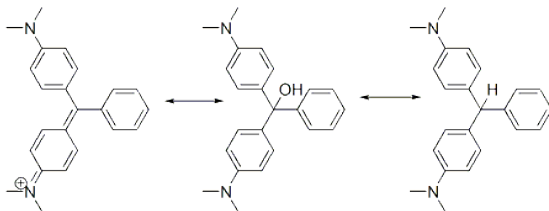


การตรวจวัดระดับ Malachite Green และ Leucomalachite Green ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากเนื้อปลาด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้จัดทำ: ฤทธิชัย เจริญทรัพย์นันต์ , จิตนภา วรรณดิกุล, ทศพล อนุกุลวิทยา

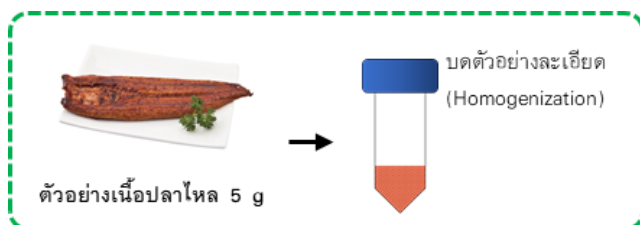
Malachite Green (MG) เป็นสาร Triphenylmethane Dye ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดย MG นี้เมื่อเข้าสู่กระบวนการ Metabolism จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ Leucomalachite Green (LMG) [รูปที่ 1] ซึ่งจะสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นไขมันของปลา สารทั้งสองล้วนแล้วแต่เป็นสารก่อโรคมะเร็ง ดังนั้นจึงถูกห้ามใช้ในอุตสาหกรรมประมงทั้งในสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรป อย่างไรก็ตามยังคงมีการตรวจพบสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลา โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์ MG และ LMG สามารถทำได้ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ที่ต่อพ่วง UV-Visible หรือ Fluorescence Detector รวมไปถึง Mass Spectrometry อย่างไรก็ตามการใช้ UV-Visible และ Fluorescence ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Selectivity) ที่ต่ำ จึงทำให้การใช้ Mass Spectrometry เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำและได้มาตรฐานมากที่สุด



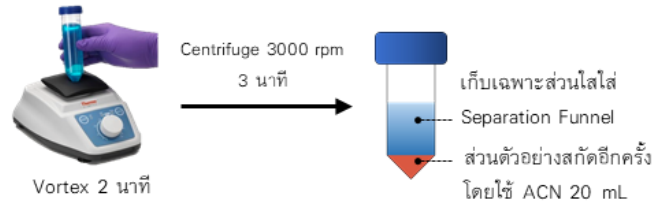
Malachite Green

Leucomalachite Green

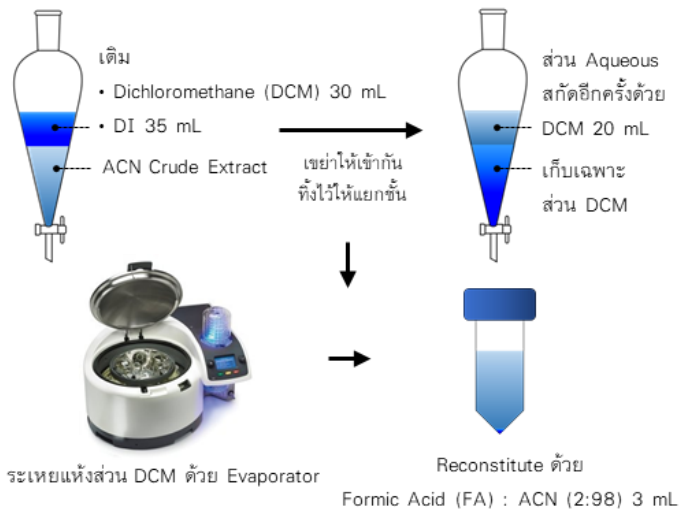
การเตรียมตัวอย่าง



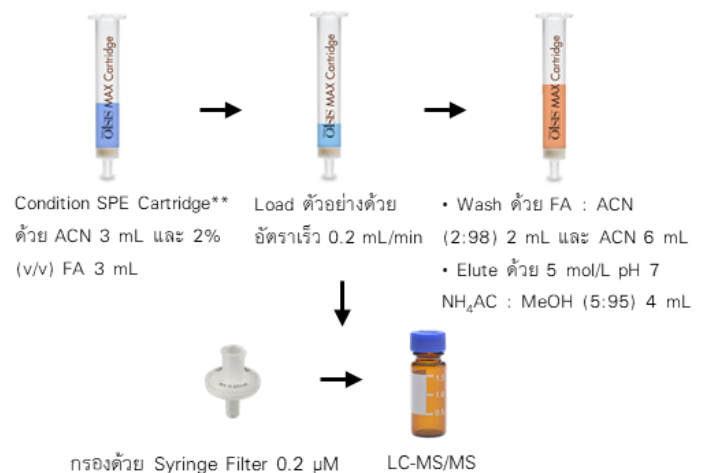
- เติมสารละลายดังนี้
- 1 µg/mL d6-LMG (ISTD) 50 µL
 - 0.25 g/L Hydroxylamine Hydrochloride 1 mL
 - 0.05 mol/L p-toluenesulfonic acid 1 mL
 - 0.1 mol/L NH₄Ac-Hac Buffer pH 4.5 2 mL
 - Acetonitrile (ACN) 40 mL



การสกัดด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction)



Solid Phase Extraction (SPE)



**Note

- ใช้ Oasis 60 mb/3cc MCX (Water, USA) กับตัวอย่างเนื้อปลาไหลทั่วไป
 - ใช้ Superclean 60mg/3cc LC-Alumina N (Water, USA) กับตัวอย่างปลาไหลที่มีไขมันสูง
- Condition ด้วย ACN 3 mL / Load ตัวอย่างและเก็บส่วน Elute / Wash ด้วย ACN 3 mL และเก็บส่วน Elute ไปรวมกับส่วน Elute ก่อนเติมด้วย FA 120 µL

เครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS

- Thermo Scientific™ Ultimate 3000™ UHPLC
- Hypersil Gold™ CN (5 µm, 2.1 x 50 mm) Column
- Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ Mass Spectrometer
- LC Conditions และ SRM Transitions (ดังตารางด้านล่าง)

Column Temp.	Ambient		
Injection Vol.	10 µL		
Flow Rate	220 µL/min		
Mobile Phases	A: 0.1% Formic Acid in Water B: Methanol		
Gradient	Time(min)	%A	%B
	0.0	70	30
	2.0	10	90
	6.0	10	90
	6.1	70	30
	10.0	70	30

Compound	Retention Time (Min)	Precursor (m/z)	Targeted (m/z)	Confirming (m/z)
MG	5.13	329.1	313	208
LMG	4.09	331.3	239	316
d ₆ -LMG (IS)	4.06	337.2	240	-

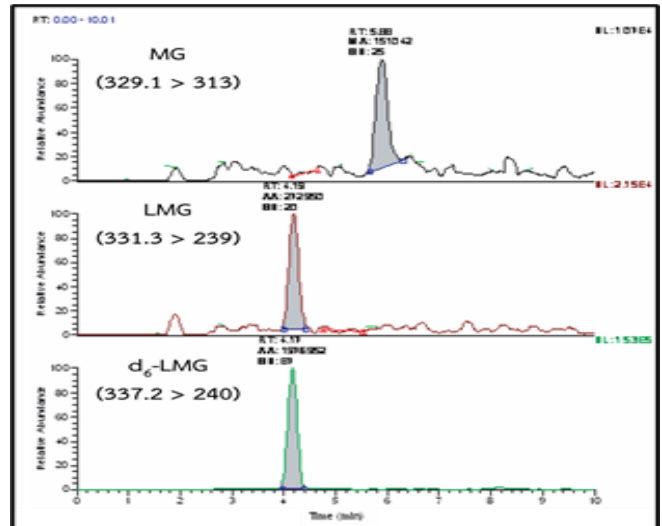
ผลการตรวจวิเคราะห์

จากรูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของ MG, LMG และ IS ของตัวอย่างเนื้อปลาไหลย่าง ซึ่งภายหลังจากผ่านการสกัดแล้วมีการ Spike สารมาตรฐาน MG 0.02 pg/µL, LMG 0.05 pg/µL และ IS 1 pg/µL ผลการวิเคราะห์มีค่า LOQ ที่ 0.1 pg สำหรับ MG และ 0.5 pg สำหรับ LMG ซึ่งเทียบเท่ากับ 0.004 และ 0.02 µg/kg ในเนื้อปลาไหลย่าง ค่าตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นค่าต่ำกว่าเกณฑ์การตกค้างที่กำหนดโดยกรมประมง (มีระดับการปนเปื้อนของ MG และ LMG รวมไม่เกิน 0.8 µg/kg)

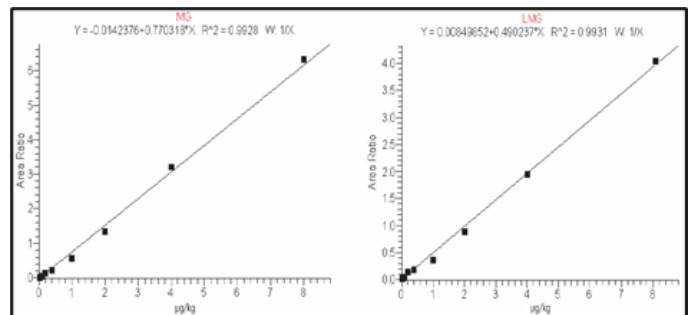
เส้นกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.05 ถึง 8.0 µg/kg มีค่า R² > 0.99 [รูปที่ 3] การประเมินความถูกต้องแม่นยำของวิธีการสกัด และตรวจวิเคราะห์พิจารณาโดยการวิเคราะห์เนื้อปลาไหลย่างที่มีปริมาณความเข้มข้นของ MG และ LMG ที่ 1, 2 และ 5 µg/kg ซึ่งเทียบเท่ากับ 0.5, 1 และ 2.5 เท่า ของค่า MRPL (ทำซ้ำ 7 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น) [ตารางที่ 1] พบว่ามีค่า Recovery สูงกว่า 90 ถึง 106% โดยมีค่า %RSD ตั้งแต่ 3.7 ถึง 11%

Spike (µg/kg)	1.0	2.0	5.0
MG	95 (5.8)	101 (3.7)	90 (7.5)
LMG	106 (7.0)	94 (11)	92 (4.7)

ตารางที่ 1 ค่า %Recovery และ %RSD (ในวงเล็บ) ของ MG และ LMG ในตัวอย่างเนื้อปลาไหลย่าง (n=7)



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของตัวอย่างเนื้อปลาไหลย่างที่มี MG และ LMG ความเข้มข้น 0.02 และ 0.05 pg/µL



รูปที่ 3 เส้นกราฟมาตรฐานของตัวอย่างเนื้อปลาไหลย่างที่มี MG และ LMG ความเข้มข้น 0.05 ถึง 8.0 µg/kg

ติดตามแอปพลิเคชันอื่น ๆ ได้ที่ <https://www.scispec.co.th>



บริษัท ชายนี สเปค จำกัด
10 กาญจนภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02-454-8533



/scispec



@scispec

ThermoFisher
SCIENTIFIC