

การสกัดแยกสารพิษซิตรีนินในธัญพืชด้วยเทคนิค QuEChERS ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography

ชนัญญา ช่วยศรีนวล

นักวิจัย ชำนาญการ

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก.

สารซิตรีนิน (Citrinin) เป็นสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin) ที่มีพิษต่อไต ซึ่งสร้างขึ้นโดยเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium citrinum*, *Aspergillus terreus* และ *Monascus purpureus* โดยมักตรวจพบสารนี้ในเมล็ดธัญพืช ข้าว ข้าวโพด ถั่ว ที่เก็บรักษาไม่ดี รวมถึงในอาหารหมักที่มีส่วนประกอบของเชื้อราในกลุ่ม *Monascus* spp. สารพิษซิตรีนินส่งผลให้เกิดภาวะการทำงานของไตผิดปกติและทำลายเนื้อเยื่อในสัตว์ (Murata *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2024) ทั้งนี้สหภาพยุโรปได้กำหนดเกณฑ์ปริมาณสูงสุดของสารซิตรีนินไว้ที่ไม่เกิน 100 µg/kg ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนประกอบของข้าวยีสต์แดงและสาธารณรัฐเกาหลีได้กำหนดเกณฑ์ไว้ที่ไม่เกิน 50 µg/kg ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันทั้งในสหภาพยุโรป สาธารณรัฐเกาหลี สหรัฐอเมริกา หรือประเทศอื่นๆยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์ปริมาณสูงสุดสำหรับสารซิตรีนินในกลุ่มธัญพืชหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปมาจากธัญพืช การสกัดสารพิษซิตรีนินในธัญพืชด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมนิยมใช้การสกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) แต่พบปัญหาสารรบกวนจากตัวอย่างสูงมาก (Matrix Interference) ส่งผลให้ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าความเป็นจริงมาก ปัจจุบันมีการนำเทคนิค QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) มาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารพิษซิตรีนินในธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวแดง (Red yeast rice) และ ข้าวโพด จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมต่อไป เช่น TLC, HPLC และ LC-MS/MS ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยเทคนิค QuEChERS มีประสิทธิภาพและแม่นยำกว่า เป็นวิธีเตรียมตัวอย่างที่รวดเร็วและใช้สารเคมีน้อย

การใช้เทคนิค QuEChERS ในการสกัดแยกสารพิษซิตรีนิน (Maneeboon *et al.*, 2024)

- ขั้นตอนการสกัด (Extraction)

นำตัวอย่างธัญพืชมาบดละเอียด ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 5 กรัม ใส่ลงใน Falcon tube เติมน้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer นาน 2 นาที แล้วเติมอะซิโตนไทรล์ที่มีกรดฟอร์มิก (5%, v/v) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่านาน 2 นาที

- **ขั้นตอนการทำ Salting out**

เติม MgSO_4 4 กรัม NaCl 1 กรัม tri-sodium citrate 1 กรัม และ sodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม เขย่านาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm เป็นระยะเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนในมากรองผ่าน 0.45 μm syringe membrane filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

- **ขั้นตอนการการวิเคราะห์ปริมาณสารซิทรินินโดยวิธี HPLC-FLD**

วิเคราะห์สารพิษซิทรินิน โดยฉีดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Injection) เข้า HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 mm $\times$ 3.9 mm $\times$ 5.0 μm) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำปราศจากไอออน pH 2.5 (ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก) : อะซีโตไนไตรล์ (40:60) (v/v) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลาวิเคราะห์ 10 นาที โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดสารแบบฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ความยาวคลื่น Excitation wavelength 331 นาโนเมตร และ Emission wavelength 500 นาโนเมตร

การทดสอบความใช้ของวิธีการวิเคราะห์

ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษเชื้อราซิทรินินในตัวอย่างด้วยวิธี HPLC ตามหลักเกณฑ์ของ AOAC (2002) เพื่อแสดงความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ การทดสอบความสามารถของการวิเคราะห์จะทำการทดสอบค่าต่างๆ ได้แก่ ช่วงของวิธีวิเคราะห์ (Range) ค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ (Limit of detection; LOD) ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of quantitation; LOQ) ความถูกต้อง (Accuracy) และ ความแม่นยำ (Precision) โดยการ Spike sample blank ด้วยสารมาตรฐานซิทรินิน จำนวน 3 ความเข้มข้นๆ ละ 5 ข้ำ ลงในตัวอย่างข้าวที่ใช้เป็นตัวแทนของธัญพืช ผลการทดสอบความใช้ได้ ได้แก่ ช่วงของการวิเคราะห์ ค่า R^2 ค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ (Limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of quantification, LOQ) แสดงดังตารางที่ 1

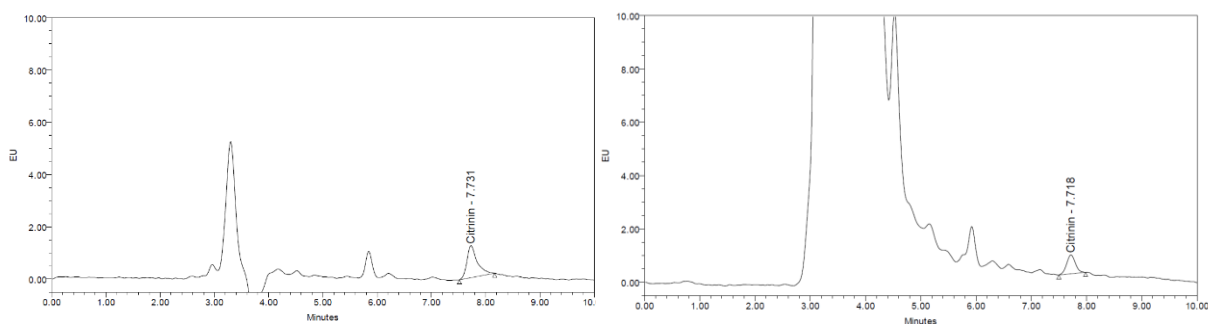
ตารางที่ 1 ช่วงของการวิเคราะห์ ค่า R^2 ค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษซิทรินินด้วย HPLC

Mycotoxins	Range (ng/ml)	R^2	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
Citrinin	2 - 80	0.9987	1.80	3.00

ตารางที่ 2 ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สารพิษเชื้อราในตัวอย่างข้าว

Mycotoxins	Spiking level ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery (%) (mean $\pm$ SD)	RSDr (%)
Citrinin	10	103.11 $\pm$ 0.36	0.35
	50	100.05 $\pm$ 3.53	3.52
	100	102.38 $\pm$ 1.11	1.08

สำหรับผลการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวที่เติมสารมาตรฐานซิตรีนิน จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 100.05- 103.11 แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ สอดคล้องกับเกณฑ์การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของ AOAC (2002) เรื่องความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นของสาร $>1-10 \mu\text{g/kg}$ และ $>10-100 \mu\text{g/kg}$ ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 60-120 และ 70-110 ตามลำดับ สำหรับผลการประเมินความแม่นยำของวิธีทดสอบโดยใช้ค่า RSDr (%) ของการวิเคราะห์สารที่ระดับความเข้มข้น $>1-10 \mu\text{g/kg}$ และ $>10-100 \mu\text{g/kg}$ ซึ่งตามเกณฑ์มาตรฐานของ CODEX ต้องมีค่า ≤ 30 และ ≤ 20 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าวิธีทดสอบนี้มีความแม่นยำเนื่องจากค่า RSDr (%) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.35 – 1.08 สำหรับโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานของสารพิษเชื้อราซิตรีนิน แสดงดังภาพที่ 1 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์สารพิษซิตรีนินในข้าวด้วยวิธี HPLC มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วเพียงพอสำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษเชื้อราซิตรีนินในตัวอย่างธัญพืช



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สารพิษซิตรีนินในตัวอย่างข้าวด้วยวิธี HPLC

ก: สารมาตรฐานซิตรีนินความเข้มข้น $10 \mu\text{g/kg}$

ข: ตัวอย่างสารพิษซิตรีนินในตัวอย่างข้าวที่เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 2000. **Official Methods of Analysis of AOAC International Volumn II**. 17th ed. Horwitz, W. Editor. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
- Maneeboon, T., W. Mahakarnchanakul and Chananya Chuaysrinule. 2024. Evaluating dietary exposure and risk characterization of aflatoxin B1, citrinin, and ochratoxin A co-occurrence in pigmented rice consumed in Thailand. **Journal of Food Composition and Analysis** 136: 106755.
- Murata, Y., S. Hemmi, Y. Akiya, K. Miyasato, H. Kobayashi, T. Maruyama and M. Abe. 2024. Certain red yeast rice supplements in Japan cause acute tubulointerstitial injury. **Kidney Int. Rep.** 9 (9):2824–2828.
- Shin, J. M., H. C. Mira, J. K. Choi, K. Jihye, K. Dahee, B. L. Jae, K. Hyunjeong and P. Jusung. 2026. Development and validation of a QuEChERS–LC–MS/MS method using an isotope-labelled internal standard for the determination of citrinin in red yeast rice-based supplements and cereals. **Journal of Food Composition and Analysis**. 153:109094
- Xu, W., L. Xiang, Y. Chen, Y. Zhao, S. Liao, Y. Li, B. Tunyaluk, and L. Lin. 2024. Risk assessment of citrinin in Chinese dark tea and inhibitory effects of tea polyphenols on citrinin production. **LWT** 205:116527.