

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ aflatoxin M₁ โดยวิธี Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

สรลลี้ รักเนตรสาคร¹ นริศรา สีมันตะ¹ ภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว¹ ไกรวุฒิ นวลขาว¹

บทคัดย่อ

สารอะฟลาทอกซินเอ็ม₁ (AFM₁) จัดอยู่ในกลุ่มสารพิษจากเชื้อรา ซึ่งปนเปื้อนมากับน้ำนมของโคนม เนื่องจากสารพิษชนิดนี้เป็นอันตรายเมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณมากส่งผลต่อการบริโภคของมนุษย์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสำคัญต่อการวิเคราะห์ โดยเลือกใช้เทคนิคที่มีความถูกต้องและความไว คือการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดแมสสเปกโตรเมทรี โดยอาศัยการทำให้บริสุทธิ์ (clean-up) ด้วยเทคนิค immunoaffinity column แล้วชะ (Elute) ตัวอย่างด้วยอะซิโตนไตรลต่อเมทานอลอัตราส่วน (3:2) และน้ำปราศจากไอออน สุดท้ายเติมสารมาตรฐานภายในที่เป็นไอโซโทปชนิดคาร์บอน-13 แล้วทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินเอ็ม₁ (AFM₁) ในตัวอย่างน้ำนมดิบ ตามแนวทางของสหภาพยุโรป (SANTE/12682/2019) ซึ่งพบว่า ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 250 ถึง 5,000 นาโนกรัมต่อลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.990 ส่วนผลกระทบจากเมทริกซ์ที่ประเมินได้จากค่า %signal suppression and enhancement ได้ค่าเท่ากับ 103.28 %, ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด เท่ากับ 1.00 และ 5.00 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ, ค่าร้อยละการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารในตัวอย่างที่ปริมาณ 5, 20, 100 นาโนกรัมต่อลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 71.11 - 94.44 % และ 2.69 - 9.19 % ตามลำดับ ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับ FAPAS ในตัวอย่างนมผง พบว่าค่า z-score ปี 2018, 2019, 2020 และ 2022 มีค่าเท่ากับ 0.1, -0.1, -1.0 และ -1.4 ส่วนการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีทดสอบ โดยประมาณจากค่าความไม่แน่นอนขยาย พบว่าได้ 38.857% จากค่าพารามิเตอร์ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบอะฟลาทอกซินเอ็ม₁ (AFM₁) ในน้ำนมดิบ

คำสำคัญ : การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์, อะฟลาทอกซินเอ็ม₁, LC-MS/MS, น้ำนมดิบ

¹ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

Method validation of aflatoxin M₁ in raw milk by LC-MS/MS

Saralee Raknetsakorn¹ Narissara Seemunta¹ Panuwat Sungpethkaew¹ Kraiwut Nualkaw¹

Abstract

Aflatoxin M₁ is a group of mycotoxins contaminated in dairy cattle. It could affect to digestion system when excess consumption. Therefore, this work will focus on the on the analysis. The appropriate technique providing an accuracy and sensitivity was liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based on clean- up method by using immunoaffinity column technique and eluting samples with acetonitrile:methanol (3:2) and DI water. Finally adding to ¹³C-ISTD of aflatoxin M₁. The method validation for determination of aflatoxin M₁ in raw milk was validated according to SANTE/12682/2019. The method produced good linearity in range 250-5,000 ng/L of standard solution were obtained with the coefficient of correlation (r) value being greater than 0.990. The matrix effects were evaluated from %signal suppression and enhancement (SSE) was 103.28 %. Limit of detection and limit of quantitation were 1 and 5 ng/L, respectively. The recovery and relative standard deviation values were spiked in the sample at concentration of 5, 20, 100 ng/L in the ranges of 71.11 - 94.44 % and 2.69 - 9.19 %, respectively. The results of the proficiency testing with FAPAS in milk powder samples showed in 2018, 2019, 2020 and 2022 that z-scores were 0.1, -0.1, -1.0 and -1.4. Estimated from the expanded uncertainty, it was found that 38.857%. All acceptability requirements based on the validation parameters of analytical techniques suggest that the approach is appropriate for determination of aflatoxin M₁ in raw milk.

Keywords : method validation, aflatoxin M₁, LC-MS/MS, raw milk

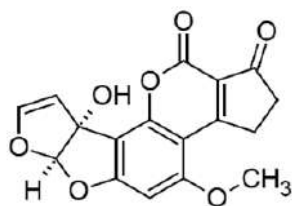
¹Feed Quality Control Division, Bureau of Quality Control of Livestock Product

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

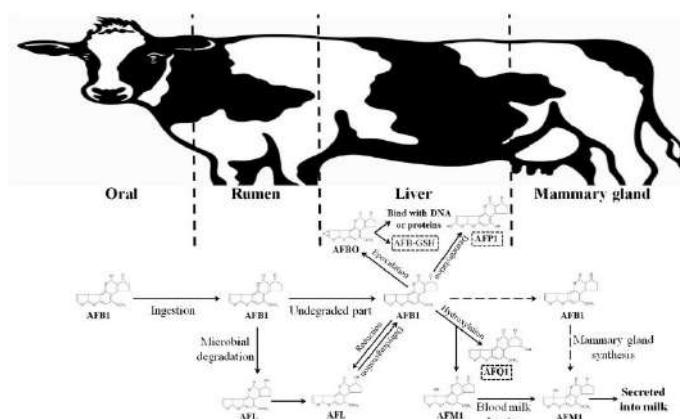
บทนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) คือ สารพิษที่ผลิตจากเชื้อรา (mycotoxin) สร้างจากเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งเชื้อราสองชนิดนี้สร้างสารพิษในสภาวะที่อาหารมีความชื้น (moisture content) สูง มีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (water activity) มากกว่า 0.93 และอุณหภูมิค่อนข้างสูง (25-30 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีความเป็นพิษสูง อีกทั้งพบว่าเป็นสารปนเปื้อนในอาหารสัตว์ทั่วโลก โดยองค์การวิจัยมะเร็งเรื้อรังนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer, IARC) ได้จัดสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ อะฟลาทอกซิน บี₁ (AFB₁) และอะฟลาทอกซิน เอ็ม₁ (AFM₁) เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Fan et al., 2015)

อะฟลาทอกซินเอ็ม₁ (AFM₁) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ AFB₁ เมื่อสัตว์ได้รับ AFB₁ ซึ่งเกิดจากการถูกกระตุ้นโดยระบบเอนไซม์ออกซิเดส ซึ่งควบคุมโดย cytochrome P-450 เกิดปฏิกิริยา hydroxylation ซึ่งจะมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) แทนที่ใน furan ring เกิดเป็น aflatoxin M₁ (นงนุช, 2540) อีกทั้งยังแสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพิษชนิดอื่นๆ ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงในไซโตซอล (cytosol) เป็นอะฟลาทอกซิคอล (aflatoxicol) ในไมโครโซม (microsome) aflatoxin B₁ ถูกเปลี่ยนเป็น aflatoxin ชนิด AFL, AFP1, AFQ1 และ AFBO ในบริเวณตับของโคนม (Min et al., 2021) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซิน เอ็ม₁ (AFM₁)



รูปที่ 2 แสดง metabolism and biotransformation pathways of AFB₁ to AFM₁ (Min et al., 2021)

โดยส่วนใหญ่มักพบการปนเปื้อน AFM₁ ในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในระยะให้นม (lactating) และสามารถพบการปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากนม เช่น เนย ชีส โยเกิร์ต นมผงสำหรับทารก เป็นต้น หากบริโภคในปริมาณมากอาจนำไปสู่พิษเฉียบพลันและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต (Min et al., 2021)

ในปัจจุบันมีการกำหนดมาตรฐานปริมาณสูงสุดของสารพิษจากเชื้อราชนิดแอฟลาทอกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นม โดยสหภาพยุโรป (Commission regulation (EC) no 1881, 2006), Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex stan, 193-1995) และประกาศกระทรวงสาธารณสุข พรบ.อาหาร พ.ศ.2522 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข, 2563) มีข้อกำหนด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษจากเชื้อราชนิด aflatoxin M_1 ในผลิตภัณฑ์นม

ผลิตภัณฑ์	Maximum level ($\mu\text{g/kg}$) of aflatoxin M_1		
	The European Union	CODEX	พรบ.อาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน
น้ำนมดิบจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งยังไม่ผ่านกระบวนการแปรรูป หรือเติมแต่งส่วนผสมอื่น	0.05	0.50	0.50
นมผง สูตรสำหรับทารกแรกเกิดถึง 1 ปี และนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก	0.025	-	-
อาหารเสริมเพื่อวัตถุประสงค์ตามการแพทย์ สำหรับเด็กทารก	0.025	-	-

เนื่องด้วยการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อน AFM₁ ในปัจจุบันมีความเข้มงวด ทำให้มีความจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ มีความถูกต้อง เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถบังคับใช้กฎหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์นั้น ได้แก่ การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) และการตรวจวัด (detection technique)

การวิเคราะห์ AFM₁ ในน้ำนมดิบ เทคนิคที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างมีเทคนิคหลายแบบ เช่น การสกัดตัวอย่างโดยเทคนิค Liquid-liquid extraction (LLE) ซึ่งเป็นเทคนิคในการแยกของเหลวออกจากของเหลว อาจจะใช้สารที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน ในการกำจัดสารพวกไขมัน และใช้สารที่มีขั้วจับสารอะฟลาทอกซินไว้ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก และต้องมีการปรับสภาวะ (condition) ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง ไม่ว่าจะเป็นตัวทำละลาย อัตราส่วนและระยะเวลาในการสกัดจะต้องมีความเหมาะสม (Zhang et al., 2020) จึงต้องอาศัยขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ที่เหมาะสม เพื่อกำจัดสิ่งรบกวน และเลือกเฉพาะสารที่สนใจในการวิเคราะห์ เทคนิค clean-up โดยใช้ Immunoaffinity column (IAC) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราหลายชนิดในอาหารและอาหารสัตว์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (Aflatoxin M_1 in liquid milk immunoaffinity column by liquid chromatography, AOAC Official method 2000.08) โดยอาศัย monoclonal antibodies ในคอลัมน์ที่ทำหน้าที่ดักจับ AFM₁ เมื่อตัวอย่างที่ถูกละลายใน solvent ผ่าน column ส่วน antibodies จะจับกันอย่าง

จำเพาะกับ antigen ของ AFM₁ ที่สนใจเท่านั้น จากนั้นจะทำการชะ (elution) AFM₁ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น HPLC หรือ LC-MS/MS เป็นต้น (กฤตยา, 2556)

ในปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสำหรับการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราชนิด AFM₁ ที่สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ ยกตัวอย่างเช่น เทคนิค high performance liquid chromatography-Fluorescence detector (HPLC-FLD) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้เนื่องจากสาร AFM₁ มีคุณสมบัติในการเรืองแสง fluorescence และหากต้องการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ต้องอาศัยกระบวนการทำอนุพันธ์ (derivatization) ซึ่งมีทั้งการทำอนุพันธ์ก่อนเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) เช่น ทำปฏิกิริยากับ Trifluoroacetic acid หรือ การทำอนุพันธ์หลังจากผ่านคอลัมน์ (post-column derivatization) เช่น การเติมโบโรไมด์ แต่สารทั้งสองมีความเป็นพิษ (Shuib et al., 2017) จากข้อมูลดังกล่าวจึงถือว่าเป็นข้อจำกัดของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ ดังนั้นจึงใช้เทคนิคการตรวจวัดที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราชนิด AFM₁ เพื่อที่จะสามารถเตรียมตัวอย่างและตรวจวัดได้ในคราวเดียวที่ให้ทั้งความจำเพาะ (selectivity) และความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง ซึ่งเทคนิคที่ถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย คือเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) จากการศึกษาจากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2020) ได้ทำการเตรียมตัวอย่างนมโดยการสกัดด้วย methanol แล้วนำไปผ่านการ clean-up โดยใช้ IAC และเติมไอโซโทปชนิดคาร์บอน-13 ของ AFM₁ เป็น internal standard (IS) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งจากการทดสอบด้วยเทคนิคนี้พบว่าได้ %recovery ในช่วง 84-114% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการใช้ IAC ร่วมกับ LC-MS/MS ให้คุณภาพสำหรับผลการวิเคราะห์ที่สูง และสามารถวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำในเมทริกซ์ได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์หา AFM₁ ในตัวอย่างนม โดยผ่านการ clean up ด้วย immunoaffinity column และตรวจวัดด้วย LC-MS/MS มีความเหมาะสมที่จะนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

สำหรับอีกหนึ่งตัวแปรที่มีผลสำหรับการวิเคราะห์ที่ควรนำมาศึกษา คือปัญหาผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) สามารถเกิดจากโมเลกุลเมทริกซ์ของตัวอย่างที่รวมกับสารประกอบที่สนใจ สามารถรบกวนกระบวนการไอออไนเซชัน (ionization) ใน mass spectrometer ของสารที่วิเคราะห์ที่อาจเกิดการชะร่วมกันกับส่วนประกอบของเมทริกซ์ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณ (signal suppression and enhancement) ที่มีผลสำคัญในคุณภาพของข้อมูลเชิงปริมาณ (Fan et al., 2015)

ดังนั้นจากวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้นำเทคนิคการ clean-up มาทำการศึกษาการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ AFM₁ โดยเทคนิค Liquid chromatography-tandem mass spectrometry ตามแนวทางของ SANTE/12682/2019 โดยทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ขีดจำกัดตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์การซ้ำได้แบบ repeatability และ reproducibility และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ ตามแนวทางของ SANTE/12682/2019 เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบ aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบ

1. ชื่อโครงการ

การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ aflatoxin M₁ ในน้ำมันดิบ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

2. ผู้รับผิดชอบ

1. นางสาวสรลีย์ รักเนตรสาคร	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ
2. นางสาวนริศรา สีมันตะ	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. นายภาณุวัฒน์ ชังเพชรแก้ว	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
4. นายไกรวุฒิ นวลขาว	ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ

3. วัตถุประสงค์

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ aflatoxin M₁ ในน้ำมันดิบ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

4. ขอบข่าย

เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ aflatoxin M₁ ในน้ำมันดิบ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ตามแนวทางของ SANTE/12682/2019

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิธีวิเคราะห์ aflatoxin M₁ ในน้ำมันดิบ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

6. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 8060
- 6.1.2 เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Hanil รุ่น Combi 514R
- 6.1.3 เครื่อง Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2
- 6.1.4 เครื่อง Nitrogen Evaporator ยี่ห้อ Organomation
- 6.1.5 เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MFD
- 6.1.6 เครื่อง Vacuum pump ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S
- 6.1.7 Micropipette ขนาด 2 – 20 µL
- 6.1.8 Micropipette ขนาด 10 – 100 µL
- 6.1.9 Micropipette ขนาด 100 - 1,000 µL
- 6.1.10 Micropipette ขนาด 500 - 5,000 µL

6.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

- 6.2.1 Acetonitrile (CH_3CN), HPLC grade
- 6.2.2 Ammonium formate, LC-MS grade
- 6.2.3 Formic acid, LC-MS grade
- 6.2.4 Methanol, HPLC grade
- 6.2.5 น้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า $18.2 \text{ M}\Omega^{-\text{cm}}$
- 6.2.6 สารละลายมาตรฐาน Aflatoxin M_1
- 6.2.7 สารละลายมาตรฐาน $\text{U}-[^{13}\text{C}_{17}]$ -Aflatoxin M_1

6.3 อุปกรณ์

- 6.3.1 Afla M_1^{TM} HPLC Immunoaffinity Columns ยี่ห้อ VICAM
- 6.3.2 HPLC Column Kinetex XB-C18 $2.1 \times 100 \text{ mm.}$, $2.6 \text{ }\mu\text{m.}$ ยี่ห้อ Phenomenex
- 6.3.3 Centrifuge tube ขนาด 50 mL
- 6.3.4 Erlenmeyer Flask ขนาด 125 และ 250 mL
- 6.3.5 SPE Empty tube ขนาด 60 mL, Adapter
- 6.3.6 Syringe พลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม
- 6.3.7 Syringe Filters ชนิด Nylon ขนาด $0.45 \text{ }\mu\text{m}$
- 6.3.8 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum
- 6.3.9 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mL
- 6.3.10 กรวยกรองสารละลาย
- 6.3.11 กระดาษกรอง Whatman no.4
- 6.3.12 กระบอกตวงขนาด 50, 100, 1000 mL
- 6.3.13 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase
- 6.3.14 ซ็อนต์กสาร
- 6.3.15 ปีกเกอร์ขนาด 50, 500 mL

7. วิธีดำเนินการ

7.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องตรวจวัด Mass Spectrometer ได้แก่ Collision energy (CE), Q_1 Pre Bias, Q_3 Pre bias และ Dwell time ของสารพิษจากเชื้อรา aflatoxin M_1

7.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร aflatoxin M_1 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

7.3 ทดสอบการฉีดยามาตรฐาน aflatoxin M₁ สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) โดยเกณฑ์การยอมรับไม่น้อยกว่า 0.990 (AOAC, 2019) และคำนวณความเข้มข้นจริงกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ โดยพิจารณาจากค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐาน ต้องไม่เกิน $\pm 20\%$ ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้ (SANTE, 2019)

$$\text{Deviation of back-calculated concentration (\%)} = (C_{\text{measured}} - C_{\text{true}}) \times 100 / C_{\text{true}}$$

7.4 วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สาร aflatoxin M₁ ในน้ำมันดิบ โดยใช้เทคนิค Immunoaffinity column อ้างอิง Afla M₁ HPLC Instruction Manual (VICAM, 2009)

ตวงน้ำมันดิบ 100.00 mL ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 mL จำนวน 2 Tube



นำไปเหวี่ยงเพื่อแยกชั้น ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1540 g เป็นเวลา 15 นาที



ตักชั้นบนซึ่งเป็นส่วนชั้นไขมันของน้ำมันดิบทิ้งไป นำส่วนที่เป็นของเหลวเพื่อนำไปกรอง



กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4



load ตัวอย่าง 50 mL ผ่าน Immunoaffinity Column (AFM₁ HPLC)



ล้างด้วย DI Water 10 mL จำนวน 2 ครั้ง



elute ตัวอย่างด้วย acetonitrile : methanol อัตราส่วน (3:2) ปริมาตร 1.25 mL และ DI water ปริมาตร 1.25 mL (ปริมาตรรวม 2.50 mL)



นำไประเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator



ปรับปริมาตรด้วย 10 % methanol in DI Water ปริมาตร 960 μ L และ Internal standard ปริมาตร 40 μ L ทำการ mix ด้วยเครื่อง vortex



กรองผ่าน syringe filters ขนาด 0.45 μ m ชนิด nylon



นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.5 ทดสอบผลของ matrix effect ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน aflatoxin M₁ ในตัวทำละลายเปรียบเทียบกับในเมทริกซ์ในช่วงความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 250, 500, 100, 2,500 และ 5,000 ng/L ซึ่งสามารถคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ และความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย เพื่อคำนวณหา %SSE (Huang et al., 2014) ดังนี้

$$\%SSE = \frac{\text{slope (matrix-matched calibration curve)}}{\text{slope (standard calibration curve)}} \times 100$$

7.6 ทดสอบ sample blank เพื่อหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ) โดยทำการวิเคราะห์ sample blank (น้ำนมดิบ) จำนวน 10 ข้ำ นำไปตรวจวัดหาปริมาณ aflatoxin M₁ ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เพื่อหาค่า LOD และ LOQ โดยที่ LOD = 3×S₀' และค่า LOQ = 10×S₀' เนื่องจาก sample blank มีค่า จึงต้องใช้วิธีการคำนวณหา S₀' (Eurachem, 2014) ดังนี้

$$S_0' = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad \text{โดยที่ } S_0 = \text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล}$$

n = จำนวนการทดสอบซ้ำในงาน routine

7.7 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ความเข้มข้น 1.00 ng/L ลงใน sample blank แล้วนำไปทำตามขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 10 ข้ำ ผลที่ได้ต้องอยู่ระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise (s/n) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3 (SANTE, 2019)

7.8 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ) โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ความเข้มข้น 5.00 ng/L ลงใน sample blank แล้วนำไปทำตามขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 10 ข้ำ ผลที่ได้ต้องอยู่ระดับสัญญาณของพีค โดยค่า signal/noise ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 3, ได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ระหว่าง 70-120% และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) โดยเกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 20 % (SANTE, 2019)

7.9 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) โดยที่ความแม่นยำประเมินจากค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) และความเที่ยงประเมินจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ซึ่งทำการทดสอบความเที่ยง (method repeatability) โดยการนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ระดับความเข้มข้น 5.00, 20.00 และ 100.00 ng/L ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แล้วทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบได้ผล ซึ่งเกณฑ์ %recovery ที่ยอมรับต้องอยู่ในช่วง 70-120 % และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) โดยเกณฑ์การยอมรับ ภายในวันที่วิเคราะห์ (intraday, %RSD_i) และระหว่างวันที่วิเคราะห์ (interday, RSD_{wR}) คือ %RSD ≤ 20% (SANTE, 2019)

7.10 การพิจารณาค่า ion ratio สามารถบ่งชี้ชนิดสารและยืนยันผลการวิเคราะห์ เพื่อควบคุมสถานะและคุณภาพของการทดสอบให้เหมาะสม โดยหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ ion ratio ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ เพื่อพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อน (tolerance) ต้องไม่เกิน ± 30 % (SANTE, 2019)

$$\% \text{ ion ratio} = \frac{\text{peak area of lower intensity product ion (secondary ion)} \times 100}{\text{peak area of intensity product ion (primary ion)}}$$

$$\text{Diff} = 30 \% \times \text{average ion ratio}$$

7.11 การพิจารณาค่า retention time ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ โดยหาค่าเฉลี่ยของ retention time เพื่อพิจารณาหาความคลาดเคลื่อน (tolerance) ต้องไม่เกิน ± 0.1 นาที (SANTE, 2019)

7.12 การควบคุมคุณภาพภายนอกห้องปฏิบัติการ โดยการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) กับ FAPAS ในตัวอย่างนมผง ซึ่งพิจารณาจากค่าสถิติจาก z-score ที่ใช้เป็นเกณฑ์การตัดสิน ดังนี้

เกณฑ์การตัดสิน :	$ z \leq 2$	แสดงว่า ผลการทดสอบนั้นยอมรับได้ (satisfactory)
	$2 < z < 3$	แสดงว่า ผลการทดสอบนั้นน่าสงสัย (questionable)
	$ z \geq 3$	แสดงว่า ผลการทดสอบนั้นยอมรับไม่ได้ (unsatisfactory)

7.13 การประมาณค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) สามารถประเมินความไม่แน่นอนได้จากข้อมูลจาก method validation ในส่วนของ intra-laboratory หรือ within-laboratory reproducibility โดยประมาณค่าความไม่แน่นอน ดังนี้

- การคำนวณหาความลำเอียงสัมพัทธ์ (relative bias)

$$\text{relative bias} = \frac{\text{measured concentration} - \text{spiked concentration}}{\text{spiked concentration}} \times 100 \%$$

- การประมาณความไม่แน่นอนมาตรฐานจากความลำเอียง; U'(bias) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{bias}) = \sqrt{(\text{mean}_{\text{bias}})^2 + (\text{SD} \cdot P_{\text{bias}})^2}$$

- การประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากการทำซ้ำ; U'(precision) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{precision}) = \text{RSD}_{\text{WR}} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}}$$

-การประมาณค่าความไม่แน่นอนรวม; U'(combined) สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{combined}) = \sqrt{(\text{mean}_{\text{bias}})^2 + (\text{SD} \cdot P_{\text{bias}})^2 + (\text{RSD}_{\text{WR}})^2}$$

-การประมาณความไม่แน่นอนขยาย; U'expanded โดยคูณค่า U'(combined) ด้วย coverage factor, k = 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$U'(\text{expanded}) = k \times U'(\text{combined})$$

จากข้อมูลดังกล่าวที่ใช้ข้อมูลจาก method validation จะพิจารณาจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนขยายสำหรับวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการซึ่งต้องไม่เกิน 50% ถึงจะบ่งบอกได้ว่าวิธีทดสอบนั้นเหมาะสม (SANTE, 2019)

8. ผลการทดลอง

8.1 จากผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับส่วน Mass Spectrometer ในการตรวจสอบสารพิษจากเชื้อรา aflatoxin M₁ ได้สถานะที่เหมาะสมดังนี้

8.2 จากการทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร aflatoxin M₁ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แสดงผลได้ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในส่วน MS/MS transition ของสารมาตรฐาน และ Internal standard ของ aflatoxin M₁ สำหรับการตรวจวิเคราะห์

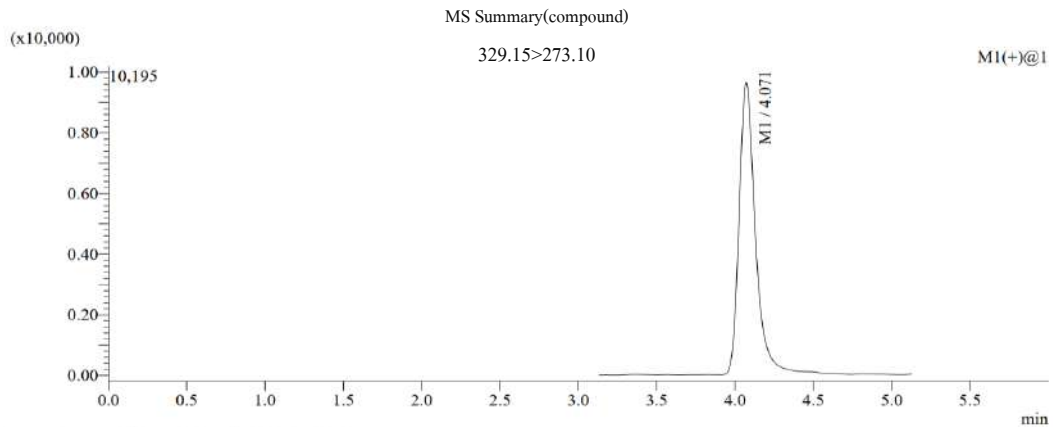
Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q ₁ Pre Bias (V)	Q ₃ Pre Bias (V)	Collision energy (CE)	Dwell time (msec)
aflatoxin M ₁	329.15	273.10	-10.0	-19.0	-24.0	100
aflatoxin M ₁	329.15	259.10	-17.0	-18.0	-24.0	100
aflatoxin M ₁ (IS)	346.20	288.20	-18.0	-21.0	-24.0	20

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับส่วน Mass Spectrometer

Mass Spectrometer	conditions
Ion Source	ESI (+)
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	10 L/min
Heating gas flow	10 L/min
Interface temperature	300 °C
DL temperature	250 °C
Heat block temperature	400 °C
Drying gas flow	10 L/min

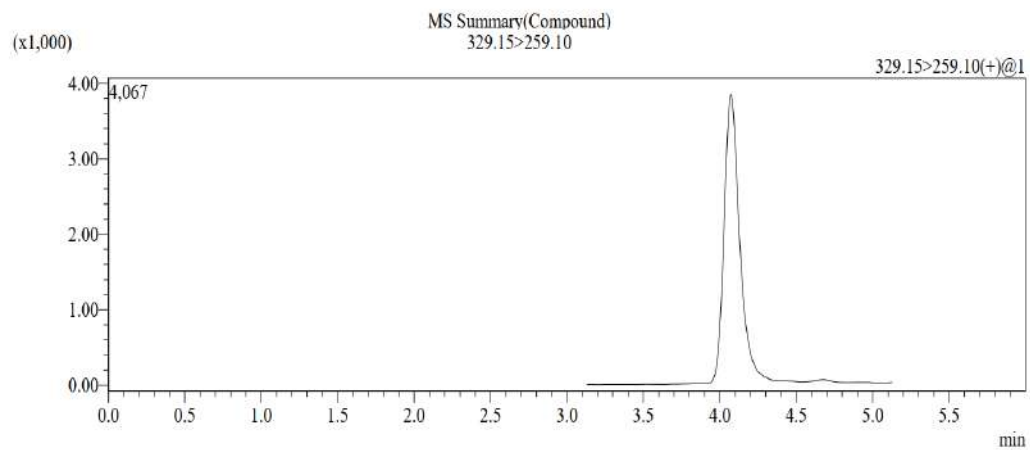
ตารางที่ 4 แสดง HPLC Conditions สำหรับวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราชนิด aflatoxin M₁

parameters	conditions
Mobile phase A	5 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in DI water
Mobile phase B	5 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in MeOH
Elution mode	gradient elution
Flow rate	0.25 mL/min
HPLC Column	Kinetex XB-C18 2.1×100 mm., 2.6 µm.
Injection volume	3 µL
Run time	12.00 min



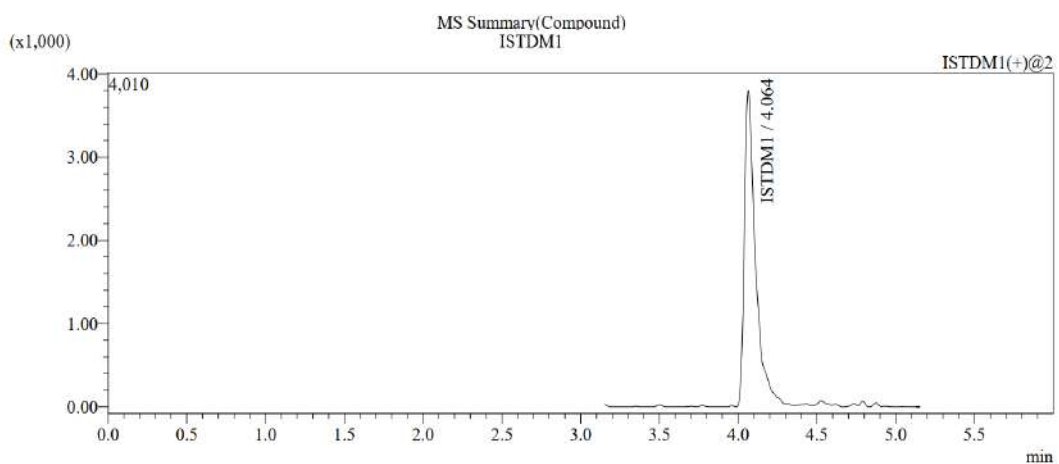
รูปที่ 3 แสดง extracted ion chromatogram (quantitative peak) ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/L

ป
ที่
4
แ
ส
ด
ง
ext
rac
ted
ion
chr



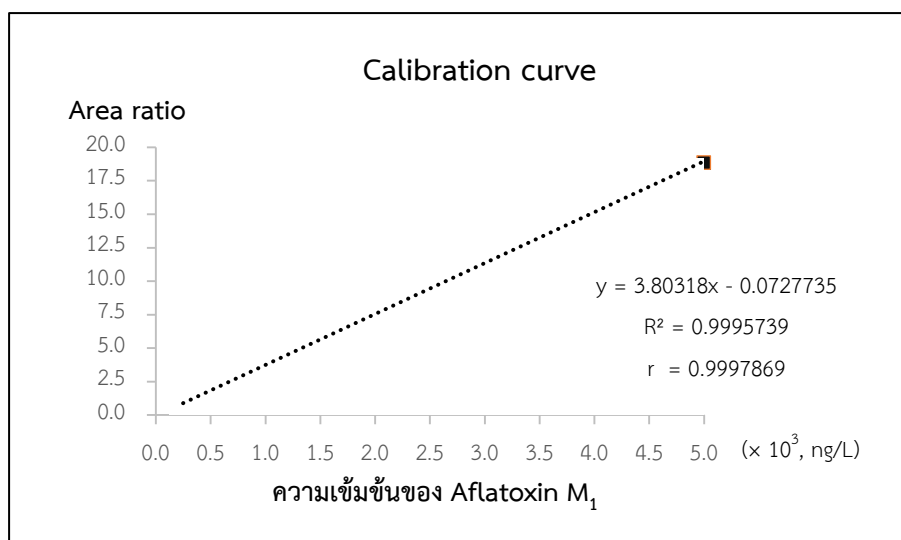
omatogram (qualitative peak) ของสารมาตรฐาน
aflatoxin M₁ ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/L

ป
ที่
5
แ
ส
ด
ง
extr
act
ed
ion



chromatogram ของ Internal standard aflatoxin M₁ ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/L

8.3 จากผลของการทดสอบการฉีดสารมาตรฐาน Aflatoxin M_1 และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า Correlation coefficient (r) ไม่น้อยกว่า 0.990 (AOAC, 2019) ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ แสดงดังรูปที่ 6 และคำนวณความเข้มข้นจริงกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ โดยพิจารณาจากค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มข้นจริงเทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ของสารมาตรฐานต้องไม่เกิน $\pm 20\%$ (SANTE, 2019.) ดังตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง area ratio และค่าความเข้มข้นของ aflatoxin M_1

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นจริงและความเข้มข้นที่คำนวณได้

True concentration (ng/L)	Calculated concentration (ng/L)	Deviation of back calculated concentration (%)
250	252.0	0.80
500	470.0	-6.00
1,000	988.5	-1.15
2,500	2,569	2.76
5,000	4,971	-0.58

8.4 จากผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ โดยประเมินจากค่า %SSE ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์ กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายพบว่าได้ 103.28 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ 80-120 % จึงถือว่าผลของ matrix effect อยู่ในระดับที่ยอมรับ (SANTE, 2019)

8.5 จากผลการทดสอบ sample blank แล้วคำนวณหา LOD และ LOQ ได้ผลดังตารางที่ 6
 ตารางที่ 6 แสดงค่า aflatoxin M₁ ของ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

ครั้งที่	aflatoxin M ₁
	concentration (ng/L)
1	3.04
2	2.87
3	2.92
4	3.44
5	3.44
6	3.94
7	3.81
8	3.84
9	3.86
10	3.55
average	3.47
S ₀	0.41
n	1.00
S ₀ '	0.41
%RSD	14.31
LOD (3S ₀ ')	1.22 ≈ 1.00
LOQ (10S ₀ ')	4.06 ≈ 5.00

8.6 การยืนยันค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of quantification, LOQ) แสดงผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตารางแสดงผลการทดสอบการยืนยันค่า LOD และ LOQ

ครั้งที่	aflatoxin M ₁ (1.00 ng/L)		aflatoxin M ₁ (5.00 ng/L)		
	s/n	Ion ratio	s/n	Ion ratio	%recovery
1	41.97	8.32	210.70	6.98	99.48
2	44.87	7.90	283.32	6.90	80.78
3	76.46	6.89	80.42	7.14	102.33
4	62.92	6.90	134.25	7.48	95.83
5	41.96	8.05	102.56	7.29	105.31
6	62.30	5.58	146.44	7.05	106.26
7	53.38	7.49	173.51	8.13	102.60
8	74.00	8.76	108.84	7.53	101.11
9	87.18	7.05	177.85	6.90	96.37
10	61.01	6.77	154.84	7.04	105.45
average	60.60	7.17	171.5	7.24	99.55
SD					7.52
%RSD					7.55

จากค่า LOD และ LOQ ของสาร aflatoxin M₁ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ทดสอบ สำหรับค่า LOD พบว่ามีค่า signal to noise มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 และพิจารณาค่า ion ratio โดยหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ ion ratio ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ระดับ LOD มีค่าเท่ากับ 7.17 % แล้วนำไปพิจารณาค่า tolerance ต้องไม่เกิน ± 30 % (SANTE, 2019) พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 5.16-9.58 % และส่วนค่า LOQ พบว่ามีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70-120% และ %RSD ≤ 20 % และพิจารณาค่า ion ratio โดยหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ ion ratio ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ระดับ LOQ มีค่าเท่ากับ 7.24% แล้วนำไปพิจารณาหาค่า tolerance ต้องไม่เกิน ± 30 % (SANTE, 2019) พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 5.07-9.42 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดตามแนวทางของ SANTE/12682/2019

8.7 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (method repeatability) โดยนำ sample blank มาเติมสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ระดับความเข้มข้น 5.00, 20.00 และ 100.00 ng/L ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แล้วทำตามขั้นตอนวิธีทดสอบ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยค่า %RSD_r ภายในวันที่วิเคราะห์ (intraday) ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 20% (SANTE, 2019.)

ตารางที่ 8 แสดงค่าความเข้มข้น และ %recovery ที่ระดับความเข้มข้น 5.00, 20.00 และ 100.00 ng/L

No.	recovery data					
	aflatoxin M ₁ (5.00 ng/L)		aflatoxin M ₁ (20.00 ng/L)		aflatoxin M ₁ (100.00 ng/L)	
	conc.	%recovery	conc.	%recovery	conc.	%recovery
1	6.74	88.41	16.31	72.09	79.32	77.29
2	7.20	94.44	16.75	74.04	79.58	77.55
3	7.15	93.78	19.99	88.36	75.50	73.57
4	7.18	94.18	19.65	86.85	74.81	72.90
5	7.06	92.60	18.84	83.27	72.98	71.11
Average	7.07	92.68	18.31	80.92	76.44	74.48
SD	0.19	2.49	1.68	7.44	2.90	2.83
%RSD _r	2.69	2.69	9.19	9.19	3.80	3.80

8.8 การทดสอบความเที่ยง (precision-reproducibility, RSD_{WR})

ทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และต่างวันที่วิเคราะห์ (method reproducibility) ที่ระดับความเข้มข้น 5.00, 20.00 และ 100.00 ng/L ได้ผลแสดงดังตารางที่ 9 ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยค่า RSD_{WR} ระหว่างวันที่วิเคราะห์ (interday,) ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% (SANTE, 2019.)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบค่าความเที่ยงของการทดสอบซ้ำ โดยใช้วิธีทดสอบเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และต่างวันที่วิเคราะห์ (method reproducibility) ที่ระดับความเข้มข้น 5.00, 20.00 และ 100.00 ng/L

condition	no.	recovery data					
		aflatoxin M ₁ (5.00 ng/L)		aflatoxin M ₁ (20.00 ng/L)		aflatoxin M ₁ (100.00 ng/L)	
		conc.	%recovery	conc.	%recovery	conc.	%recovery
Analyst 1	1	6.74	88.41	16.31	72.09	79.32	77.29
	2	7.20	94.44	16.75	74.04	79.58	77.55
	3	7.15	93.78	19.99	88.36	75.50	73.57
	4	7.18	94.18	19.65	86.85	74.81	72.90
	5	7.06	92.60	18.84	83.27	72.98	71.11
Analyst 2	6	7.11	85.87	20.44	87.80	90.86	87.97
	7	7.12	85.99	18.38	78.95	78.32	75.83
	8	7.43	89.73	20.16	86.60	81.63	79.04
	9	7.66	92.51	17.59	75.56	87.94	85.15
	10	7.43	89.73	20.62	88.57	81.81	79.21
average		7.21	90.72	18.87	82.21	80.28	77.96
SD		0.25	3.25	1.56	6.46	5.64	5.29
%RSD		3.48	3.58	8.28	7.86	7.02	6.78

8.9 การพิจารณาค่า ion ratio โดยหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ ion ratio ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ เพื่อพิจารณาค่า tolerance ต้องไม่เกิน $\pm 30 \%$ (SANTE, 2019) ได้ผลดังตารางที่ 10 พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 6.09-11.31 %

ตารางที่ 10 แสดงค่า ion ratio ที่ 5 ระดับความเข้มข้น จำนวนความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

concentration	ion ratio standard
STD(S)_M ₁ _250 ng/L_1	8.18
STD(S)_M ₁ _250 ng/L_2	9.51
STD(S)_M ₁ _500 ng/L_1	8.36
STD(S)_M ₁ _500 ng/L_2	8.40
STD(S)_M ₁ _1,000 ng/L_1	8.63
STD(S)_M ₁ _1,000 ng/L_2	9.18
STD(S)_M ₁ _2,500 ng/L_1	7.97
STD(S)_M ₁ _2,500 ng/L_2	9.39
STD(S)_M ₁ _5,000 ng/L_1	8.37
STD(S)_M ₁ _5,000 ng/L_2	9.03
Average	8.70
Diff	2.61
Tolerance	30.00
Lower	6.09
Upper	11.31

8.10 การพิจารณาค่า retention time ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ โดยหาค่าเฉลี่ยของ retention time เพื่อพิจารณาค่า tolerance ต้องไม่เกิน ± 0.1 นาที (SANTE, 2019) ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของ retention time ของสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ อยู่ในช่วงเกณฑ์ที่กำหนดคือ 3.956-4.156 นาที แสดงผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน aflatoxin M₁ ที่ 5 ระดับความเข้มข้น

concentration	retention time of aflatoxin M ₁ (min)
STD(S)_M ₁ _250 ng/L_1	4.064
STD(S)_M ₁ _250 ng/L_2	4.060
STD(S)_M ₁ _500 ng/L_1	4.056
STD(S)_M ₁ _500 ng/L_2	4.059
STD(S)_M ₁ _1,000 ng/L_1	4.056
STD(S)_M ₁ _1,000 ng/L_2	4.056
STD(S)_M ₁ _2,500 ng/L_1	4.059
STD(S)_M ₁ _2,500 ng/L_2	4.051
STD(S)_M ₁ _5,000 ng/L_1	4.048
STD(S)_M ₁ _5,000 ng/L_2	4.048
Average	4.056
Diff	0.100
Tolerance	0.100
Lower	3.956
Upper	4.156

8.11 การควบคุมคุณภาพภายนอกห้องปฏิบัติการ โดยการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) กับ FAPAS ในตัวอย่างนมผง (milk powder) ซึ่งได้ผลดังนี้

ตารางที่ 12 แสดงผล assigned values, ค่า result และค่า z-score

analyte	year	assigned value (µg/kg)	Result (µg/kg)	z-score
aflatoxin M ₁	2018	0.0709	0.0718	0.1
	2019	0.0561	0.0550	-0.1
	2020	0.0442	0.0344	-1.0
	2022	0.350	0.244	-1.4

จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 12 พบว่าได้ค่า z-score อยู่ในเกณฑ์การทดสอบ คือ $|z| \leq 2$ แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการและวิธีทดสอบมีความสามารถในการทดสอบ

8.12 การประเมินค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE จากข้อมูล method validation โดยนำข้อมูล within-laboratory reproducibility มาคำนวณความไม่แน่นอนขยายพบว่าไม่เกิน 50% (SANTE, 2019) ได้ผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงค่าความไม่แน่นอนของสาร aflatoxin M₁ ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 ng/L

Aflatoxin M ₁	Spike Level (5.0 ng/L)	Measure (ng/L)	relative bias (%)
1	5.0	4.24	-15.20
2	5.0	4.88	-2.40
3	5.0	4.71	-5.80
4	5.0	4.24	-15.20
5	5.0	4.14	-17.20
6	5.0	3.64	-27.20
7	5.0	3.93	-21.40
8	5.0	4.47	-10.60
9	5.0	4.59	-8.20
10	5.0	3.72	-25.60
N		10	
mean		4.26	-14.88
SD.Pbias (stdev.p) (%)			7.848
standard dev. Measured (ng/L) (stdev.s)		0.414	
RSDwR (%)		9.719	
U'(bias) (%)			16.823
U'(precision) (%)		9.719	
U'(combined) (%)		19.428	19.428
U'(expanded MU) (%)		38.857	

9. สรุปผลการทดสอบ

ผลของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบ แสดงดังตารางที่ 14 ดังนั้น จากผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้ สามารถยืนยันได้ว่าวิธีการทดสอบนี้ มีความเหมาะสมในการทดสอบหา aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ตารางที่ 14 สรุปผลการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ aflatoxin M₁ ในน้ำนมดิบ ตามพารามิเตอร์ต่างๆ

no.	parameter	aflatoxin M ₁	criteria
1	Linearity/Sensitivityของสารมาตรฐาน	$R^2 = 0.9996$ $r = 0.9998$ (0.25 – 5.00 µg/L)	$r > 0.99$
2	Matrix effect (%SSE)	103.28 %	80-120 %
3	LOD	1.00 ng/L	-
4	LOQ	5.00 ng/L	-
5	Accuracy-Precision (Repeatability)	%Recovery อยู่ในช่วง 71.11 - 94.44 %	70-120 %
		%RSD _r อยู่ในช่วง 2.69 - 9.19 %	$RSD_r \leq 20 \%$
6	Precision (Reproducibility)	%Recovery อยู่ในช่วง 71.11 - 94.44 %	70-120 %
		%RSD _r อยู่ในช่วง 3.58 – 7.86 %	$RSD_{wR} \leq 20 \%$
7	Ion ratio	8.70 %	$\pm 30 \%$ (6.09-16.31 %)
8	Retention time	4.056 min	$\pm 0.1 \text{ min}$ (3.956-4.156 min)
9	Proficiency testing	z-score = 0.1 z-score = -0.1	$ z \text{ score} \leq 2$
10	Expanded measurement uncertainty	38.857 %	$U(\text{expanded MU}) < 50\%$

10. ข้อเสนอแนะ

-

11. กิตติกรรมประกาศ

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำหรับความร่วมมือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

กฤตยา เพชรผิ้ง. 2556. **การวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราด้วยวิธีการทางเคมี**. เอกสารประกอบ

การสอนโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การตรวจสอบสารพิษเชื้อราในอาหาร. ฝ่ายเครื่องมือ และวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์.

นงนุช วณิธธนาคม. 2540. **วิทยาเชื้อราทางการแพทย์**. เชียงใหม่:คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 14-15.

บดินทร์ บุตรอินทร์. 2555. **สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาท็อกซิน**. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 45(2) : 6-7.

คณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2563. **พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน** (2563, พฤษภาคม 20). ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 137 ตอน พิเศษ 118 ง, 7.

AOAC Official Methods of Analysis, (2019). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 21st Edition Appendix K, 7.

CODEX. 1995. CODEX GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED. the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 29.

EURACHEM. 2014. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. The Fitness for Purpose of Analytical Method EURACHEM Guide.

EURL for Residues of Pesticides, (2020). Analytical quality control and method validation procedures for Pesticide Residues Analysis in food and feed. Document No. SANTE/12682/2019.

Sufang Fan, Qiang Li, Lei Sun, Yanshan Du, Jing Xia and Yan Zhang. (2015). Simultaneous determination of aflatoxin B1 and M1 in milk, fresh milk and milk powder by LC-MS/MS utilising online turbulent flow chromatography. **Food Additives & Contaminants**, 32(7), 1-2.

Jingcun Wu, Tyrally Ordinario and Feng Qin. (2020). Determination of Aflatoxin M₁ in Milk and Infant Formula by QSight LC/MS/MS with Three Fit for Purpose Sample Preparation Methods. **Application note Liquid chromatography/Mass spectrometry** PerkinElmer, Inc, 1-7.

Jun Xiang Lee, Yin Ling Chew, Jie Xing and Zhaoqi Zhan. (2017). Solid Phase Extraction and

- SFC-MS/MS Method for Analysis of Aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁ and G₂ in Milk Powders. **Application Development & Support Centre**, Shimadzu, 1-8.
- L.C. Huang, N. Zheng, B.Q. Zheng, F. Wen, J.B. Cheng, R.W. Han., et al. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and alpha-zearalenone in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, 146, 247.
- Li Min, Johanna Fink-Gremmels, Dagang Li, Xiong Tong, Jing Tang, Xuemei Nan., et al. (2021). An overview of aflatoxin B₁ biotransformation and aflatoxin M₁ secretion in lactating dairy cows. **Animal Nutrition**, 7, 42-48.
- SANTE/12089/2016., Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed.
- Sufang Fan, Qiang Li, Lei Sun, Yanshan Du, Jing xia and Yan Zhang. (2015). Simultaneous determination of aflatoxin B₁ and M₁ in milk, fresh milk and milk powder by LC-MS/MS utilising online turbulent flow chromatography. **Food Additives & Contaminants**, 6.
- VICAM. (2009). Afla M₁ HPLC Procedure For Milk powder. **HPLC Instruction Manual**, 9-11.