การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน M1 ในน้ำนมดิบและนมผง ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ไกรวุฒิ นวลขาว* **ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน**

บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซิน M1 (AFM1) เป็นสารเมทาบอไลต์ที่สำคัญของอะฟลาทอกซิน B1 (AFB1) ที่พบปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์หลายชนิดที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสำหรับโคนม โดยถูกดูดซึมและผ่านกระบวนการเมทาบอไลต์ที่ตับ เกิดเป็น AFM1 และเมทาบอไลต์อื่นในรูปไฮดรอกซิเลต (hydroxylated) และถูกขับออกมาในน้ำนม องค์การระหว่างประเทศเพื่อการวิจัยมะเร็ง (IARC) ได้กำหนดให้ AFB1 และ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็ง โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ทางระบาดวิทยาระหว่างการได้รับสารอะฟลาทอกซินและอุบัติการณ์ของมะเร็งตับในมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ AFM1 ในน้ำนมและนมผงด้วยเทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ร่วมกับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค immunoaffinity column (IAC) และใช้สารมาตรฐานภายในแบบไอโซโทป (isotopically labeled standard) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิค solid-phase extraction (SPE) และ immunoaffinity column (IAC) กับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 ด้วยเทคนิค liquid chromatography แบบ gradient elution โดยใช้ mobile phase คือ ammonium formate buffer ในน้ำและเมทานอล และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 12 นาที ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีใช้เทคนิค IAC ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า SPE ในการเตรียมตัวอย่างและ $^{13}C_{17}$-AFM1 เป็นสารมาตรฐานภายในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 ได้ค่าความแม่นโดยร้อยละการคืนกลับ 70-120 % ค่าความเที่ยงโดยร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20 % ค่าขีดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 0.001 µg/L และ 0.005 µg/kg ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.005 µg/L และ 0.025 µg/kg มีค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 34.4 % และ 31.6 % สำหรับน้ำนมดิบและนมผง ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างนมจำนวน 61 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ AFM1 ร้อยละ 72.1 ซึ่งควรมีการเฝ้าระวัง เพื่อป้องกันผลกระทบต่อสุขภาพผู้บริโภค

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 LC-MS/MS น้ำนมดิบ นมผง

เลขทะเบียนวิชาการ: 67(2)-0304-049

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

*ผู้รับผิดชอบ, e-mail: kraiwut.n@dld.go.th

Method development and validation for aflatoxin M1 determination in raw milk and milk powder by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Kraiwut Nualkaw* Chusak Ardsoongnearn

Abstract

Aflatoxin M1 (AFM1), a major metabolite of aflatoxin B1 (AFB1), is found in many feed materials commonly used in the ration of dairy cows. Absorbed AFM1 undergoes hepatic metabolism, resulting in the formation of AFM1 among other metabolites, a hydroxylated product, which is excreted in milk. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified AFB1 and AFM1 as Group 1 carcinogens, considering the epidemiologically confirmed contribution to the prevalence of human hepatocellular carcinomas. Therefore, the current study used a developed and validated method for the determination of AFM1 in raw milk and milk powder using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method with an immunoaffinity column (IAC) sample preparation and using a stable isotopically labeled standard as an internal standard. A variety of methodologies have been evaluated, including solid-phase extraction (SPE) and IAC based methods. The chromatographic conditions were optimized for detection of AFM1 and $^{13}C_{17}$-AFM1 using gradient elution. The mobile phases were composed of ammonium formate buffer in deionized water and methanol within a 12 minute analysis time. The final determination was performed through IAC sample preparation, and internal solvent standard calibration was done with $^{13}C_{17}$-AFM1 used for quantification. The method's performance complied with the SANTE 11312/2021 V2 guidelines and had mean recovery accuracies in the range of 70–120% and precision testing of percent relative standard deviation (%RSD) below 20%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.001 µg/L, 0.005 µg/kg and 0.005 µg/L, 0.025 µg/kg; the expanded uncertainty was 34.4% and 31.6% for raw milk and milk powder, respectively. Additionally, the method was applied to analyze 61 samples of milk. The results showed 72.1% of milk samples were contaminated with AFM1, necessitating monitoring to prevent harmful impacts on consumer health.

Keyword: aflatoxin M1, LC-MS/MS, raw milk, milk powder

Scientific No.: 67(2)-0304-049

Bureau of Quality Control of Livestock Products, Tiwanon Rd., Bangkadi, Mueng, Pathum Thani, 12000 *Corresponding author, e-mail: kraiwut.n@dld.go.th

บทนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins, AFs) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความเป็นพิษรุนแรง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity), เป็นพิษส่งผลเสียต่อตัวอ่อน (teratogenicity) และ เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) โดยถูกสร้างขึ้นจากเชื้อรากลุ่ม Aspergillus species แต่มักพบว่าเชื้อราที่สร้างสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ ได้แก่ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* (Groopman *et al.*, 1988) มักพบการปนเปื้อนในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์เนื่องจากเชื้อราจะเจริญก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว สารพิษกลุ่ม AFs ประกอบด้วยสารพิษจากเชื้อราในรูปหลัก 4 ชนิด ได้แก่ Aflatoxin B1 (AFB1), Aflatoxin B2 (AFB2), Aflatoxin G1 (AFG1) และ Aflatoxin G2 (AFG2) ซึ่งสารพิษจากเชื้อราชนิด AFB1 เป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงต่อสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ โดยมีรายงานว่าสารพิษในกลุ่ม AFs เกิดความเป็นพิษต่อตับ และทำให้เกิดมะเร็งตับในสัตว์และมนุษย์ได้ (Mahato *et al.,* 2019)

กลไกการเกิดความเป็นพิษในการก่อมะเร็ง เกิดขึ้นจากการสร้างสารเมทาบอไลต์ที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่ง ที่ 8 และ 9 เกิดเป็น อิพอกไซด์ (epoxide form) โดยเอนไซม์ cytochrome P-450 (CYP450) ที่ตับ จากนั้น epoxide จะเกิดปฏิกิริยากับ DNA RNA หรือ โปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์ เกิดเป็น covalent adduct จากนั้น covalent adduct ที่เกิดขึ้นจะรบกวนการทำงานของ tumor suppression gene p53 ทำให้เกิดการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Oesch and Arand, 1999) โดยกลไกแสดงความเป็นพิษของ AFB1 ตามภาพที่ 1

Aflatoxin M1 (AFM1) เกิดการจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ AFB1 เมื่อสัตว์ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของ AFB1 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยเอนไซม์ CYP450 เปลี่ยน AFB1 เป็น AFM1 โดยปฏิกิริยา hydroxylation นอกจากนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นเมทาบอไลต์อื่น เช่น ใน cytosol เป็น aflatoxicol (AFL) ใน microsome ถูกเปลี่ยนเป็น AFL, aflatoxin P1 (AFP1), aflatoxin Q1 (AFQ1), AFM1 และ AFB1-8,9-epoxide (AFBO) ในบริเวณตับของโคนม (Min *et al.,* 2021) ตามภาพที่ 2 โดยสามารถพบการปนเปื้อนในนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีสัดส่วนถึง 5 % ในการเปลี่ยนรูปจากการได้รับ AFB1 (Britzi *et al*., 2013)

ภาพที่ 1 กลไกแสดงความเป็นพิษและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ AFB1 (ดัดแปลงจาก Dhanasekaran *et al.*, 2011)

ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ AFB1 ในโคนม (Min *et al.*, 2021)

AFM1 เป็นสารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับและสารพันธุกรรมเช่นเดียวกับ AFB1 ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และเชื่อมโยงกับความเสี่ยงที่จะเกิดมะเร็งเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้องค์กรวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer, IARC) ได้จัดสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ AFB1 และ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 2012)

น้ำนมเป็นของเหลวชีวภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการอุดมไปด้วยโปรตีนคุณภาพสูง ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน อีกทั้งนมยังมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายประการ เช่น คุณสมบัติต้านจุลชีพ ส่งเสริมภูมิคุ้มกัน เอนไซม์และแอนติบอดี เป็นต้น ดังนั้นนมรวมถึงผลิตภัณฑ์นมจึงเป็นอาหารพื้นฐานที่มีสารอาหารที่จำเป็นสำหรับโภชนาการและพัฒนาการของมนุษย์ทุกวัย ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมจะเป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพของมนุษย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเด็กและทารกแรกเกิด เนื่องจากช่วงวัยดังกล่าวมีอัตราการบริโภคสูง (Ferrari *et al.*, 2022)

การปนเปื้อน AFM1 ในน้ำนมและนมผง ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพในมนุษย์จึงนำไปสู่การกำหนดปริมาณสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนได้สำหรับ AFM1 ในอาหารที่มีส่วนประกอบหรือใช้นมเป็นวัตถุดิบหลักของอาหาร เช่น มาตรฐานของสหภาพยุโรป Commission regulation (EU) No 2023/915 (European commission, 2023), Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (Codex, 2019) และประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 พ.ศ. 2536 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข, 2563) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ตารางที่ 1 ค่าปริมาณสูงสุดของ AFM1 ที่สามารถปนเปื้อนได้ในนมและผลิตภัณฑ์นม

ผลิตภัณฑ์	**Maximum level of Aflatoxin M1 (μg/kg)**		
	EU	**CODEX**	**ประกาศกระทรวงสาธารณสุข**
น้ำนมดิบ และนมที่ผ่านการให้ความร้อน และผลิตภัณฑ์ที่มีนมเป็นส่วนประกอบ	0.05	0.50	0.50
นมผง สูตรสำหรับทารกแรกเกิดถึง 1 ปี และนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก	0.025	-	-

หมายเหตุ ค่าความถ่วงจำเพาะที่ 20 °C ของน้ำนมดิบเท่ากับ 1.028 g/mL

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ AFM1 ในน้ำนมดิบและนมผง พบมีการใช้เทคนิคเตรียมตัวอย่างหลายรูปแบบ ได้แก่ เทคนิค immunoaffinity column (IAC) ในการ clean-up ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการ monoclonal antibodies-based affinity chromatography ทำหน้าที่จับ AFM1 แบบ antigen-antibody binding จากนั้นทำการชะ (elution) ก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography ร่วมกับ fluorescence detection (HPLC-FLD) โดยไม่ผ่านการทำอนุพันธ์ (derivatization) ตามวิธีมาตรฐาน ISO 14501:2021 (International Organization for Standardization, 2021) อย่างไรก็ตามหากต้องการเพิ่มความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ต้องอาศัยกระบวนการทำอนุพันธ์ซึ่งมีทั้งการทำอนุพันธ์ของ AFM1 ก่อนเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) เช่น ทำปฏิกิริยากับ trifluoroacetic acid (TFA) หรือ การทำอนุพันธ์หลังจากการแยกด้วยคอลัมน์ (post-column derivatization) เช่น การเติมโบรไมด์ แต่สารทั้งสองมีความเป็นพิษจึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการใช้เทคนิคดังกล่าว (Shuib *et al.*, 2017) นอกจากนี้ในบางครั้งอาจมีสารอื่นๆ ในตัวอย่างที่มีคุณสมบัติการเรืองแสงได้

เช่นเดียวกับ AFM1 ซึ่งอาจทำให้เกิดการผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ (Fu., 1996) รวมถึงต้องใช้ปริมาณตัวอย่างสูงในการฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ทำให้เกิด carry over ส่งผลให้การวิเคราะห์ผิดพลาด

แต่ปัจจุบันเทคโนโลยีของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์มีความก้าวหน้าและเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วมีการใช้งานอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การใช้เทคนิค liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) สามารถตรวจวิเคราะห์ AFM1 ในตัวอย่างเมทริกซ์ (matrix) ที่มีความซับซ้อน เช่น น้ำนมดิบ และนมผง โดยที่ไม่ต้องผ่านการทำอนุพันธ์และมีความแม่นยำสูง โดยเทคนิคนี้ใช้การตรวจวัดตามขนาดมวลต่อประจุของไอออน ทำให้สามารถยืนยันชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้อง (Vaz *et al.,* 2020) และมีความไว (sensitivity) ในการตรวจวิเคราะห์สูงกว่าเทคนิค HPLC-FLD

เทคนิค solid phase extraction (SPE) เป็นอีกเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนสกัดตัวอย่างสำหรับตัวอย่างของเหลว (liquid sample) และ การทำให้บริสุทธิ์ (clean up) หลังจากการสกัดตัวอย่างของแข็ง (solid sample) สำหรับการวิเคราะห์ AFM1 พบรายงานการใช้ SPE ชนิด C18 ในการวิเคราะห์สารฆ่าแมลง และ AFM1 ในตัวอย่างน้ำนม โดยมีการเจือจางตัวอย่างน้ำนมด้วย deionized water (DI water) ก่อนการ clean-up ตัวอย่าง ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Aguilera-Luiz *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังพบการใช้ SPE ชนิด Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) ในขั้นตอนการ clean-up ตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ AFM1 ในน้ำนมและนมผง ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC-FLD (Wang *et al*., 2012) โดยการใช้งาน SPE ทั้ง 2 ชนิด ข้างต้นต้องมีขั้นตอน pre-treatment คอลัมน์ SPE ด้วย DI water และ methanol (MeOH) ตามลำดับ ก่อนการ clean-up

พบรายงานการใช้เทคนิค SPE ชนิด HLB แบบ pass-through ซึ่งไม่ต้องทำการ pre-treatment คอลัมน์ก่อนการ clean-up ในการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราอุบัติใหม่ ในแป้งสาลี ถั่วลิสง มะเดื่อ อาหารสัตว์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Dreolin *et al*., 2021) สำหรับตัวอย่างน้ำนมพบการใช้เทคนิคดังกล่าวในการวิเคราะห์สารตกค้างยาสัตว์แบบหลายชนิด (multi-residue analysis) โดยมีขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมด้วย 0.2% formic acid in acetonitrile ก่อนการ clean-up ด้วย SPE และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Huang *et al.,* 2015)

ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) เป็นผลที่เกิดจากสิ่งสกัดร่วม (co-extracted) ของสารประกอบในตัวอย่างจากการตรวจวัดค่าความเข้มข้นหรือมวลของสารที่วิเคราะห์ (analyte) อาจสังเกตได้จากสัญญาณของตัวตรวจวัด (detector) ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ analyte ในตัวทำละลาย (European commission, 2024) โดย matrix effect จะรบกวน analyte ในการ ionization ของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณ (signal suppression and enhancement) ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ผิดพลาด (Fan *et al.,* 2015)

การสร้างกราฟมาตรฐานจากเมทริกซ์ (matrix-matched calibration, MMC) เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้ในการชดเชย (compensate) matrix effect ซึ่งทำโดยสกัด blank matrix ชนิดเดียวกับชนิดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ MMC เพื่อชดเชย matrix effect ทำได้ยากเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เนื่องจาก matrix effect ขึ้นกับ co-elute ของ analyte แต่ละชนิด ซึ่งมี

co-extracted กับชนิดตัวอย่าง แตกต่างกันในตัวอย่างต่างชนิดกัน ทำให้การใช้ MMC จะมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography (European commission, 2024)

การสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard, ISTD) ซึ่งเป็นสารประกอบเคมีที่ทราบปริมาณที่แน่นอน เติมในตัวอย่างทดสอบ (test portion) หรือ สิ่งสกัด (sample extract) ในขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องบางขั้นตอนของวิธีวิเคราะห์ โดย ISTD จะมีความเสถียร และมีคุณสมบัติทางเคมี รวมถึงแสดงพฤติกรรมเหมือนกับ analyte ที่วิเคราะห์ (European commission, 2024)

การใช้ไอโซโทปชนิด ^{13}C ของ AFM1 เป็น ISTD ก่อนนำไปวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS สามารถช่วยลดความผิดพลาดจากขั้นตอนการวิเคราะห์ ได้แก่ การเตรียมตัวอย่าง การวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ผลกระทบจากเมทริกซ์ ลดข้อผิดพลาดของปริมาตรตัวอย่างหรือปริมาตรการฉีด และเป็นการเพิ่มความแม่นยำ ความเที่ยงตรงของผลการวิเคราะห์ (Trucksess *et al.*, 2008)

จากข้อมูลข้างต้น ห้องปฏิบัติการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ซึ่งรับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในสินค้าปศุสัตว์ เห็นถึงความสำคัญที่ต้องดำเนินการพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา AFM1 ในน้ำนมดิบและนมผง เพื่อรองรับการดำเนินการตามกิจกรรมตรวจสอบคุณภาพน้ำนม กิจกรรมตรวจตาม พรบ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ และกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปี (residue monitoring plan) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับเฝ้าระวังและควบคุมการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบและนมผง ให้เป็นไปตามกฎระเบียบ และมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ AFM1 ในน้ำนมดิบและนมผง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยเริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS และศึกษาประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค SPE กับ IAC ร่วมกับการใช้ ไอโซโทปชนิด ^{13}C เป็น ISTD หลังจากพัฒนาวิธีได้แล้ว ทำการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024) โดยทดสอบพารามิเตอร์ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity and range) matrix effect ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แบบทวนซ้ำได้ (repeatability) และความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility หรือ intermediate precision) และการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ เมื่อวิธีผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้วิธีแล้ว จะเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมแผนเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปี เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของ AFM1 ประกอบการพิจารณากำหนดมาตรการในการเฝ้าระวังของกรมปศุสัตว์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี :

- Methanol (MeOH), ammonium formate (AmF), formic acid (FA), acetonitrile (ACN), LC-MS และ HPLC grade
- Hexane, HPLC grade
- น้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) มีความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18 MΩ.cm

สารมาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน (standard and internal standard) : เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง

- สารละลายมาตรฐาน aflatoxin M1 ความเข้มเข้น 0.5 µg/mL in acetonitrile ยี่ห้อ Biopure
- สารละลายมาตรฐาน U-[$^{13}C_{17}$]-aflatoxin M1 ความเข้มเข้น 0.5 µg/mL in acetonitrile ยี่ห้อ Biopure

Solid Phase Extraction (SPE):

- Oasis HLB ปริมาณ 200 mg ปริมาตร 6 mL ยี่ห้อ Waters
- Sep-Pak C18 ปริมาณ 200 mg ปริมาตร 6 mL ยี่ห้อ Waters
- Oasis HLB Prime ปริมาณ 150 mg ปริมาตร 3 mL ยี่ห้อ Waters

Immunoaffinity column (IAC):

- Afla M1, HPLC ปริมาตร 3 mL ยี่ห้อ VICAM

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-MS 8060
- เครื่องชั่งความละเอียด 0.01/0.001 กรัม
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
- เครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน
- ชุด SPE vacuum manifold
- Micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ขนาด 0-10, 0-100, 20-200, 100-1,000 และ 500- 5,000 µL-
- HPLC column Kinetex C18, 2.6 µm, 2.1 x 100 mm ยี่ห้อ Phenomenex
- HPLC column Accucore C18, 2.6 µm, 2.1 x 100 mm ยี่ห้อ Thermo Scientific

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างน้ำนมดิบและนมผงที่ไม่พบการปนเปื้อน aflatoxin M1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

4.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

เตรียมสารมาตรฐาน AFM1 และสารมาตรฐานภายใน (ISTD) $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL ใน 5% MeOH ฉีดเข้าส่วน mass spectrometer โดยตรงแบบ direct infusion โดยใช้ ammonium formate buffer เป็น mobile phase และเลือกแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดไอออนบวก (positive ionization) เพื่อหาค่าพลังงาน collision energy (CE), Q1 pre bias, Q3 pre bias และ ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion และ product ion ที่ให้สัญญาณสูงสุดในการวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM)

4.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารด้วย LC-MS/MS

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS โดยเปรียบเทียบสภาวะการชะสารแบบ gradient elution ของระบบ HPLC และ HPLC column Accucore C18 (Dzuman *et al.*, 2015) กับ Kinetex C18 ร่วมกับ gradient profile ที่พัฒนาขึ้น ด้วยการฉีดสารมาตรฐาน AFM1 ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 ng/mL สำหรับน้ำนมดิบ และที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 ng/mL สำหรับนมผง ร่วมกับสารมาตรฐานภายใน $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL ปริมาตร 40 µL จากนั้นเปรียบเทียบสัญญาณพีคและช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย ประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995 ($r \geq 0.995$) (สุจิตตรา, 2555)

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่าง

Method A: Immunoaffinity column (IAC) (VICAM, 2009)

น้ำนมดิบ

ตวงน้ำนมดิบ 100 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 1,540 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวหลังการปั่นเหวี่ยงไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำสิ่งกรองปริมาตร 50 mL ผ่าน IAC ตามด้วยล้าง IAC ด้วย DI water ปริมาตร 10 mL จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการชะตัวอย่าง (elute) ตัวอย่างด้วย ACN : MeOH (3:2) ปริมาตร 1.25 mL และ DI water ปริมาตร 1.25 mL ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างชะได้ (eluate) ไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 °C เติมสารมาตรฐานภายใน $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL ปริมาตร 40 µL ละปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5 % methanol กรองผ่าน syringe filters ชนิด nylon และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

นมผง

ชั่งนมผง 5 g จากนั้นเติม DI water อุณหภูมิประมาณ 30-40 °C ปริมาตร 50 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 1,540 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวหลังการปั่นเหวี่ยงไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำสิ่งกรองปริมาตร 10 mL ผ่าน IAC จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกันกับตัวอย่างน้ำนมดิบ

Method B: SPE HLB (Wang *et al*., 2012)

ตวงน้ำนมดิบ 50 mL (สำหรับนมผง ชั่งนมผง 10 g และเติม DI water อุณหภูมิประมาณ 40 °C ปริมาตร 40 mL) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 8,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวหลังการปั่นเหวี่ยงไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำสิ่งกรองปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผ่าน SPE HLB ซึ่งผ่านการ condition ด้วย ACN 5 mL และ DI water 5 mL จากนั้นล้าง SPE ด้วย 20% ACN ปริมาตร 10 mL จากนั้น elute ตัวอย่างด้วย 100% ACN ปริมาตร 5 mL จากนั้นนำ eluate ไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 °C เติมสารมาตรฐานภายใน $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL ปริมาตร 40 µL และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5 % methanol กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Method C: SPE Oasis Prime HLB (Huang *et al*., 2015)

ปิเปตน้ำนมดิบ 1 mL (สำหรับนมผงชั่งตัวอย่าง 1 g) จากนั้นปิเปต 4 mL 0.2% formic acid in acetonitrile ผสมด้วย vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสผ่าน SPE Oasis Prime HLB ซึ่งผ่านการ condition ด้วย 3 mL 0.2% formic acid in acetonitrile จากนั้นนำ eluate ไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 °C เติมสารมาตรฐานภายใน $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL ปริมาตร 40 µL และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5 % methanol กรองผ่าน syringe filters ชนิด nylon และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Method D: SPE Oasis Prime HLB

ดำเนินการเช่นเดียวกับ method C แต่ใช้ acetonitrile ในการสกัดตัวอย่าง

Method E: SPE Sep-Pak C18 (Aguilera-Luiz *et al*., 2011)

ตวงน้ำนมดิบ 10 mL (สำหรับนมผง ชั่งนมผง 10 g และเติม DI water ปริมาตร 10 mL) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 4,136 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำของเหลวหลังการปั่นเหวี่ยง ผ่าน SPE Sep-Pak C18 ซึ่งผ่านการ condition ด้วย MeOH ปริมาตร 5 mL และ DI water ปริมาตร

5 mL จากนั้นล้าง SPE ด้วย DI water ปริมาตร 5 mL ตามด้วย n-hexane ปริมาตร 5 mL จากนั้น elute ตัวอย่าง ด้วย MeOH ปริมาตร 5 mL จากนั้นนำ eluate ไประเหยแห้งด้วยเครื่องลดปริมาณสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 ºC เติมสารมาตรฐานภายใน $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL ปริมาตร 40 µL และปรับปริมาตรให้ได้ 1 mL ด้วย 5 % methanol กรองผ่าน syringe filters ชนิด PTFE และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

การทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างทำโดยการทดสอบ spike sample จำนวนชนิดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/kg สำหรับน้ำนมดิบ และ 0.5 µg/kg สำหรับนมผง การคำนวณผลจะทำการเปรียบเทียบระหว่าง external calibration standard (ECS) และ internal calibration standard (ICS) แบบ solvent calibration curve โดยคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ย (%mean recovery, %MR) และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พิจารณาเกณฑ์การประเมิน %MR อยู่ระหว่าง 70-120 และ %RSD ≤ 20 ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024)

5. การพิสูจน์ความใช้ได้วิธีวิเคราะห์

5.1 การตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ทำการตรวจสอบโดยประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) จากค่า % signal suppression and enhancement (%SSE) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์กับความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลายจากการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่มีสภาวะของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ดีที่สุดซึ่งค่าการยอมรับอยู่ระหว่าง 80-120% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024)

$$\%SSE = \frac{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในเมทริกซ์}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐานในตัวทำละลาย}} \times 100 \qquad \textbf{สมการที่ 1}$$

5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

ทำการทดสอบโดยสร้างกราฟมาตรฐานในตัวละลายอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น โดยกราฟมาตรฐานจะสร้างระหว่างแกน y คือ area ratio ระหว่าง AFM1 กับ $^{13}C_{17}$-AFM1 และ แกน X คือความเข้มข้นของ AFM1 ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (y = mx + c) และประเมินจากค่า %deviation of back-calculated concentration โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นจริง (C_{True}) เทียบกับความเข้มข้นที่คำนวณได้ ($C_{Measured}$) ของสารมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้นต้องผิดพลาดไม่เกิน ±20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2) (European commission, 2024)

$$\text{Deviation of back-calculated concentration (\%)} = (C_{Measured} - C_{True}) \times 100/C_{True} \qquad \textbf{สมการที่ 2}$$

5.3 การทดสอบค่า LOD และ LOQ

ทำการทดสอบหาค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐาน 10 ซ้ำ ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ความเข้มข้น 0.001 µg/L และในนมผงที่ความเข้มข้น 0.005 µg/kg เกณฑ์ signal to noise ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 3 (S/N ≥ 3) และหาค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐาน 10 ซ้ำ ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่ความเข้มข้น 0.005 µg/L และในนมผงที่ความเข้มข้น 0.025 µg/kg เกณฑ์ S/N ≥ 10, %MR อยู่ระหว่าง 70-120% และ RSD ≤ 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024)

5.4 การทดสอบความแม่นและความเที่ยง

ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.02 และ 0.1 µg/L สำหรับตัวอย่างน้ำนมดิบ และที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.0 µg/kg สำหรับนมผง ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จำนวน 2 ชุด ทดสอบต่างวัน ต่างผู้วิเคราะห์ ประเมินความแม่นพิจารณาค่า %MR และความเที่ยงพิจารณาจาก %RSD ของแต่ละระดับความเข้มข้น เกณฑ์ %MR อยู่ระหว่าง 70-120% และ RSD ≤ 20% ตามเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2) (European commission, 2024)

5.5 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.005 µg/L สำหรับน้ำนมดิบ และความเข้มข้น 0.05 µg/kg สำหรับนมผง ตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 จากนั้นคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U') จากค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard uncertainty, u') ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) = 2 ตามสมการที่ 3

$$U' = k \times u' \qquad \textbf{สมการที่ 3}$$

โดยเลือกแนวทางที่ 1 คือ การประมาณค่าความไม่แน่นอนจาก intra-laboratory validation ในการประมาณค่าความแน่นอนโดย ซึ่งคำนวณค่า u' (measurement uncertainty) จากค่า u'(bias) และ u'(bias) ตามสมการที่ 4

$$u' = \sqrt{u'(bias)^2 + u'(precision)^2} \qquad \textbf{สมการที่ 4}$$

- คำนวณค่า relative bias จากสมการที่ 5

$$\text{relative bias} = \frac{\text{measured concentation - spiked concentration}}{\text{spiked concentration}} \times 100 \qquad \textbf{สมการที่ 5}$$

- คำนวณค่า u'(bias) จากสมการที่ 6

$$u'(bias) = u' = \sqrt{mean_{bias}^{2} + SD.P_{bias}^{2}} \qquad \textbf{สมการที่ 6}$$

- คำนวณค่า u'(precision) จากสมการที่ 7

u'(precision) = RSD_{wR} **สมการที่ 7**

- คำนวณค่า u'(combined) จากสมการที่ 8

u'(combined) = $u' = \sqrt{mean_{bias}^2 + SD.P_{bias}^2 + RSD_{rW}^2}$ **สมการที่ 8**

6. เข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการรายการ liquid milk รหัสตัวอย่าง 0431 จากหน่วยงานผู้จัด BIPEA และรายการ milk powder รหัสตัวอย่าง 0434 จากหน่วยงานผู้จัด FAPAS ประเมินผลจากค่าสถิติ z-score โดยเกณฑ์การตัดสิน คือ $|z| \leq 2$ แสดงว่าผลการทดสอบนั้นยอมรับได้ (satisfactory)

7. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบของกิจกรรมเฝ้าระวังสารตกค้างประจำปีและกิจกรรมตรวจสอบคุณภาพน้ำนม นมยูเอชที นมพาสเจอร์ไรส์ และนมผงจากห้างสรรพสินค้าในจังหวัดนนทบุรีและปทุมธานี รวม 61 ตัวอย่าง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

1.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

ทำการหา precursor ion ที่เหมาะสมของ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 โดยทำ precursor ion scan ที่ช่วง 300-400 m/z พบค่า m/z ที่ให้ intensity สูงสุด คือ 329.15 m/z สำหรับ AFM1 และ 346.2 m/z สำหรับ$^{13}C_{17}$-AFM1 จากนั้นทำการหา product ion โดยใช้ค่า m/z ของ precursor ion ที่ให้ intensity สูงสุด และทำ product ion scan ของ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ช่วง 200-300 m/z พบว่าให้ค่า m/z ของ product ion เท่ากับ 273.1 และ 259.2 m/z สำหรับ AFM1 และ 288.2 m/z สำหรับ $^{13}C_{17}$-AFM1 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Aguilera-Luiz *et al.* (2011); Huang *et al.* (2014) ที่ใช้ precursor ion ที่ 329 m/z และ product ion ที่ 273 และ 259 m/z ในการวิเคราะห์ AFM1 ในน้ำนมดิบ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยในการหา precursor ion และ product ion ที่เหมาะสมทำภายใต้สภาวะแบบ electrospray ionization (ESI) ใน positive mode ตามตารางที่ 2

เมื่อได้ค่า m/z ของ precursor และ product ion ที่เหมาะสม จากนั้นทำการหาสภาวะของ MRM transitions สำหรับการวิเคราะห์ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 โดยหาค่าพลังงาน collision energy, Q1 pre bias และ Q3 pre bias โดยค่าพลังงานที่หาได้รายละเอียดตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

parameters	values
Ion Source	ESI (+)
Ion spray voltage	4 kV
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 3 MRM transitions ของ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q1 pre bias (V)	CE (V)	Q3 pre bias (V)
AFM1	329.15	273.1*	-10.0	-24.0	-19.0
	329.15	259.1	-17.0	-24.0	-18.0
$^{13}C_{17}$-AFM1	346.20	288.2	-18.0	-24.0	-21.0

หมายเหตุ * = Quantifier

1.2 สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ AFM1 ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ AFM1 ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยทำการเปรียบเทียบสภาวะการแยกของ HPLC ตามแนวทางของ Dzuman *et al.* (2015) และสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้นแต่ใช้ mobile phase ชนิดเดียวกัน คือ 5 mM ammonium formate with 0.1 formic acid in DI water (mobile phase A) และ 5 mM ammonium formate with 0.1 formic acid in MeOH (mobile phase B) ซึ่งการใช้ ammonium formate buffer เป็น mobile phase จะส่งผลให้สารพิษจากเชื้อรากลุ่มอะฟลาทอกซิน ให้สัญญาณสูงกว่า 10 เท่า เมื่อเทียบกับสารละลายของ acetate buffer (Dzuman *et. al*, 2014) รายละเอียดสภาวะที่ทำการทดสอบตามตารางที่ 4 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าคอลัมน์ Kinetex กับสภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น โดยมีการปรับสัดส่วน mobile phase และอัตราการไหล (flow rate) ขณะทำการแยกด้วย HPLC พบว่าช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ให้สัญญานพีคที่สูง (peak height) และความกว้างของพีค (peak width) ที่แคบกว่าคอลัมน์ Accucore ตามตารางที่ 5 และภาพที่ 3.1-3.2

ตารางที่ 4 HPLC condition และ column สำหรับวิเคราะห์ AFM1

Parameters	Conditions	
	Dzuman *et al.*, 2015	**สภาวะที่พัฒนาขึ้น**
HPLC column	Accucore C18	Kinetex C18
Flow rate	0.4 mL/min	0.25 mL/min (initial)
Injection volume	3.0 µL	3.0 µL
Column oven	25 °C	40°C
Elution mode	Gradient elution Initial 0.0% B; 4.0 min 20% B; 9.5 min 40% B; 10.5-13.0 min 100% B; 13.10-16.0 min 0.0% B	Gradient elution Initial 10.0% B; 1.0 min 50.0 % B; 4.0 min 40% B (0.3 mL/min); 8.0-10.0 min 100% B (0.5 mL/min);10.01min 10.0%B (0.4 mL/min); 12.0 min 10%B (0.3 mL/min)
Run time	16 min	12 min

ตารางที่ 5 ค่าสัญญาณพีคของ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL

Compounds	Dzuman *et al.*, 2015				สภาวะที่พัฒนาขึ้น			
	area	height	RT	S/N	area	height	RT	S/N
AFM1	73,547	12,228	7.60	615.5	92,128	14,698	4.06	1,783.1
$^{13}C_{17}$-AFM1	51,617	8,624	7.60	36.3	68,307	10,959	4.06	161.4

ภาพที่ 3.1 Extract ion chromatogram (XIC) ของ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL เมื่อทดสอบตามสภาวะของ Dzuman *et al.*, (2015)

ภาพที่ 3.2 Extract ion chromatogram (XIC) ของ AFM1 และ $^{13}C_{17}$-AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.4 ng/mL เมื่อทดสอบตามสภาวะที่พัฒนาขึ้น

ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน พบว่าที่ช่วงความเข้มข้น 0.25–5.0 ng/mL และ 0.025-1.0 ng/mL ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบและนมผง ตามลำดับให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการทดสอบที่ $r > 0.9999$ ทั้ง 2 สภาวะที่ทำการทดสอบ ตามตารางที่ 5 ซึ่งจากผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ จึงเลือกใช้คอลัมน์ Kinetex และสภาวะที่พัฒนาขึ้นในการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างต่อไป

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของ AFM1

Dzuman *et al.*, 2015				สภาวะที่พัฒนาขึ้น			
Raw milk		Milk powder		Raw milk		Milk powder	
range (ng/mL)	*r*	range (ng/mL)	*r*	range (ng/mL)	*r*	range (ng/mL)	*r*
0.25-5.0	0.9999	0.025-1.0	0.9999	0.25-5.0	0.9999	0.025-1.0	0.9999

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีเตรียมตัวอย่าง

การทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างทำโดยการทดสอบ spiked sample จำนวนชนิดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/L สำหรับน้ำนมดิบ และ 0.5 µg/kg สำหรับนมผง เปรียบเทียบ 5 วิธี และเปรียบเทียบการคำนวณผลระหว่าง external calibration standard และ internal calibration standard แบบ solvent calibration curve โดยประเมินจากค่า %MR อยู่ในช่วง 70-120%

เทคนิค SPE ชนิด HLB แบบดั้งเดิม (method B) ที่ต้องอาศัยการ condition column และไม่มีการตกตะกอนโปรตีนและไขมันในน้ำนมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์หรือเจือจางตัวอย่าง ให้ค่า %MR < 38.5 ในตัวอย่างน้ำนมดิบ และ < 53.3 ในนมผง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aguilera-Luiz *et al.* (2011) ที่ใช้ น้ำในการเจือจางตัวอย่างน้ำนมดิบด้วยเทคนิค SPE แต่ในทางกลับกันเมื่อใช้เทคนิค pass through SPE ชนิด HLB ซึ่งมีการตกตะกอนโปรตีนด้วย 0.2% formic acid in acetonitrile (method C) และ acetonitrile (method D) ให้ค่า %MR อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ >74.9 ในน้ำนมดิบ แต่ในตัวอย่างนมผงค่า %MR < 55 ตามลำดับ สำหรับเทคนิค SPE ชนิด C18 (method E) ให้ค่า %MR > 66.4 ในตัวอย่างน้ำนมดิบ แต่ในทางกลับกันในนมผงให้ค่า %MR < 6 และเกิดการ clogging ใน SPE cartridge เนื่องจากในนมผงมีโมเลกุลของไขมันและโปรตีนค่อนข้างสูงกว่าในน้ำนมดิบ และการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ และการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงอาจไม่เพียงพอต่อการลดปริมาณ matrix content ได้ (Aguilera-Luiz *et. al*, 2011)

เทคนิค IAC (method A) ให้ค่า %MR > 81.2 ในน้ำนมดิบ และ > 93.8 ในนมผง โดยไม่ต้องอาศัยการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ อาศัยหลักการ antigen-antibody binding โดย monoclonal antibodies ในคอลัมน์จะจับอย่างจำเพาะเจาะจง (specific binding) กับ AFM1 (antigen) ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค SPE ที่ไม่สามารถเลือกจับเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ แต่จะจับสารที่สนใจหรือขจัดสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่คล้ายคลึงกับชนิดของ cartridge ของ SPE ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการ clean-up ลดลงเมื่อต้องวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความซับซ้อนและมี matrix content สูง เช่น น้ำนมดิบ และนมผง เป็นต้น

สำหรับการเปรียบเทียบการคำนวณผลระหว่าง ECS และ ICS พบว่าในทุกวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ทำการทดสอบการใช้ ICS ในการคำนวณผลจะส่งผลให้ %MR มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ ECS ยกเว้น method E ในการทดสอบตัวอย่างนมผง ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างที่มีการคำนวณผลแบบ ECS และ ICS ตามภาพที่ 4 ซึ่งจากผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างจึงเลือกเทคนิค IAC

ในการเตรียมตัวอย่าง ร่วมกับการใช้ $^{13}C_{17}$-AFM1 เป็น ISTD สำหรับการคำนวณผลแบบ ICS ในการพิสูจน์ความใช้ได้ต่อไป

ภาพที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่าง และคำนวณผลแบบ ECS และ ICS

2. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี

2.1 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) คือ ผลกระทบที่เกิดการชะร่วมกัน (co-eluted) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) กับส่วนประกอบของเมทริกซ์ (matrix content) โดย matrix effect จะพบมากกับตัวอย่างที่ความซับซ้อน และมีปริมาณ matrix content สูง เช่น น้ำนมดิบ นมผง เป็นต้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสามารถในการทำ ionization ด้วยเทคนิค ESI ของเครื่อง LC-MS/MS ทำให้สัญญาณที่ตรวจวัดได้ในกราฟมาตรฐานที่เตรียมในสารละลาย กับที่อยู่ในเมทริกซ์มีความแตกต่างกัน (Souverain *et. al*, 2004) ในลักษณะเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณ (signal suppression and enhancement) ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ผิดพลาด

ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบการใช้ ECS กับ ICS โดยเลือกใช้ stable isotopically labeled standard (SIDA) คือ $^{13}C_{17}$-AFM1 เป็น ISTD โดยประเมินค่า %SSE จากการสร้างกราฟมาตรฐานในตัวอย่างและในตัวทำละลาย พบค่า %SSE เท่ากับ 91.9% ในตัวอย่างน้ำนมดิบ และ 93.0 % ในตัวอย่างนมผงเมื่อคำนวณผลจาก ECS และค่า %SSE เท่ากับ 103.3% ในตัวอย่างน้ำนมดิบ และ 103.1% ในตัวอย่างนมผง เมื่อใช้ ICS แบบ isotope-labeled พบว่าสามารถช่วยลด matrix effect ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำมากขึ้น (Varga *et al.*, 2012) รายละเอียดตามตารางที่ 7.1 และ 7.2

ตารางที่ 7.1 ผลการทดสอบ matrix effect เมื่อทดสอบด้วย ECS

Matrix	Calibration slope		%SSE	Calibration range, ng/mL
	Matrix-match	Standard solution		
raw milk	55,419.6	60,294.2	91.9	0.25-5.0
milk powder	227,723	244,908	93.0	0.025-1.0

ตารางที่ 7.2 ผลการทดสอบ matrix effect เมื่อทดสอบด้วย ICS

Matrix	Calibration slope		%SSE	Calibration range, ng/mL
	Matrix-match	Standard solution		
raw milk	3.7491	3.6300	103.3	0.25-5.0
milk powder	3.4955	3.3919	103.1	0.025-1.0

2.2 ผลการความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

ผลการทดสอบค่า %deviation of back-calculated concentration โดยสร้างกราฟมาตรฐาน AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.25-5.0 ng/mL พบมีค่าอยู่ระหว่าง -0.6-6.0 สำหรับน้ำนมดิบ และที่ความเข้มข้น 0.025-1.0 ng/mL พบมีค่าอยู่ระหว่าง 0.11-15.9 สำหรับนมผง ตามลำดับ ซึ่งค่า %deviation of back-calculated concentration เป็นไปตามเกณฑ์ที่ SANTE 11352/2021 V2 (European commission, 2024) กำหนดไว้ คือ %deviation of back-calculated concentration ของสารมาตรฐาน AFM1 แต่ละความเข้มข้นผิดพลาดไม่เกิน ±20%

2.3 ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ

ผลการทดสอบของตัวอย่างน้ำนมดิบที่เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.001 µg/L พบว่า S/N ของ AFM1 เท่ากับ 23.4 และที่ความเข้มข้น 0.005 µg/L ได้ค่า S/N เท่ากับ 107.5 , ค่า %MR เท่ากับ 99.6% และ %RSD เท่ากับ 7.5 แสดงว่าค่า LOD และ LOQ ในการวิเคราะห์ AFM1 ในตัวอย่างน้ำนมดิบ คือ 0.001 µg/L และ 0.005 µg/L ตามลำดับ

สำหรับนมผงทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.005 µg/kg พบว่า S/N ของ AFM1 เท่ากับ 22.1 และที่ความเข้มข้น 0.025 µg/kg ได้ค่า S/N เท่ากับ 66.0 , ค่า %MR เท่ากับ 84.2% และ %RSD เท่ากับ 7.2 แสดงว่าค่า LOD และ LOQ ในการวิเคราะห์ AFM1 ในตัวอย่างนมผง คือ 0.005 µg/kg และ 0.025 µg/kg ตามลำดับ

ค่า LOQ ของ AFM1 ในตัวอย่างน้ำนมดิบและนมผงของวิธีที่พิสูจน์นี้เป็นไปตามเกณฑ์ที่ SANTE 11352/2021 V2 กำหนดไว้ คือ LOQ ≤ ML (European commission, 2024) เมื่อค่า ML ของ AFM1 ตามมาตรฐานของสหภาพยุโรปใน Commission regulation (EU) No 2023/915 เท่ากับ 0.05 µg/kg และ 0.025 µg/kg ในน้ำนมดิบ และนมผง ตามลำดับ (European commission, 2023)

2.4 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยง

ความแม่นของวิธีทดสอบแสดงโดยค่า %MR และความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) จาก %RSDr และแบบทวนซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) จาก %RSDwr ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.02 และ 0.1 µg/L สำหรับน้ำนมดิบ และความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.0 µg/kg สำหรับนมผง พบว่าผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR อยู่ในช่วง 70-120 และค่า %RSDr < 20% เช่นเดียวกับผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ก็ให้ค่า %MR และ %RSDwr เป็นไปตามเกณฑ์ %MR ช่วง 70-120 และค่า %RSDwr < 20% ทั้งในตัวอย่างน้ำนมดิบและนมผง ตามตารางที่ 8.1 และ 8.2

ตารางที่ 8.1 ค่า %MR และ %RSD ของการวิเคราะห์ AFM1 ใน spiked sample (น้ำนมดิบ)

Spike level	Repeatability (%RSDr), (%MR)		Within-lab reproducibility
(µg/L)	day 1 (n=5)	day 2 (n=5)	(%RSDwr), (%MR) (n=10)
0.005	2.7 (92.7)	3.2 (88.8)	3.6 (90.7)
0.02	9.2 (80.9)	7.0 (83.5)	7.9 (82.2)
0.1	3.8 (74.5)	6.1 (81.4)	6.8 (78.0)

ตารางที่ 8.2 ค่า %MR และ %RSD ของการวิเคราะห์ AFM1 ใน spiked sample (นมผง)

Spike level	Repeatability (%RSDr), (%MR)		Within-lab reproducibility
(µg/kg)	day 1 (n=5)	day 2 (n=5)	(%RSDwr), (%MR) (n=10)
0.05	3.5 (85.0)	4.0 (84.8)	3.5 (84.9)
0.2	11.4 (74.7)	7.2 (70.8)	9.6 (72.7)
1.0	9.8 (81.2)	5.0 (74.2)	8.9 (77.7)

2.5 การประเมินค่าความไม่แน่นอน

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการวิเคราะห์ AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.005 µg/L สำหรับน้ำนมดิบ และความเข้มข้น 0.05 µg/kg สำหรับนมผง ตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 แนวทางที่ 1 คือ การประมาณค่าความไม่แน่นอนจาก intra-laboratory validation พบว่าค่าความไม่แน่นอน U'(expanded MU) ในการวิเคราะห์ AFM1 เท่ากับ 34.4 % และ 31.6% ในตัวอย่างน้ำนมดิบและนมผง ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์ SANTE 11312/2021 V2 (European commission, 2024) ที่กำหนดให้ค่า U'(expanded MU) (%) ต้องมีค่าไม่เกิน 50% รายละเอียดตามตารางที่ 9.1 และ 9.2

ตารางที่ 9.1 การคำนวณค่า U'(expanded) ที่ความเข้มข้น 0.005 µg/L ในน้ำนมดิบ

No	spike Level (5 ng/L)	measured (ng/L)	relative bias (%)
1	5	4.116	-17.68
2	5	4.576	-8.48
3	5	4.526	-9.48
4	5	4.556	-8.88
5	5	4.436	-11.28
6	5	3.830	-23.40
7	5	3.840	-23.20
8	5	4.150	-17.00
9	5	4.380	-12.40
10	5	4.150	-17.00
N		10	
mean		4.256	-14.88
SD.Pbias (stdev) (%)			5.6162
Standard dev.measured (ug/L) (stdev)		0.2808	
RSDwR (%)		6.5979	
U'(bias) (%)			15.9046
U'(precision)		6.5979	
U'(combine) (%)		17.2188	17.2188
U'(expanded) (%)		34.4377	

ตารางที่ 9.2 การคำนวณค่า U'(expanded) ที่ความเข้มข้น 0.05 µg/kg ในนมผง

No	spike level (0.05 ug/kg)	measure (ug/kg)	relative bias (%)
1	0.05	0.04248	-15.04
2	0.05	0.04117	-17.66
3	0.05	0.04103	-17.94
4	0.05	0.04326	-13.48
5	0.05	0.04454	-10.92
6	0.05	0.04062	-18.76
7	0.05	0.04307	-13.86
8	0.05	0.04493	-10.14
9	0.05	0.04208	-15.84
10	0.05	0.04128	-17.44
N		10	
mean		0.042	-15.108
SD.Pbias (stdev) (%)			2.987
Standard dev.measured (ug/kg) (stdev)		0.001	
RSDwR (%)		3.518	
U'(bias) (%)			15.400
U'(precision)		3.518	
U'(combine) (%)		15.797	15.797
U'(expanded) (%)		31.594	

3. การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing)

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างรายการ AFM1 liquid milk รหัสตัวอย่าง 0431 จากหน่วยงานผู้จัด BIPEA จำนวน 2 ตัวอย่าง และรายการ AFM1 milk powder รหัสตัวอย่าง 0434 จากหน่วยงานผู้จัด FAPAS จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีที่ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้และประเมินด้วยค่า z-score $|z| \leq 2$ พบว่าค่า z-score ที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $|z| \leq 2$ ตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ (proficiency testing)

Sample code	Sample	Provider	Assigned value	Measured value	z-score
431	Liquid milk	BIPEA	0.089 µg/L	0.078 µg/L	-0.42
			0.083 µg/L	0.077 µg/L	-0.24
434	Milk powder	FAPAS	0.35 µg/kg	0.244 µg/kg	-1.4

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิธีที่พัฒนาขึ้นอาศัยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค IAC ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ AFM1 ได้กับ low fat milk, skimmed milk, low fat milk powder และ skimmed milk powder (ISO 14501:2021) และน้ำนม (liquid milk) ตามวิธี AOAC 2000.08 (AOAC, 2023) โดยผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างนมทั้ง 4 ชนิด จำนวน 61 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำนมดิบ จำนวน 29 ตัวอย่าง นมยูเอชที 16 ตัวอย่าง นมพาสเจอร์ไรส์ จำนวน 5 ตัวอย่าง และนมผง จำนวน 11 ตัวอย่าง พบว่า 72.1% มีการปนเปื้อน AFM1 จำแนกเป็นน้ำนมดิบ (89.7%) นมยูเอชที (75%) นมพาสเจอร์ไรส์ (100%) และนมผง (9.1%)

โดยเมื่อแปลงหน่วยการคำนวณผล AFM1 ในน้ำนมดิบในหน่วยปริมาตร (µg/L) เป็นหน่วยน้ำหนัก (µg/kg) เมื่อค่าความถ่วงจำเพาะที่ 20 °C ของน้ำนมดิบเท่ากับ 1.028 g/mL พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบ และนมที่ผ่านกระบวนการผลิต (process milk) ได้แก่ นมผง และนมยูเอชที พบว่าน้ำนมดิบพบการปนเปื้อนในระดับความเข้มข้นของ AFM1 ที่สูงกว่า process milk ซึ่งกระบวนการผลิตต้องอาศัยน้ำนมดิบจำนวนมากจากหลายฟาร์มโคนม ทำให้เกิดการเจือจาง (dilution) ของ AFM1 ระหว่างการผลิต (processing) และการเก็บรักษา (storage) ส่งผลให้ระดับการปนเปื้อนของ AFM1 ต่ำกว่าในน้ำนมดิบ (Min *et al*., 2021)

นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อน AFM1 เกินค่ามาตรฐานของสหภาพยุโรป ในตัวอย่างน้ำนมดิบ นมพาสเจอร์ไรส์ และนมยูเอชที จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.4% ที่มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานของสหภาพยุโรป (ML = 0.05 µg/kg) แต่ไม่เกินค่ามาตรฐานของ CODEX และประกาศกระทรวงสาธารณสุข ที่กำหนดไว้ 0.5 µg/kg และพบตัวอย่างน้ำนมดิบจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่มีการปนเปื้อนสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขและ CODEX (ML = 0.5 µg/kg) แต่ไม่พบการปนเปื้อนเกินค่ามาตรฐานสำหรับนมยูเอชที และนมพาสเจอร์ไรส์ สอดคล้องกับรายงานของ Poapolathep *et al.* (2024) ที่ไม่พบการปนเปื้อนของ AFM1 เกินเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธาณสุขและ CODEX จากการสำรวจในตัวอย่างนมยูเอชที และนมพาสเจอร์ไรส์ ในช่วงปี 2019-2022 ของประเทศไทย รายละเอียดแสดงผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ AFM1 ในตัวอย่างนมทั้ง 5 ชนิด แสดงตามตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ระดับการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนม และนมผง

Milk	No. Sample	Positive sample	% Positive sample	Range (µg/kg)	Mean (µg/kg)
Raw	29	26	89.7	0.002-1.485	0.08
UHT	16	12	75	0.001-0.088	0.022
Pasteurized	5	5	100	0.005-0.052	0.028
Powder	11	1	9.1	0.017	0.017

สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ AFM1 ในน้ำนมดิบและนมผง โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค IAC ร่วมกับการคำนวณปริมาณด้วย ICS โดยเติม SIDA คือ $^{13}C_{17}$-AFM1 ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS วิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้และประเมินค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของ SANTE 11312/2021 V2 มีประสิทธิภาพเพียงพอ สามารถตรวจแยกชนิดและยืนยันปริมาณของ AFM1 ในในน้ำนมดิบและนมผง ที่มีการกำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อน AFM1 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฯ สหภาพยุโรป และ CODEX ได้ โดยมีช่วงการวิเคราะห์ของวิธีที่ระดับความเข้มข้น 0.25-5.0 µg/L และ 0.025-1.0 µg/kg สำหรับน้ำนมดิบและนมผงตามลำดับ ค่า LOD เท่ากับ 0.001 µg/L, LOQ เท่ากับ 0.005 µg/L สำหรับน้ำนมดิบ และ LOD เท่ากับ 0.005 µg/kg, LOQ เท่ากับ 0.025 µg/kg สำหรับนมผง

ความแม่นโดยค่า %MR อยู่ในช่วง 74.5-92.7 สำหรับน้ำนมดิบ และ 74.2-85.0 สำหรับนมผง ความเที่ยงโดยค่า %RSD < 20% ผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด การศึกษา matrix effect โดยค่า %SSE พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 80-120% การประเมินค่าความไม่แน่นอนอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ U'(expanded MU) (%) ไม่เกิน 50% ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการในตัวอย่างน้ำนมและนมผง โดยประเมินจากค่า z-score พบว่าผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ $|z| \leq 2$ จึงชี้ให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการตรวจยืนยันชนิดและปริมาณ AFM1 ในน้ำนมดิบและนมผง

ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตควรนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีแล้วไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ สารพิษจากเชื้อราอุบัติใหม่ (emerging mycotoxins) รวมถึงสารพิษจากพืช (plant toxins) และยาสัตว์ตกค้าง (veterinary drug residues) ที่มีโอกาสพบการปนเปื้อนและตกค้าง ในน้ำนมดิบและนมผง เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อน และยาสัตว์ตกค้างได้ครอบคลุมตามมาตรฐานสากลและสถานการณ์ปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน สัตวแพทย์หญิงเนาวรัตน์ กำภูศิริ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ให้การอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบในการตรวจวิเคราะห์ และบุคลากรงานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ในความร่วมมือปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC. สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผล และวิธี คัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. ปทุมธานี.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2563. มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน, น 17-18. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 พ.ศ. 2536 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 20 พฤษภาคม 2536. ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 137 ตอนพิเศษ 118 ง, 7.

Aguilera-Luiz, M.M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Martínez Vidal, J.L. and Garrido Frenich, A. (2011) Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 399:2863–2875

AOAC (2023). Official Methods of Analysis, 22th Ed. 2023, AOAC INTERNATIONAL, Method 2000.08.

Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J. A. and Shlosberg A. (2013). Carry-over of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation. *Toxins* (Basel), 5(1)

Codex. 2019. CXS 193-1995. General standard for contaminants and toxins in food and feed. Revision 2009. Amendment 2019

Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N. and Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. InTech; 2011. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/22717

Dreolin, N., Stead, S., Hird, S. and Jenkins, T. (2021). Determination of regulated mycotoxins in cereals, nuts, figs and animal feeds using pass-through SPE and UHPLC-MS/MS. *Water application note* 720007377, September 2021.

Dzuman, Z., Zachariasova, M., Veprikova, Z., Godula M. and Hajslova, J. (2015). Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Anal Chim Acta*, 863, 29-40.

European Commission (2023). Commission Regulation (EU) No 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing regulation (EC) No. 1881/2006 *Off. J. Eur. Union*, 119: 103-157.

European Commission (2024). Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. SANTE 11312/2021 V2, Supersedes Document No. SANTE/11312/2021. Implemented by 01/01/2024.

Fan, S., Li, Q., Sun, L., Du, Y., Xia, J. and Zhang, Y. (2015). Simultaneous determination of aflatoxin B1 and M1 in milk, fresh milk and milk powder by LC-MS/MS utilizing online turbulent flow chromatography. *Food Addit. Contam.* 32(7): 1175-1184.

Ferrari, L., Fumagalli, F., Rizzi, N., Grandi, E., Vailati, S., Manoni, M., Ottoboni, M., Cheli, F. and Pinotti, L. (2022). An Eight-Year Survey on Aflatoxin B1 Indicates High Feed Safety in Animal Feed and Forages in Northern Italy. *Toxins* 2022, 14, 763.

Fu, Y. M. (1996). Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using immuno-affinity column and fluorescence measurement. *J. Food Drug Anal.* 4(2): 4.

Groopman, J. D., Cain, L. G. and Kensler, T. W. (1988). Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. v. 19.

Huang, L.C., Zheng, N., Zheng, B.Q., Wen, F., Cheng, J.B., Han, R.W., Xu, X.M., Li, S.L. and Wang, J.Q. (2014) Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and a-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry* 146 (2014) 242–249.

Huang, D., Kim V. T., and Young M.S. (2015). Simple Cleanup Protocol Using a Novel SPE Device for UPLC-MS/MS Analysis of Multi-Residue Veterinary Drugs in Milk. *Water application note* 72000541, May 2015.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). Aflatoxins. In: Chemical agents and related occupations. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 100F. pp. 226-248

International Organization for Standardization. (2021). ISO 14501:2021. Milk and milk powder - Determination of aflatoxin M1 content - Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography.

Mahato, D. K., Lee, K. E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K. N., Kumar, P. and Kang, S. G. (2019). Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Frontiers in microbiology,* 10, 483502.

Min, L., Fink-Gremmels, J., Li, D., Tong, X., Tang, J., Nan, X., Yu, Z., Chen, W. and Wang, G. (2021). An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. *Anim. Nutr.* 7: 42-48.

Oesch, F. and Arand, M. (1999). Xenobiotic Metabolism. In (pp. 83-109).

Poapolathep S., Klangkaew, N., Phaochoosak, N., Jawjaroensri, W., Sroynum, A., Saipinta, D., Suriyasathaporn, W., Giorgi, M., Zhang, Z., Fink-Gremmels, J. and Poapolathep, A. (2024). Occurrence and potential health risk of aflatoxin M1 in raw, pasteurized, and UHT milk in Thailand. *World Mycotoxin Journal* 17 (2024) 85–94

Shuib, N. S., Makahleh, A., Salhimi, S. M. and Saad, B. (2017). Determination of aflatoxin M1 in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-fluorescence with post column photochemical derivatization. *J. Chromatogr. A.* 1510: 51-56.

Souverain, S., Rudaz, S. and Veuthey, J.L. (2004). Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr. A.* 1058(1), 61-66

Trucksess, M. W., Weaver, C.M., Oles, C.J., Fry, F.S., Noonan, G.O., Betz, J.M. and Rader, J.I. (2008). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in ginseng and ginger by multitoxin immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic quantitation: collaborative study. *J. AOAC Int*. 91(3), 511-523.

Wang, Y., Xuebo, L., Chunxia, X., Zhouli, W., Jianguo, W., Haifang, X., Lu, C., Qisen, X. and Tianli Y. (2012). HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control* 28 (2012), 131-134

Varga, E., T. Glauner, R. Köppen, K. Mayer, M. Sulyok, R. Schuhmacher, R. Krska and F. Berthiller. (2012). Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. *Anal.Bioanal. Chem.,* 402, 2675–2686.

Vaz, A., Cabral Silva, A. C., Rodrigues, P., and Venâncio, A. (2020). Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms*, 8(2), 246.

Vicam Afla M1 Instruction Manual. (2009). AFLA M1 Sample Preparations Procedure for Fluid Milk, Milk Powder page 10-11.