# การตรวจสอบสารพิษซีราลีโนนในธัญพืชโดยวิธี Immunoaffinity column ร่วมกับ High Performance Liquid Chromatography

ชนัญญา ช่วยศรีนวล
นักวิจัยปฏิบัติการ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซีราลีโนน (Zearalenone) เป็นสารพิษในกลุ่ม Non-steroidal estrogen ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงสามารถไปแย่งจับหรือกระตุ้น estrogen receptor ในร่างกายของสัตว์ทำให้ร่างกายของสัตว์เกิดความผิดปกติ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบต่าง ๆ ภายในตัวสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบสืบพันธุ์ (Kuntan *et al.,* 2021) สารพิษชนิดนี้สร้างจากเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* ได้แก่ *Fusarium culmorum* และ *Fusarium graminearum* การปนเปื้อนเชื้อราส่วนใหญ่พบในข้าวโพด และธัญพืชต่างๆ เช่นข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง เป็นต้น (Ma *et al.,* 2018) เชื้อรากลุ่มนี้นอกจากจะเป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษซีราลีโนนแล้วยังเป็นราโรคพืชในธัญพืชด้วย ซึ่งจะเจริญสร้างความเสียหายได้ตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยวและภายหลังการเก็บเกี่ยวด้วย เชื้อราที่ผลิตสารพิษซีราลีโนนมักจะเจริญและสร้างสารพิษได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ทำให้เป็นปัญหาในประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่น ในประเทศไทยถึงแม้สภาพอากาศจะไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราสร้างสารพิษซีราลีโนน แต่ก็มีรายงานว่าพบซีราลีโนนในเขตร้อน และประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการนำเข้าวัตถุดิบธัญพืชบางชนิด ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารซีราลีโนน จึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อใช้ในการควบคุม ป้องกัน และแก้ปัญหาการปนเปื้อนให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยวิธีที่ถูกต้องแม่นยำ และ ควบคุมคุณภาพผลการทดสอบให้ได้มาตรฐานที่ถูกต้อง

**1. การสกัดสารพิษซีราลีโนนและการขจัดสิ่งปนเปื้อน (Clean up) ด้วยวิธี Immunoaffinity column**

1.1 ชั่งตัวอย่างธัญพืชบดละเอียด 25 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ใส่ลงในโถปั่นตัวอย่าง

1.2 เติมอะซีโตไนไตรล์ 75 % ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วสูง ครั้งละ 1 นาที 2 ครั้ง แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

1.3 ดูดสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์ (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

1.4 ดูดสารละลายตัวอย่างเจือจางข้อ 1.3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกฉีดยาที่ต่อเข้ากับอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ ปล่อยให้สารละลายไหล ด้วยอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที และล้างด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาไลน์ (PBS) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อนาที

1.5 เติมเมทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เพื่อชะ (Elute) ซีราลีโนนออกจากอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ ชะคอลัมน์อีกครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

## 2. การเตรียมสารมาตรฐานซีราลีโนน

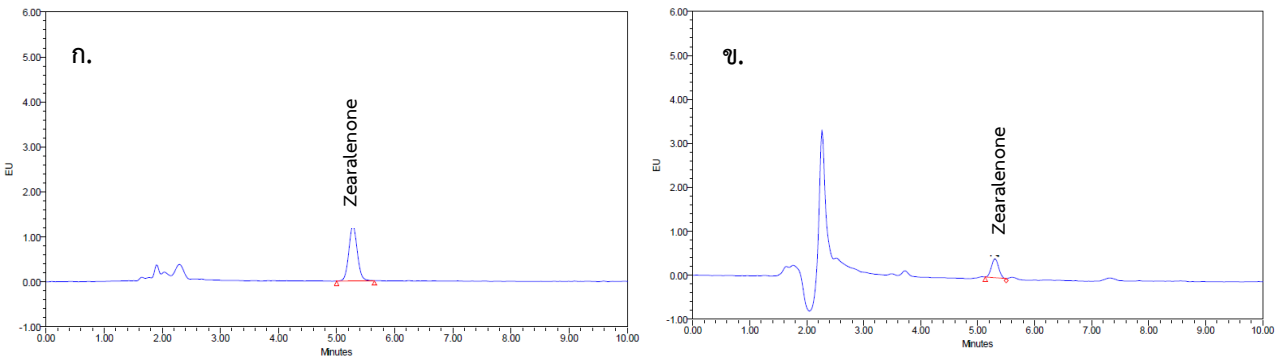
เตรียมสารมาตรฐานซีราลีโนนความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น Working standard สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 250 และ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร การเตรียมสารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังตารางที่1

**ตารางที่ 1** วิธีเตรียมสารละลายสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานซีราลีโนน

| ความเข้มข้นของสารมาตรฐานซีราลีโนน (ng/ml) | สารมาตรฐานซีราลีโนน (µl) | เมทานอล (µl) |
|---|---|---|
| 25 | 25 | 975 |
| 50 | 50 | 950 |
| 100 | 100 | 900 |
| 250 | 250 | 750 |
| 500 | 500 | 500 |

## 3. การวิเคราะห์สารพิษซีราลีโนนโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

ฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าในระบบ HPLC สภาวะสำหรับการวิเคราะห์ซีราลีโนนใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นอะซีโตไนไตรล์: น้ำปราศจากไอออน: เมทานอล: (50:40:10) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาวิเคราะห์ 10 นาที ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 mm × 4.6 mm × 5.0 µm) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดสารแบบฟลูออเรสเซนต์ ใช้ความยาวคลื่น Excitation wavelength 276 นาโนเมตร และ Emission wavelength 440 นาโนเมตร สำหรับ HPLC chromatogram ของสารซีราลีโนนแสดงดังภาพที่ 1




**ภาพที่ 1** HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานซีราลีโนน (ก) และสารซีราลีโนนที่ปนเปื้อนในธัญพืช (ข)

**เอกสารอ้างอิง**

Ma, R., Zhang L., Meng L., S. Yong-Teng, X. Wen-Mei, Z. Ni-Ya, D. Jie-Fan, W. Yun, A. R. Shahid, Q. De-Sheng, A. K. Niel and S. Lv-Hui. 2018. Individual and Combined Occurrence of Mycotoxins in Feed Ingredients and Complete Feeds in China. **Toxins** 10(3): 113

Kuntan, W., R. Chenxi, G. Yangfan, X. Gao, S. A. Rajput, Q. Desheng and S. Wang. 2021. The insensitive mechanism of poultry to zearalenone: A review. **Animal Nutrition.** 7:3