

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนมผง ด้วยวิธี LC-MS/MS

ไกรวุฒิ นวลขาว

กัญเกียรติ ขำขาว

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนมผง ด้วยวิธี LC-MS/MS เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ HPLC และ ระบบ Mass Spectrometer เพื่อดูรูปร่างของ peak, retention time, ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของ calibration curve และค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) การศึกษาได้ใช้ Afla M₁ (immunoaffinity column; IAC) ในการ clean-up ผลการทดสอบพบว่า เมื่อนำสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005 – 2.0 ng/mL (0.00465, 0.0093, 0.0465, 0.093, 0.465, 0.930, 1.86) พบว่าได้ค่า $r^2 = 0.99848$ ซึ่งมากกว่า 0.995 ส่วนการทดสอบค่าการคืนกลับได้ผลการทดสอบ ดังนี้ ซ้ำที่ 1 0.0514 ng/mL (%recovery = 101.07) และซ้ำที่ 2 0.0498 ng/mL (%recovery = 97.63) ซึ่ง %recovery ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ 80 – 120%

คำสำคัญ: Aflatoxin M₁, Immunoaffinity column, Milk Powder

Method Development for Determination of Aflatoxin M1 in Milk by LC-MS/MS

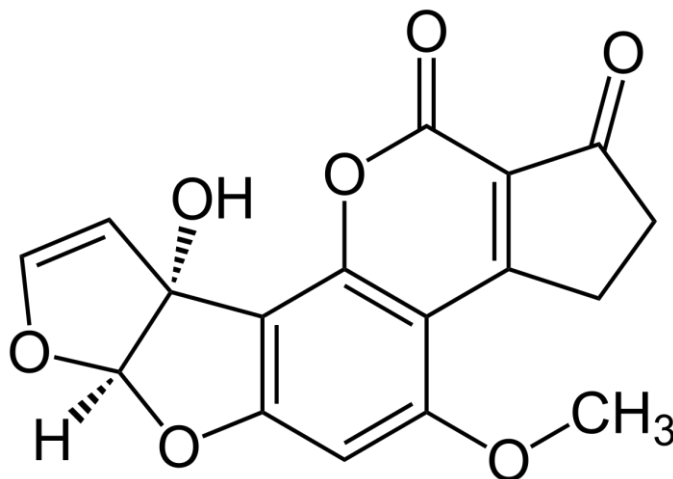
Abstract

Development of test methods Aflatoxin M₁ in Milk Powder by LC-MS/MS aims to study optimize HPLC conditions and Mass Spectrometer Parameter for reach the good peak, retention time, linearity of calibration curve and %recovery. This study used Afla M₁ HPLC (immunoaffinity column; IAC) as clean-up. The study results showed that standard solution with different concentrates 0.005 – 2.0 ng/mL (0.00465, 0.0093, 0.0465, 0.093, 0.465, 0.930, 1.86) to create calibration curve, so result $r^2 = 0.99848$ and recovery percentage testing results showed 101.07% and 97.63% these are accepted range 80 – 120%

Keywords: Aflatoxin M₁, Immunoaffinity column, Milk Powder

บทนำ

Aflatoxin M_1 เป็นสารประกอบทางเคมีกลุ่ม Aflatoxin ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมีกลุ่มหนึ่งในสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) สร้างโดยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* และชนิดที่ไม่ค่อยจะพบ เช่น *Aspergillus nomius* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถปนเปื้อนได้ทั้งในพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช โดยธรรมชาติแล้ว *Aspergillus flavus* นั้นจะผลิตสารพิษจากเชื้อราเพียงเฉพาะ B-type aflatoxins แต่ Aflatoxin M_1 นั้นเป็น hydroxylated metabolite ของ aflatoxin B_1 พบการปนเปื้อนได้ในน้ำมัน และผลิตภัณฑ์นม



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Aflatoxin M_1

การเกิดพิษ การเป็นพิษสำหรับ aflatoxin M_1 นั้น จะเกิดพิษและเป็นพิษน้อยกว่า aflatoxin B_1 มีการพบมากที่สุดคือในน้ำมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในระยะให้นม (lactating) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโคนม จึงต้องตระหนักและให้ความสำคัญกับการตรวจสอบปริมาณ aflatoxin M_1 เป็นอย่างยิ่ง เพราะสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้สามารถปนเปื้อนไปกับทุกผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบ เช่น ชีส เนย โยเกิร์ต นมผง นมผงสำหรับทารก ผลิตภัณฑ์เหล่านี้หากปนเปื้อน aflatoxin M_1 แล้วมีการนำไปบริโภค ทั้งสัตว์ และมนุษย์ สามารถเกิดผลเสียต่อสุขภาพได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทารก และลูกสัตว์ ซึ่งบริโภคนมเป็นหลัก

การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา aflatoxin M_1 นั้นมีหลายวิธี วิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความสามารถ และความแม่นยำสูงที่สุด คือ Mass Spectrometry

1. ชื่อโครงการ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนมผง ด้วยวิธี LC-MS/MS

ผู้รับผิดชอบ

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1. นายไกรวุฒิ นวลขาว | นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ |
| 2. นายกู้เกียรติ ขำขาว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา Aflatoxin M₁ ในนมผง ด้วยวิธี LC-MS/MS

3. ขอบข่าย

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxin M₁ ในนมผง และเตรียมตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxin M₁ ในนมผง ด้วยเทคนิค LC-MS และนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

5. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

5.1 เครื่องมือ

- 5.1.1 เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Sciex QTRAP 5500
- 5.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG603-S
- 5.1.3 เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ Hanil รุ่น Combi 514R
- 5.1.4 Vortex mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie-2
- 5.1.5 Micro Pipette ขนาด 2 – 20 µL
- 5.1.6 Micro Pipette ขนาด 10 – 100 µL
- 5.1.8 Micro Pipette ขนาด 100 - 1,000 µL
- 5.1.9 Micro Pipette ขนาด 500 - 5,000 µL
- 5.1.10 Dispenser ขนาด 100 mL
- 5.1.12 เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ WIGGENS รุ่น UA22MF-D
- 5.1.13 ป้อนกรองสารละลาย ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S

5.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน

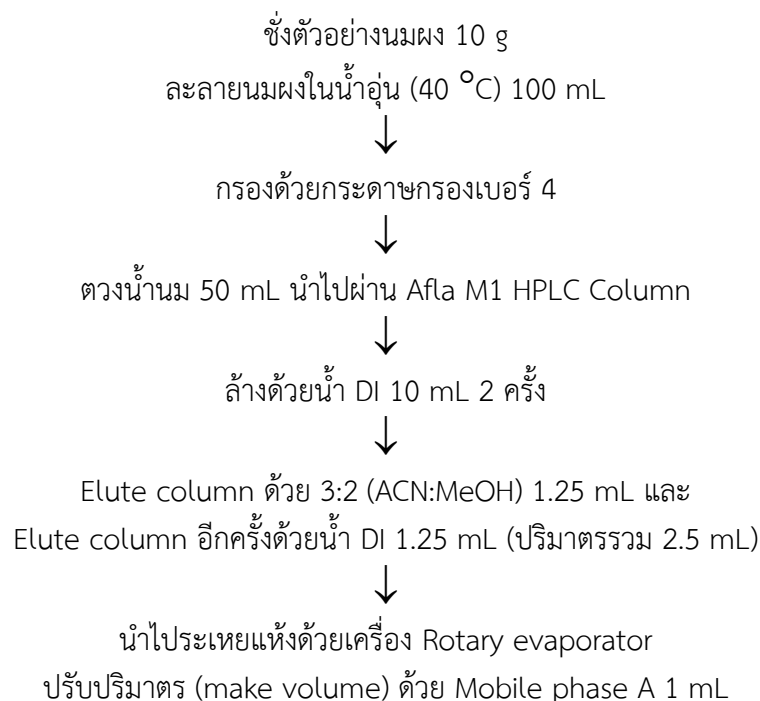
- 5.2.1 Methanol HPLC grade ใช้สำหรับเตรียม Mobile phase
- 5.2.2 Acetonitrile (CH₃CN), HPLC grade ใช้สำหรับเตรียม Mobile phase
- 5.2.3 น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ ·cm
- 5.2.4 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO₃), AR หรือ GR grade
- 5.2.5 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5%

5.3 อุปกรณ์

- 5.3.1 Column HPLC C₁₈ 3 µm ขนาด 3.0 × 150 มิลลิเมตร, Shimadzu Shim-pack HR-ODS
- 5.3.2 Erlenmeyer Flask ขนาด 125 และ 250 mL
- 5.3.3 ซ้อนตักสาร
- 5.3.4 กรวยกรองสารละลาย
- 5.3.5 หลอดเข็นตริฟิวซ์ชนิด Polypropylene ขนาด 50 mL
- 5.3.6 กระดาษกรอง Whatman no.4 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18.5 cm.
- 5.3.7 Rack สำหรับวางหลอดเข็นตริฟิวซ์
- 5.3.9 Syringe พลาสติกขนาด 3 และ 10 มิลลิลิตร ชนิดไม่มีหัวเข็ม
- 5.3.10 Syringe Filters ชนิด Nylon ขนาด 0.20 µm
- 5.3.11 Clamp พร้อมขาตั้ง หรือชุด hand pump
- 5.3.13 Immunoaffinity column Afla M1 HPLC ยี่ห้อ VICAM
- 5.3.14 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum
- 5.3.15 กระบอกตวงขนาด 50, 1000 mL
- 5.3.16 ปีกเกอร์ขนาด 50, 1000 mL
- 5.3.17 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 mL
- 5.3.18 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase
- 5.3.19 Disposable Cuvettes
- 5.3.20 Vial ขนาด 1.5 mL

6. วิธีการดำเนินงาน

6.1 วิธีทดสอบ



↓
นำไปฉีดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

6.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง LC-MS/MS

HPLC Conditions

Mobile phases:

MPA: 0.1% formic acid with 0.5 mM CH₃COONH₄ in DI water

MPB: 0.1% formic acid with 0.5 mM CH₃COONH₄ in MeOH (HPLC grade)

Flow rate: 0.4 mL/min

Inject volume: 10 μ L

HPLC Column: Shim-pack HR-ODS 150 x 3.0 mm 3 μ m

Column temp: 40 °C

Mass Spectrometer conditions

Mode:		MRM (Positive)				
Q1	Q3	RT	DP	EP	CE	CXP
329.1	273.2	2.80	81	10	35	16
329.1	229.1	2.80	81	10	59	12

6.3 การตรวจสอบ Chromatogram และ Retention time

ทำการฉีดสารมาตรฐานเพื่อดู chromatogram และ retention time ที่ถูกต้อง

6.4 การสร้าง Standard Calibration Curve

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005 – 2.00 ng/mL (0.00465, 0.0093, 0.0465, 0.093, 0.465, 0.930, 1.86) ดัง ตารางที่ 1 โดยใช้ 0.1% Formic acid with 0.5 mM CH₃COONH₄ in DI water เป็นตัวทำละลาย และนำไปสร้างเป็น Calibration curve โดยเมื่อคำนวณค่า $r^2 \geq 0.995$

6.5 ทดสอบหา %recovery

ทำการ spike สารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxin M₁ ลงในตัวอย่างนมผงสำหรับทารก (infant milk powder) ในระดับความเข้มข้น 0.0465 ng/mL เพื่อทดสอบหา %recovery ซึ่งต้องอยู่ในเกณฑ์ 80 – 120%

6.6 ทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing)

ทำการทดสอบตัวอย่าง Proficiency Testing จาก FAPAS ในตัวอย่างนมผง รหัสตัวอย่าง 04355

ตารางที่ 1 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารพิษจากเชื้อรา Aflatoxin M₁

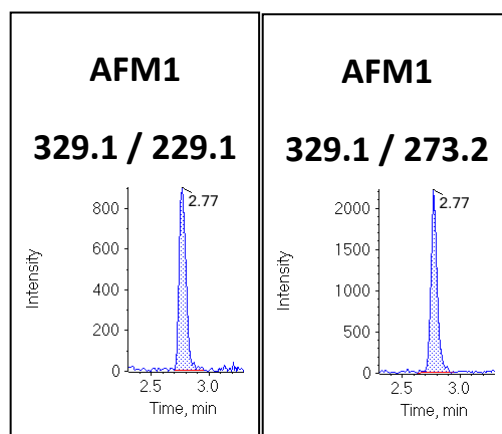
Compounds	Concentration ranges (ng/mL)
Aflatoxin M ₁	0.005 – 2.0 (0.00465, 0.0093, 0.0465, 0.093, 0.465, 0.930, 1.86)

7. ผลการทดลอง

7.1 Chromatogram และ Retention time

ทำการทดสอบการฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.093 ng/mL (Level 4) เพื่อดูรูปร่างของ chromatogram และ retention time (RT) ผลการทดสอบพบว่า RT ที่ 2.77 นาที

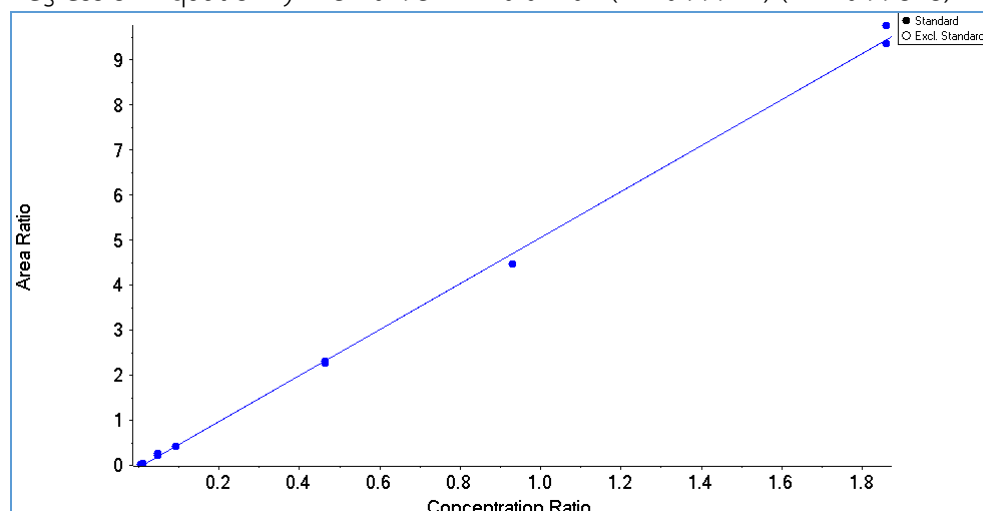
STD M1 LV4_4



ภาพที่ 2 แสดง Chromatogram และ Retention time ของสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxin M₁

7.2 การทดสอบสร้าง Calibration curve

Regression Equation: $y = 5.10495x + -0.04701$ ($r = 0.99924$) ($r^2 = 0.99848$)



ภาพที่ 3 แสดง Calibration curve ของสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxin M₁

จากการทดสอบสร้าง calibration curve โดยใช้ค่าที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.00465 – 1.86 ng/mL รวมทั้งสิ้น 7 จุด พบว่าค่า $r^2 = 0.99848$ ซึ่งมากกว่า 0.995 จึงทำให้สามารถนำไปใช้เป็น calibration curve ได้

7.2 การทดสอบ %recovery

Sample Name	Sample Type	Component Name	RT (min)	Cal. Conc. (ppb)	Peak Area (cps)	IS Area (cps)
STD M1 LV1_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0139	447.7	18720.0
		Aflatoxin M1_2		-	239.6	-
STD M1 LV1_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0141	497.9	19890.0
		Aflatoxin M1_2		-	253.1	-
STD M1 LV2_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0186	874.1	18260.0
		Aflatoxin M1_2		-	366.9	-
STD M1 LV2_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0186	1012.7	21160.0
		Aflatoxin M1_2		-	526.4	-
STD M1 LV3_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0600	4809.7	18560.0
		Aflatoxin M1_2		-	2231.5	-
STD M1 LV3_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0541	4412.8	19260.0
		Aflatoxin M1_2		-	2032.2	-
STD M1 LV4_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0930	7929.9	18540.0
		Aflatoxin M1_2		-	4134.0	-
STD M1 LV4_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0914	8321.7	19840.0
		Aflatoxin M1_2		-	4005.2	-
STD M1 LV5_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.4614	42434.8	18380.0
		Aflatoxin M1_2		-	19981.8	-
STD M1 LV5_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.4536	43337.0	19100.0
		Aflatoxin M1_2		-	21034.8	-
STD M1 LV6_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.8848	86051.6	19250.0
		Aflatoxin M1_2		-	41811.4	-
STD M1 LV6_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	0.8856	89266.4	19950.0
		Aflatoxin M1_2		-	44618.9	-
STD M1 LV7_1	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	1.9223	177410.4	18170.0
		Aflatoxin M1_2		-	83893.1	-
STD M1 LV7_2	Standard	Aflatoxin M1_1	2.77	1.8457	192024.7	20480.0
		Aflatoxin M1_2		-	87334.0	-
Blank_1	Unknown	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0044	1103.4	17230.0
		Aflatoxin M1_2		-	563.0	-
Spike 0.05 ppb_1	Unknown	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0514	22032.5	17400.0
		Aflatoxin M1_2		-	10784.9	-
Spike 0.05 ppb_2	Unknown	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0498	21524.2	17580.0
		Aflatoxin M1_2		-	11116.8	-
PT04355_1	Unknown	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0544	22205.9	16560.0
		Aflatoxin M1_2		-	10733.8	-
PT04355_2	Unknown	Aflatoxin M1_1	2.77	0.0557	22164.8	16140.0
		Aflatoxin M1_2		-	10857.6	-

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบสารพิษจากเชื้อราชนิด Aflatoxin M₁

จากการทดสอบหา %recovery ด้วยการเติมสารมาตรฐาน Aflatoxin M₁ ลงไปในตัวอย่างนมผงสำหรับทารก (infant milk powder) ที่ระดับความเข้มข้น 0.0465 ng/mL จำนวน 2 ซ้ำ พบว่าเมื่อหักลบกับตัวอย่างควบคุม (sample blank) ซึ่งตรวจพบค่าที่ระดับความเข้มข้น 0.0044 ng/mL จะ

ได้ผลดังนี้ ซ้ำที่ 1 $0.0514 - 0.0044 = 0.047$ ng/mL (%recovery = 101.07) และซ้ำที่ 2 $0.0498 - 0.0044 = 0.0454$ ng/mL (%recovery = 97.63) ซึ่ง %recovery อยู่ในเกณฑ์ 80 – 120%

7.3 ทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing)

จากการทดสอบหา Aflatoxin M₁ ในตัวอย่างนมผง รหัสตัวอย่าง 04355 ทำการทดสอบ ทั้งสิ้น 2 ซ้ำ ได้ผลการทดสอบ 0.0544 และ 0.0557 ng/mL (ug/kg) (เฉลี่ย 0.05505) เมื่อนำไปเทียบกับค่า assigned value 0.0561 ug/kg พบว่ามีค่า %recovery 98.128 และได้ z-score -0.1

8. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสร้าง calibration curve ภายใต้สภาวะระบบเครื่อง LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นนั้น โดยการฉีดสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.005 – 2.0 (0.00465, 0.0093, 0.0465, 0.093, 0.465, 0.930, 1.86) ng/mL ได้ค่า $r^2 = 0.99848$ ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995 สามารถนำไปใช้เป็น calibration curve ได้

การทดสอบหา %recovery ด้วยการเติมสารมาตรฐาน aflatoxin M₁ ลงไปในตัวอย่างนมผง (infant milk powder) ที่ระดับความเข้มข้น 0.0465 ng/mL พบว่า ได้ค่าเฉลี่ย %recovery = 99.35 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 80 – 120%

การทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) กับ FAPAS ตัวอย่างนมผง (Milk Powder) รหัสตัวอย่าง 04355 ได้ผลทดสอบเฉลี่ยที่ 0.05505 ng/mL มีค่า z-score -0.1 ผลการทดสอบพบว่า ผ่านการทดสอบ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Aflatoxin M₁ ในนมผง ด้วยวิธี LC-MS/MS ครั้งนี้ ได้ผลการทดสอบที่เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดทุกอย่าง สามารถนำไปใช้ทดสอบ Aflatoxin M₁ ในนมผงได้เป็นอย่างดี และเพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจในผลการทดสอบ ควรจะมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) วิธีนี้ด้วย

9. เอกสารอ้างอิง

AOAC (2016). Appendix K: Part I: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. VICAM. Afla M1, HPLC Instruction Manual. 2018.https://en.m.wikipedia.org/wiki/Aflatoxin_M1