มข้น 2-80 ng/mL สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA ที่ความเข้มข้น 10-400 ng/mL สำหรับ DON, NIV, FusX และ 15-AcDON ที่ความเข้มข้น 7.5-300 ng/mL สำหรับ FB1 และ

FB2 ที่ความเข้มข้น 5-200 ng/mL สำหรับ 3-AcDON และ ที่ความเข้มข้น 0.25-10 ng/mL สำหรับ ZEN โดยผลของทุกสารมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) อยู่ระหว่าง 0.9962 (HT-2)-0.9996 (AFG1) ซึ่งผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด ($r \geq 0.995$) (สุจิตรา, 2555) รายละเอียดตาม **ตารางที่ 4**

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) และความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

Mycotoxin	Calibration slope		%SSE	Calibration range, ng/mL	*r*
	Matrix-match	Standard solution			
AFB1	2.7979	2.9345	95.3	0.125-5	0.9981
AFB2	1.3862	1.4255	97.2	0.125-5	0.9994
AFG1	1.6145	1.6812	96.0	0.125-5	0.9996
AFG2	2.1898	2.2977	95.3	0.125-5	0.9990
T-2	0.0819	0.0800	102.3	2-80	0.9970
HT-2	0.0436	0.0450	97.0	2-80	0.9962
OTA	0.0255	0.0252	101.3	2-80	0.9983
FB1	0.0504	0.0539	93.5	7.5-300	0.9976
FB2	0.1725	0.1849	93.3	7.5-300	0.9979
DAS	0.1042	0.1039	100.3	2-80	0.9993
15-AcDON	0.0161	0.0173	93.1	10-400	0.9993
NEO	13926.6	12464.9	111.7	2-80	0.9994
FusX	1983.0	1992.9	99.5	10-400	0.9972
ZEN	0.3145	0.3086	101.9	0.25-10	0.9995
DON	0.0288	0.0306	94.2	10-400	0.9992
NIV	0.0044	0.0046	96.3	10-400	0.9993
3-AcDON	0.0197	0.0199	98.7	5-200	0.999

3. ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยงแสดงโดยค่า %RSD โดยพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงการยอมรับคือ ≤20% โดยค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (repeatability) โดยค่า %RSDr อยู่ระหว่าง 0.40 (FusX)-18.47% (15-AcDON) และค่าการทวนซ้ำได้ของการวัด (within-laboratory reproducibility) โดยค่า %RSDwr อยู่ระหว่าง 0.96 (NIV)-13.66% (15-AcDON) รายละเอียดตาม**ตารางที่ 5**

4. ความแม่น (accuracy)

ความแม่นของวิธีทดสอบแสดงโดยค่า %recovery พบว่าสารพิษจากเชื้อราทุกชนิดมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 70-120% โดยค่า %recovery อยู่ในช่วง 83.7 (OTA)-108.8% (AFB1) รายละเอียดตาม **ตารางที่ 5**

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (precision) และ ความแม่น (accuracy)

Mycotoxin	Spike level (µg/kg)	Repeatability (%RSDr), (%recovery)			Within-lab reproducibility (%RSDwr), (%recovery) (n=15)
		day 1(n=5)	day 2(n=5)	day 3(n=5)	
AFB1	1.25	2.93 (99.6)	6.79 (98.1)	4.46 (98.2)	4.66 (98.6)
	5	4.17 (106.8)	3.21 (110.5)	4.11 (109.2)	3.85 (108.8)
	25	4.35 (101.7)	3.05 (102.1)	1.50 (106.7)	3.68 (103.5)
AFB2	1.25	4.05 (96.0)	4.20 (97.0)	3.79 (93.2)	4.12(95.4)
	5	2.25 (110.5)	3.20 (102.9)	2.06 (108.0)	3.84 (107.1)
	25	3.46 (102.2)	2.60 (97.2)	1.36 (101.0)	3.31 (100.1)
AFG1	1.25	2.86 (95.7)	2.44 (98.0)	5.09 (98.4)	3.61(97.4)
	5	2.16 (105.7)	1.33 (106.5)	1.31 (108.0)	1.79 (106.7)
	25	1.73 (101.2)	1.19 (103.2)	2.40 (103.6)	2.02 (102.7)
AFG2	1.25	1.52 (96.9)	1.94 (98.5)	2.72 (95.9)	2.27 (97.1)
	5	2.27 (105.5)	0.99 (106.4)	1.96 (106.8)	1.77(106.2)
	25	0.78 (102.2)	1.42 (102.5)	1.21 (101.6)	1.14(102.1)
15-AcDON	100	3.00 (98.3)	16.56 (92.2)	18.47 (89.1)	13.66 (93.2)
	400	3.15 (106.8)	3.36 (101.4)	1.50 (99.2)	4.14 (102.5)
	2000	1.04 (102.6)	0.80 (98.6)	1.76 (98.1)	2.38(99.8)
T-2	20	3.52 (94.2)	5.73 (99.6)	4.03 (97.6)	4.87 (97.1)
	80	1.50 (103.4)	2.40 (104.6)	5.93 (103.6)	3.55 (103.9)
	400	3.46 (97.2)	0.86 (102.8)	1.77 (101.0)	3.16 (100.3)
HT-2	20	2.23 (101.5)	6.09 (102.5)	4.38 (93.5)	5.95 (99.2)
	80	3.40 (107.1)	4.62 (101.3)	4.19 (110.0)	5.15 (106.1)
	400	0.83 (100.3)	3.33 (99.2)	3.03 (101.4)	2.61 (100.3)
DAS	20	4.20 (95.8)	3.33 (100.4)	2.55 (102.6)	4.33 (99.6)
	80	1.91 (102.8)	4.97 (106.7)	1.01 (104.2)	3.34 (104.6)
	400	2.02 (102.8)	3.04 (102.6)	2.67 (105.0)	2.66 (103.5)
NEO	20	2.83 (102.8)	2.00 (98.9)	1.81 (98.4)	2.95 (100.0)
	80	1.00 (104.8)	0.93 (103.2)	2.37 (103.1)	1.66 (103.7)
	400	0.99 (105.9)	0.96 (102.9)	1.15 (102.0)	1.91 (103.6)
OTA	20	2.13 (75.7)	0.92 (89.6)	3.43 (85.8)	7.56 (83.7)
	80	2.42 (102.2)	2.56 (106.6)	5.83 (104.2)	4.07(104.4)
	400	1.70 (104.5)	1.70 (104.2)	1.95 (106.2)	1.86 (104.9)
FB1	75	6.34 (94.2)	3.23 (97.7)	3.34 (92.8)	4.75(94.9)
	300	3.19 (98.9)	3.40 (103.1)	3.57 (100.5)	3.61 (100.8)
	1500	2.94 (97.7)	2.40 (98.4)	2.45 (102.6)	3.30(99.6)
FB2	75	2.69 (103.7)	4.12 (99.5)	7.61 (103.6)	5.25 (102.3)
	300	3.34 (105.2)	4.29 (99.4)	3.29 (104.0)	4.20 (102.8)
	1500	4.71 (105.7)	4.80 (102.3)	4.99 (102.2)	4.76(103.4)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยง (precision) และ ความแม่น (accuracy) (ต่อ)

Mycotoxin	Spike level (µg/kg)	Repeatability (%RSDr), (%recovery)			Within-lab reproducibility (%RSDwr), %recovery (n=15)
		day 1(n=5)	day 2(n=5)	day 3(n=5)	
FusX	100	1.28 (100.4)	3.43 (106.3)	1.32 (92.9)	6.07 (99.9)
	400	1.36 (98.3)	0.40 (100.4)	1.14 (89.9)	4.97 (96.2)
	2000	0.48 (98.8)	0.83 (99.4)	0.74 (87.4)	6.04 (95.2)
ZEN	2.5	1.06 (95.7)	6.98 (96.7)	12.02 (93.3)	7.53 (95.2)
	10	1.22 (107.2)	2.52 (104.9)	1.05 (105.3)	7.53 (105.8)
	50	1.39 (101.9)	2.10 (101.0)	1.46 (101.5)	1.60 (101.5)
DON	100	3.84 (109.8)	7.81 (107.2)	7.46 (106.4)	6.25 (107.8)
	400	2.25 (107.6)	3.22 (106.4)	4.14 (105.2)	3.18 (106.4)
	2000	1.12 (100.4)	2.23 (98.5)	1.66 (98.7)	1.82 (99.2)
NIV	100	3.36 (100.9)	4.18 (102.6)	3.63 (102.0)	3.54 (101.8)
	400	1.43 (107.0)	1.29 (110.1)	1.94 (107.7)	1.92 (108.3)
	2000	0.51 (103.2)	0.48 (103.8)	1.55 (103.4)	0.96 (103.4)
3-AcDON	50	2.26 (101.1)	3.87 (105.1)	6.62 (94.2)	6.25 (100.1)
	200	1.39 (103.9)	1.15 (108.7)	1.90 (105.8)	2.38 (106.1)
	1000	0.79 (100.8)	2.51 (107.3)	1.32 (105.4)	3.15 (104.5)

5. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ)

โดยค่า LOD ของสารพิษจากเชื้อรามีค่าอยู่ระหว่าง 0.125 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)-12.5 (FusX) µg/kg และค่า LOQ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.625 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) – 50 (DON, NIV, 15-AcDON, FusX) µg/kg ตามลำดับ โดยรายละเอียดค่า LOD และ LOQ ของสารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด ตาม **ตารางที่ 6**

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detections, LOD) และผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ)

Mycotoxin	LOD		LOQ		
	Concentration (µg/kg)	S/N	Concentration (µg/kg)	%Recovery	%RSD
AFB1	0.125	96	0.625	95.2	11.9
AFB2	0.125	108	0.625	111.2	3.7
AFG1	0.125	220	0.625	107.7	6.2
AFG2	0.125	104	0.625	96.7	9.2
15-AcDON	10	81	50	106.6	5.1
T-2	2	46	10	106.1	10.1
HT-2	5	96	10	90.4	18.9
DAS	2	46	10	107.8	7.7
NEO	2	273	10	103.0	6.0
OTA	2.5	171	10	86.8	9.3
FB1	9.375	178	37.5	87.3	12.6
FB2	9.375	294	37.5	87.2	8.5
FusX	12.5	42	50	97.7	3.5
ZEN	0.25	44	1.25	84.5	13.0
DON	10	33	50	105.7	5.8
NIV	10	26	50	104.5	4.7
3-AcDON	5	22	25	100.7	10.9

วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ได้ดำเนินการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของสหภาพยุโรป (SANTE/12682/2019, 2019)โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดสำหรับสัตว์ทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ โดย 1 ชุดประกอบด้วย 5 ตัวอย่าง ซึ่งเติมสารพิษจากเชื้อราทั้ง 17 ชนิด ตัวอย่างละ 3 ระดับความเข้มข้น ตามข้อ 6.3 รวมทั้งสิ้น 15 ซ้ำ โดยทำการวิเคราะห์ต่างวัน ต่างผู้วิเคราะห์ โดยค่าของแต่ละตัวแปรตามแนวทางของสหภาพยุโรป ผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในข้าวโพดสำหรับสัตว์ ซึ่งพบว่า ค่าความแม่นหรือค่าร้อยละการกลับคืน ค่าความเที่ยงหรือค่าการทวนซ้ำของการวัดในแต่ละชุดการทดสอบ ค่าการทำซ้ำได้ของแต่ละระดับความเข้มข้นทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ ผ่านเกณฑ์การประเมินทุกพารามิเตอร์

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิด ได้แก่ AFB1, AFB2, AFG1, AFG2,FB1, FB2, OTA, T-2,DAS, HT-2, NEO, NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, FusX และ ZEN ในข้าวโพดสำหรับสัตว์ โดยใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS โดยเริ่มจากการแช่ตัวอย่าง (soaking) ด้วย 1% FA และสกัดตัวอย่าง (extraction) ด้วย ACN โดยใช้เกลือ $MgSO_4$ และ NaCl ในการ salting out แล้ว clean-up ตัวอย่างด้วย dSPE ชนิด C18 จากนั้นเติม ^{13}C-ISTD ของสารพิษจากเชื้อรา 15 ชนิด ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวทางของสหภาพยุโรป (SANTE/12682/2019, 2019) โดยมีช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงสำหรับ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.125-5 ng/mL สำหรับ T-2, HT-2, DAS, NEO และ OTA ที่ความเข้มข้น 2-80 ng/mL สำหรับ DON, NIV, FusX และ 15-AcDON ที่ความเข้มข้น 10-400 ng/mL สำหรับ FB1 และ FB2 ที่ความเข้มข้น 7.5-300 ng/mL สำหรับ 3-AcDON ที่ความเข้มข้น 5-200 ng/mL และสำหรับ ZEN ที่ความเข้มข้น 0.25-10 ng/mL โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) อยู่ระหว่าง 0.9962 (HT-2)-0.9996 (AFG1) ค่าความแม่น โดย %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% ค่าความเที่ยง โดย %RSD <20% ค่า LOD อยู่ระหว่าง 0.125-12.5 µg/kg ค่า LOQ อยู่ระหว่าง 0.625-50 µg/kg และ matrix effectโดย %SSE อยู่ระหว่าง 80-120% ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์ดังกล่าว จึงทำให้วิธีนี้มีความเหมาะสมในการตรวจยืนยันชนิดและปริมาณสารพิษจากเชื้อราทั้ง 17 ชนิดในข้าวโพดสำหรับสัตว์

ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตควรนำวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 17 ชนิดในข้าวโพดสำหรับสัตว์ที่ได้พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีแล้วไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดอื่นๆ และอาหารสัตว์สำเร็จรูป นอกจากนี้ยังควรพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรากลุ่มอื่น ได้แก่ เออร์กอด อัลคาลอยด์ (ergot alkaloids) สารพิษจากเชื้อราอุบัติใหม่ (emerging mycotoxins) รวมถึงสารพิษจากพืช (plant toxins) ในตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ และอาหารสัตว์สำเร็จรูป เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนได้ครอบคลุมตามมาตรฐานสากลและสถานการณ์ปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2559. **ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดลักษณะอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพพ.ศ. 2559**ราชกิจจานุเบกษาเล่ม 133/ตอนพิเศษ 99 ง/หน้า 1-2/3 พฤษภาคม 2559

รักไทยงามภักดิ์, วนิดาแจ้งประจักษ์, วีระอิ้งสะอาดและนารถตยาชมนารถ. 2563. **เรื่องการเฝ้าระวังสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์**แหล่งที่มา: http://qcontrol.dld.go.th, 16 เมษายน พ.ศ. 2564

สุจิตรา พงศ์วิวัฒน์.2555**. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC.สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธีคัดกรอง.** สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

Anastassiades, M., S. Lehotay, D. štajnbaher and F. Schenck. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **J. of AOAC Int.** Vol. 86, 412-431.

AOAC (2016). Official Methods of Analysis, 20th Ed. 2016, **AOAC INTERNATIONAL**, Method 2001.04 And 2003.02.

Commission Regulation Directive 2002/32/EC of the European parliament and of the council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. **Official Journal of the European Communities**., L140, 1-20

Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence ofdeoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in productsintended for animal feeding. **Official Journal of the European Communities**., L229, 7–9

Dzuman, Z., M. Stranska-Zachariasova, O. Lacina, Z. Veprikova, P.Slavíková and J. HajšLová.(2014) A rugged high-throughput analytical approach for the determination andquantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. **Talanta,** 121, 263-272.

Dzuman, Z., M. Zachariasova, Z.Veprikova, M.Godula and J. Hajslova. (2015). Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. **Anal Chim Acta**, 863, 29-40.

Kongkapan, J., S. Poapolathep, S.Isariyodom, S. Kumagai and A.Poapolathep. (2016) Simultaneous detection of multiple mycotoxins in broiler feeds using a liquidchromatography tandem-mass spectrometry. **J. Veter-Med.Sci.,** 78(2), 259–264.

Lacina, O., M. Zachariasova, J. Urbanova, M. Vaclavikova, T. Cajka and J. Hajslova. (2012).Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination ofpesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employingultra-highperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1262, 8-18.

Li, W.T. J., Herrman and S. Y. Dai. (2011). Determination of aflatoxins in animal feeds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with isotope dilution. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 25,1222–1230.

Malachová, A., M. Sulyok, E.Beltrán, F. Berthiller and R. Krska. (2014). Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A***,* 1362, 145-156.

Mallet, C. R., Z. Lu and J. R. Mazzeo. (2004). A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 18(1),49-58.

Mol, H., P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T. Rijk, A. A. M. Stolker and P.P. J. Mulder. (2008). Toward A Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Anal. Chem.** (Vol. 80).9450-9459.

Neumann, G., G. A. Lombaert, S. Kotello and N.Fedorowich. (2009) Determination of deoxynivalenol in soft wheat by immunoaffinity column cleanup and LC-UV detection: interlaboratory study. **J. of AOAC Int.**92:181–189

Rice, L. G. and F. B. Ross. (1994). Method for detection and quantification of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. **J. Food Prot.** 57: 36–40.

Romero-González, R., A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, O. D. Prestes and S. L. Grio. (2011). Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1218(11), 1477-1485.

SANTE, J. European Commission Document No. SANTE/12682/2019. (2019) GuidanceDocument on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures forPesticides Residues Analysis in Food and Feed.

Stuber, M. and T. Reemtsma. (2004). Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. **Anal Bioanal Chem***,* 378(4), 910-916.

Souverain, S., S. Rudaz and J. L. Veuthey. (2004). Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, 1058(1), 61-66

Sulyok, M., R. Krskaand R. Schuhmacher.(2007). Application ofa liquid chromatography-tandem mass spectrometric method tomulti-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation ofmatrix effects. **Food Addit. Contam.**24,1184–1195.

Sulyok, M., R. Krska and R. Schuhmacher.(2007). Aliquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method forthe quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Anal.Bioanal. Chem.** 389, 1505–1523.

Trufelli, H., P. Palma, G. Famiglini and A. Cappiello. (2011). An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews***,* 30(3), 491-509.

Wang, S., M. Cyronak and E. Yang. (2007). Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?: A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***,* 43(2), 701-707.

Varga, E., T. Glauner, R.Köppen, K. Mayer, M.Sulyok, R. Schuhmacher, R.Krska and F.Berthiller. (2012) Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins inmaize by UHPLC-MS/MS. **Anal.Bioanal. Chem.,** 402, 2675–2686.

Visconti, A., V. M. T. Lattanzio, M. Pascale and M. Haidukowski. (2005). Analysis of T-2 and HT-2 toxinsin cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, 1075(1), 151-158.

Zachariasova, M., O. Lacina, A. Malachova, M. Kostelanska, J.Poustka, M. Godula and J. Hajslova. (2010). Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra-performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, 662(1), 51-61.

Zachariasova, M., Z. Dzuman, Z. Veprikova, K. Hajkova, M. Jiru, M. Vaclavikova, A. Zachariasova, M. Pospichalova, M. Florian and J. Hajslova. (2014). Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Anim. Feed Sci. Technol**, 193, 124-140.

Zhang, K., J. W. Wong, P. Yang, K. Tech, A. L. DiBenedetto, N. S. Lee and A. Schreiber. (2011). Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using Acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up, and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(14), 7636-7646.