

การวิเคราะห์สารพิษซิทรินิน (Citrinin) ในข้าวแดง ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

ชนัญญา ช่วยศรีนวล
นักวิจัยปฏิบัติการ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารพิษซิทรินิน (Citrinin) เป็นสารทุติยภูมิที่สร้างโดยเชื้อราหลากหลายสกุล ได้แก่ เชื้อราสกุล *Penicillium* (*P. expansum*, *P. verrucosum*), *Aspergillus* (*A. terreus*) และ *Monascus* (*M. ruber*) (Bragulat et al., 2008) สารพิษชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและสัตว์โดยมีผลต่อตับ ไต ไชกระดูก และกระบวนการ เมตาบอลิซึมภายในเซลล์โดยจะแทรกเข้าไปในไมโทคอนเดรียแล้วเปลี่ยนแปลงสมดุล แคลเซียมทำให้เซลล์เกิดความผิดปกติ (Chagas et al., 1995) มักพบสารพิษชนิดนี้ปนเปื้อนในธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี และกาแฟ ปัจจุบันคนนิยมบริโภคข้าวแดงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักข้าวโดยเชื้อรา *Monascus* เนื่องจากผลิตภัณฑ์ข้าวแดงมีสารเมแทบอไลต์หลายชนิด เช่น สารสีในกลุ่มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Monascus* ในระหว่างการหมักข้าวแดงเชื้อราจะสร้างสารพิษซิทรินินควบคู่ไปด้วย ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมปริมาณซิทรินินให้มีอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งข้อกำหนดของ European Union Commission (EU) ได้อนุญาตให้มีสารซิทรินินในผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมข้าวแดงไม่เกิน 2,000 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ดังนั้นการศึกษาหาวิธีในการตรวจสอบสารพิษชนิดนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อใช้ควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษซิทรินินเพื่อให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมข้าวแดง

ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการแยกและตรวจวัดปริมาณสารพิษ เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารในปริมาณต่ำได้ และเป็นวิธีการตรวจสอบที่มีความถูกต้องและแม่นยำ สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบการสร้างสารพิษซิทรินินในข้าวแดงด้วยเทคนิค HPLC สามารถทำได้ดังนี้

1. การสกัดแยกสารซิทรินิน

ชั่งตัวอย่างข้าวแดงบดละเอียดน้ำหนัก 1 กรัม ลงในพลาสติก เติมน้ำละลายเอทานอล 70% (v/v) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำตัวอย่างมา sonicate เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker อีกครั้ง ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) โดยใช้ความเร็วรอบ 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดสีชา เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารซิทรินินด้วย HPLC

2. การเตรียมสารมาตรฐานซิตรีนิน

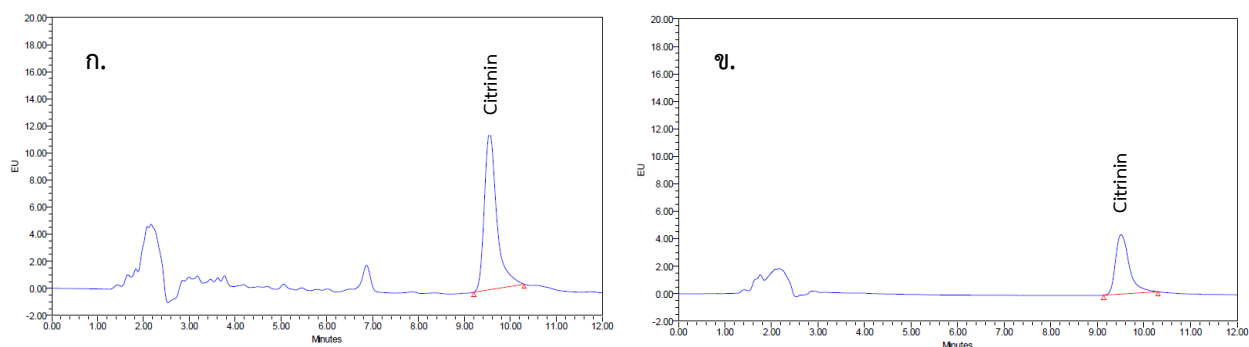
เตรียมสารมาตรฐานซิตรีนินความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น Working standard สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ฉีดสารมาตรฐานซิตรีนินความเข้มข้นคือ 5, 10, 20, 60, 100 และ 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ส่วนวิธีการเตรียมสารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 1 โดยค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Correlative coefficient, R^2) ของกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.995

ตารางที่ 1 วิธีเตรียมสารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานซิตรีนิน

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานซิตรีนิน (ng/ml)	สารมาตรฐานซิตรีนิน (μ l)	เมทานอล (μ l)
5	5	995
10	10	990
20	20	980
60	60	940
100	100	900
200	200	800

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารซิตรีนินโดยวิธี HPLC-FLD

วิเคราะห์สารพิษซิตรีนิน โดยฉีดสารสกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร (Injection) เข้า HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm \times 4.6 mm \times 5.0 μ m) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำปราศจากไอออน pH 2.5 (ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก) : อะซีโตไนไตรล์ (50:50) (v/v) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาวิเคราะห์ 12 นาที โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดสารแบบฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ความยาวคลื่น Excitation wavelength 331 นาโนเมตร และ Emission wavelength 500 นาโนเมตร สำหรับ HPLC chromatogram ของสารซิตรีนินแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานซิตรีนิน (ก) และสารซิตรีนินที่ปนเปื้อนในข้าวแดง (ข)

เอกสารอ้างอิง

Chagas, G. M., M. B. M. Oliveira, A. P. Campello and M. L. W. Kluppel. 1995. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria IV-Effect on Ca^{2+} transport. **Cell Biochem Funct.** 13: 53–59.

Bragulat M.R., E. Martínez, G. Castellá and F. J. Cabañes. 2008. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. **Int J Food Microbiol.** 126:43-8.