

การศึกษาวิธีตรวจวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของแนปทาลินในนมผง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

นภดล ปฏิรัตน์¹ มารีสา ดวงแก้ว¹ ปาริสา สอนธิ² ไพบุลย์ ทุมรินทร์¹ อลิษา วงษ์มาน^{1*}

¹ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาคลินิก งานพิษวิทยาศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 10700 ประเทศไทย

²ธนาคารนมแม่ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 10700 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

แนปทาลิน หรือลูกเหม็น เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการป้องกันแมลง อย่างไรก็ตาม สารนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็งและอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ โดยเฉพาะกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยง เช่น เด็กเล็ก และผู้ให้นมบุตร เมื่อแนปทาลินเข้าสู่ร่างกาย จะเปลี่ยนเป็นสาร 1-naphthol และ 2-naphthol ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะและน้ำนมแม่ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารดังกล่าวในน้ำนมแม่ โดยใช้ตัวอย่างนมผงสูตรสำหรับทารกที่มีองค์ประกอบทางโภชนาการใกล้เคียงกับนมแม่เป็นแบบจำลอง ตัวอย่างนมผงถูกเติมสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมาแยกด้วยกรดเกลือ สกัดด้วย Solid Phase Extraction ระเหยแห้ง แล้วจึงทำปฏิกิริยากับ BSTFA+1%TMCS และวิเคราะห์โดยใช้ Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นไปตามหลักเกณฑ์ของ USFDA Guidance จากการศึกษา พบว่า มีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดี โดยมี $r^2 = 0.998$ สำหรับ 1-naphthol และ $r^2 = 0.998$ สำหรับ 2-naphthol ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (10.00-500.00 ng/ml) มีความไวในการตรวจวัดต่ำสุดที่ 10.00 ng/ml มีค่าความถูกต้องอยู่ในช่วง 95.73-114.96% และค่าความแม่นยำอยู่ที่ 0.03-15.02 %CV ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา (10.00, 25.00, 50.00 และ 100.00 ng/ml) วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจวัดสาร 1-naphthol และ 2-naphthol ในน้ำนมแม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในน้ำนมแม่ และสามารถนำไปใช้ในการกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นมสำหรับทารกได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในอนาคตควรขยายไปสู่การวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำนมแม่จริงเพื่อยืนยันผลการศึกษาเพิ่มเติม

คำสำคัญ: น้ำนมแม่ แนปทาลิน ลูกเหม็น สารก่อมะเร็ง แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

รับบทความ: 29 พฤศจิกายน 2567 แก้ไข: 23 ธันวาคม 2567 ตอรับ: 26 ธันวาคม 2567

*ผู้รับผิดชอบบทความ

อลิษา วงษ์มาน

ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาคลินิก งานพิษวิทยาศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 10700 ประเทศไทย

อีเมล: nooreeya@hotmail.com

Method Development for Analyzing the Naphthalene Metabolites in Milk Powder with Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Naphadol Patirathnang¹ Marisa Duangkaew¹ Parisa Sonti² Paiboon Tummarintra¹
Alisa Wongman^{1,*}

¹Clinical of Toxicology Laboratory, Siriraj Toxicology Department, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand

²Siriraj Human Milk Bank, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand

Abstract

Naphthalene, also known as mothballs, is a volatile organic compound widely used in insect repellents. However, it is classified as a carcinogen and can cause health effects, particularly in at-risk populations such as children and breastfeeding individuals. When naphthalene gas is inhaled, it is metabolized into 1-naphthol and 2-naphthol, which are excreted in urine and breast milk. This study aimed to develop a method for detecting naphthalene metabolites in breast milk using laboratory-prepared samples made from milk powder (baby formula) with chemical compositions similar to human breast milk. The 1-naphthol and 2-naphthol were added to the study as indicated. The samples obtained from the extraction are dried and reacted with BSTFA+1%TMCS and further analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The method complied with USFDA Guidance requirements. The linear correlation was observed in the concentration range of 10.00-500.00 ng/ml for 1-naphthol ($r^2 = 0.998$) and for 2-naphthol ($r^2 = 0.998$). The limit of detection by this method was 10 ng/ml with the accuracy ranged from 95.73-114.96% and the precision was 0.03-15.02 %CV at the studied concentrations (10.00, 25.00, 50.00 and 100.00 ng/ml). The development of a method for analyzing 1-naphthol and 2-naphthol in milk has been able to analyze the following substances well. The method demonstrates high accuracy according to the specified criteria and is suitable for application to human breast milk, particularly donated milk, before it is provided to infants. However, further research is needed to explore the analysis of naphthalene metabolites in human breast milk.

Keyword: Breast Milk, Naphthalene, Mothballs, Carcinogen, Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Received: 29 November 2024, Revised: 23 December 2024, Accepted: 26 December 2024

*Corresponding author

Alisa Wongman

Clinical of Toxicology Laboratory, Siriraj Toxicology Department, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand

E-mail: nooreeya@hotmail.com

บทนำ

แนปทาไลน์ (Naphthalene) หรือที่รู้จักกันดีในชื่อ “ลูกเหม็น” เป็นสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัวนิยมใช้ในการขับไล่แมลงรบกวนในบ้านเรือน แต่สารแนปทาไลน์เองถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ หรืออาจจะก่อมะเร็งในมนุษย์ได้^{1,2} ด้วยเหตุที่สารแนปทาไลน์อาจจะทำให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์จึงมีหลายประเทศให้ความสำคัญและกำหนดค่าของการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรือในอาคารไม่ให้เกินมาตรฐาน เช่น ประเทศแคนาดา กำหนดว่าต้องมีสารระเหยแนปทาไลน์ อยู่ในอาคารได้ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อตารางเมตร³ เป็นต้น สารแนปทาไลน์เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็น สารแนปทอนส์ (Naphthols) ซึ่งจะเป็นตัวชี้วัดการได้รับสารแนปทาไลน์ จะพบอยู่ 2 รูป คือ 1-แนปทอน (1-naphthol, beta-naphthol, 1-naph) และ 2-แนปทอน (2-naphthol, alpha-naphthol, 2-naph)^{4,5} ในปัสสาวะของผู้ที่ได้รับสัมผัส โดยมีสูตรทางเคมีคือ $C_{10}H_8O$ เหมือนกันทั้งสองชนิด แต่ 1-naph อาจจะมาจากสารเมตาบอไลต์ของยาฆ่าแมลงคาร์บาริลได้เช่นกัน⁶ การที่ลูกเหม็นนิยมนำมาเป็นสารขับไล่แมลงรบกวนแมลงสาป หรืออื่นๆ จึงมักจะนำไปไว้ในห้องนอน ตู้เสื้อผ้า ในบ้านเรือนที่มีผู้อยู่อาศัย เป็นที่น่ากังวลโดยเฉพาะบ้านเรือนที่มีผู้อยู่อาศัยเป็นหญิงตั้งครรภ์ หรือกำลังให้นมบุตร เพราะสารเหล่านี้สามารถเข้าสู่ร่างกายและขับออกมาทางน้ำนมได้⁷⁻⁹ สารดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อทารกทั้งในผู้ใหญ่และเด็กที่ขาด glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อชีวิต เนื่องจากสารดังกล่าวมีการขับออกมทางน้ำนมได้ ดังนั้นถึงแม้ทารกไม่ได้สัมผัสสาร

โดยตรงก็อาจจะได้รับสารดังกล่าวผ่านทางน้ำนมแม่ได้ ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพของทารกได้เช่นกัน

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์แนปทาไลน์และสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างทางชีวภาพต่างๆ เช่น ปัสสาวะและเลือด ซึ่งวิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS, LC-MS/HPLC หรือหลายเทคนิค¹⁰⁻²¹ อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อมูลการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของแนปทาไลน์ในน้ำนมแม่ค่อนข้างจำกัด งานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่เน้นไปที่การตรวจหาแนปทาไลน์ในน้ำนมแม่²²⁻²³ มากกว่าสารเมตาบอไลต์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ 1-naphthol และ 2-naphthol ในนมผงสูตรสำหรับทารก ซึ่งเป็นแบบจำลองของน้ำนมแม่ เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเมตาบอไลต์แนปทาไลน์ในน้ำนมแม่จริง ผลการศึกษาค้นนี้จะประโยชน์ต่อการประเมินความเสี่ยงและการกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นมสำหรับทารก รวมถึงการส่งเสริมสุขภาพของทารกแรกเกิด

วัสดุ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

สารมาตรฐานและสารเคมี

1 - naph (>99%), 2- naph (>99%), phenylephrine (98%) และ N,O-bis trimethylsilyl) Trifluoro-acetamide + 1% Trimethylchlorosilane (BSTFA+1%TMCS) จาก Sigma (St. Louis, MO, USA) กรด HCl และสารเคมีอื่นๆเป็นเกรดสำหรับงานวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

เครื่อง GC-MS เป็น Agilent 7890A ที่ฉีดตัวอย่างด้วย split/splitless การศึกษานี้จะใช้ column ชนิด 30m HP-50+ column ขนาด 0.2 mm I.D.×0.25 mF.T และตั้งโปรแกรมในการใช้งานที่ Oven temperature 80°C คงที่ไว้ 1 นาที จากนั้นเพิ่มความร้อนเป็น 300 °C ในอัตราเพิ่มของอุณหภูมิ 20°C/นาที และคงไว้ 5 นาที ใช้ EI เป็น 70eV ที่อุณหภูมิ 230 °C โหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลเป็น Full-scan mass spectra (m/z 50–700) ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลโดยรวม และยืนยันมวลโมเลกุลของสารด้วยการเลือกมวลจำเพาะ (Select ion mass, SIM) m/z 201, 216 และ 202 สำหรับ 1-naph, m/z 201, 216, และ 202 สำหรับ 2-naph และ m/z 267 และ 280 สำหรับ phenylephrine ใช้เป็น Internal Standard (IS) เนื่องจากเป็นสารที่มีโครงสร้างที่มีหมู่ OH ที่สามารถทำปฏิกิริยา silylation ได้ เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่จะศึกษา และไม่เกิดปฏิกิริยากับส่วนประกอบอื่นๆ ในตัวอย่าง

การเตรียมสารมาตรฐานและการเตรียมตัวอย่าง

สารมาตรฐาน 1-naph, 2-naph และ IS ถูกชั่งด้วยเครื่องชั่งที่มีความละเอียดสูง และถูกละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1,000 µg/mL และจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาความเสถียรของสารและใช้เป็น stock standard ในการศึกษานี้จะนำสารมาตรฐานที่เตรียมไว้มาเตรียมเป็นสารที่จะทำการศึกษา (working standard) ตลอดการศึกษา โดยพิจารณาจากความ

เข้มข้นของ stock standard ด้วย 50% deionize water ในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่ 10,000 ng/ml สำหรับ 1-naph และ 2-naph ส่วน IS เตรียมให้มีความเข้มข้นที่ 100 ng/ml เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นการเตรียมจากนมผงที่ใช้ชงเพื่อเด็กทารกในอัตราส่วนที่เป็นคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำตัวอย่างมาเติมสารที่จะศึกษา เพื่อทำการศึกษาค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามข้อกำหนดของ US Food and Drug Administration (FDA) guidance²⁴ ประกอบด้วย การทำ calibration curve ซึ่งเป็นการเติมสารผสมลงไปในตัวอย่งนํ้านมในความเข้มข้นตั้งแต่ 10.00-500.00 ng/ml จำนวน 6 จุด ศึกษาจุดละ 3 ครั้ง เตรียมตัวอย่างโดยใช้นํ้านมปรับความเข้มข้นของ working standard ให้ได้ความเข้มข้นที่จะศึกษาทุกความเข้มข้นในปริมาตร 100 CC ด้วยขวดปรับปริมาตร volumetric flask และเก็บตัวอย่างที่เตรียมไว้ในตู้เย็น 2-8°C ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นจะนำมาเพื่อหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการ การทำการศึกษาซ้ำ (Reproducibility) เพื่อศึกษาค่าความแม่นยำ (Precision) และ ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีด้วย โดยการเตรียมตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่ 10.00 (LLOQ), 25.00, 50.00 และ 100.00 ng/ml จำนวน 3 ครั้ง และวิเคราะห์ต่อเนื่อง 3 วัน การศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาค่าการสกัดคืนกลับ (Recovery) การศึกษาค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และ ค่าต่ำสุดที่รายงานค่าได้ (The lower limit of quantitation, LLOQ) เพื่อหาความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ ส่วนการศึกษาความคงตัวระยะสั้น (Short term stability) ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมาในแต่

ละความเข้มข้นจัดแบ่ง และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 °C ก่อนศึกษาจะนำมาตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องจนตัวอย่างละลายจึงทำการศึกษาต่อไป

การสกัดและการเปลี่ยนรูปสาร

นำตัวอย่างน้ำมันที่เดิมสารที่จะศึกษามาผสมกับกรด HCl ในสัดส่วน น้ำมัน 200 µl ที่เดิม IS ความเข้มข้น 100 ng/ml ลงไปในตัวอย่าง 50 µl กับกรด 50 µl จากนั้นนำตัวอย่างอบในอุณหภูมิ 80°C นานครึ่งชั่วโมงเพื่อย่อยโปรตีนที่จับกับสารที่จะศึกษา จากนั้นนำออกมาพักให้เย็นแล้วเอาตัวอย่างมาสกัดด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction (SPE) ด้วย SPE ชนิด mixed strong anion exchange adsorbent (MAX) : SPE จะล้างด้วย Methanol 1 cc. ตามด้วย น้ำ DI 1 cc. จากนั้นใส่ตัวอย่างผ่านเข้าไปใน SPE โดยผ่านการดูดด้วยเครื่อง Manifolds เมื่อตัวอย่างผ่านส่วน SPE แล้วก็ล้างด้วย น้ำ DI 1 cc. และ 5% methanol ในน้ำ DI 1 cc. ปลอ่ยให้เครื่องดูดของเหลวที่ค้างใน SPE ออกจนแห้ง ประมาณ 5 นาที จึงชะสารที่จะศึกษาออกมาโดยใช้ 2% NH₂OH/Methanol 1 cc. ชะออกมา แล้วนำตัวอย่างไประเหยแห้งด้วยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนในน้ำอุณหภูมิ 40°C เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้วก็เอาตัวอย่างนั้นมาเดิมสารเปลี่ยนรูป (Derivative reagent) ชนิด BSTFA+ 1%MTSC 50 µl ผสมกับ ethyl acetate 50 µl นำตัวอย่างไปอบด้วยอุณหภูมิ 80°C นาน 15 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่เย็นแล้วไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป

ผลการวิจัย

ศึกษาความถูกต้องของวิธี *Selectivity และ Sensitivity*

การศึกษานี้ใช้เครื่อง GC-MS ในการแยกสารที่จะศึกษาออกจากตัวอย่างน้ำมัน โดยอาศัยคุณสมบัติของ column ในเครื่อง GC-MS ซึ่งจะสามารถแยกสารต่างๆที่มีคุณสมบัติไม่เหมือนกัน แต่สาร 1-naph กับ 2-naph เป็นสารที่มีคุณลักษณะและมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 144.17 g/mol ต่างกันตรงตำแหน่งของ hydroxyl group ดังนั้นการแยกสาร 2 ชนิดออกจากกันจึงยาก แต่การเปลี่ยนรูปของสารโดยใช้ BSTFA+ 1%TMCS ทำให้คุณสมบัติของสารดังกล่าวต่างกันเล็กน้อย แต่มีมวลโมเลกุลเท่ากันเช่นเดิม ซึ่งสามารถแยกสารออกจากกันได้ (รูปที่ 1) โดยสาร 2-naph มี peak ขึ้นที่เวลา 8.289 สาร 1-naph ขึ้นที่นาทีที่ 8.398 และสาร IS ขึ้นที่นาทีที่ 10.038 และแยกออกจากโครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำมันที่ไม่ได้เดิมสารอย่างชัดเจนทั้งสารที่ศึกษาและสาร IS การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ได้ดำเนินการตามแนวทางมาตรฐานที่กำหนดไว้ โดยมีการประเมินความจำเพาะของวิธี ผ่านการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันที่ไม่ได้เดิมสารที่จะศึกษา ลงไปในตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง และก่อนการเตรียมตัวอย่างจะเติม IS ลงไปในปริมาณที่ได้ศึกษาไว้ เกณฑ์การยอมรับระบุอย่างน้อย 5 ใน 6 ชุดตัวอย่างต้องมีค่าพื้นที่สัญญาณ (area response) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าพื้นที่สัญญาณเฉลี่ยของตัวอย่างที่มี LLOQ สำหรับเมทริกซ์นั้น ๆ การประเมินค่าความเข้มข้น LLOQ ได้ดำเนินการใน 6 ชุด

ตัวอย่างแยกกัน โดยกำหนดค่าความเข้มข้นไว้ที่ 10 ng/mL ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมทริกซ์ของนมผงไม่ก่อให้เกิดสัญญาณรบกวนต่อการวิเคราะห์ 1-naphthol, 2-naphthol เมื่อเติม IS ที่เติมลงไปนํ้านม (รูปที่ 2) ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด (LLOQ) ของวิธีการวิเคราะห์ คือ 10 ng/mL

โดยมีสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signals to noise ratio) เท่ากับ 2.53 สำหรับ 1-naphthol และ 4.05 สำหรับ 2-naphthol ค่า %CV ของ precision และ ค่า %accuracy ได้ 19.42% และ 99.60% สำหรับ 1-naph และ 15.07% และ 106.55% สำหรับ 2-naph ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ค่า calibrations standards curve ของ 1-naph และ 2-naph ที่เติมลงไปนํ้านม ความเข้มข้น 10.00-500.00 ng/ml ค่า %CV ของ precision และ % ของค่า Accuracy

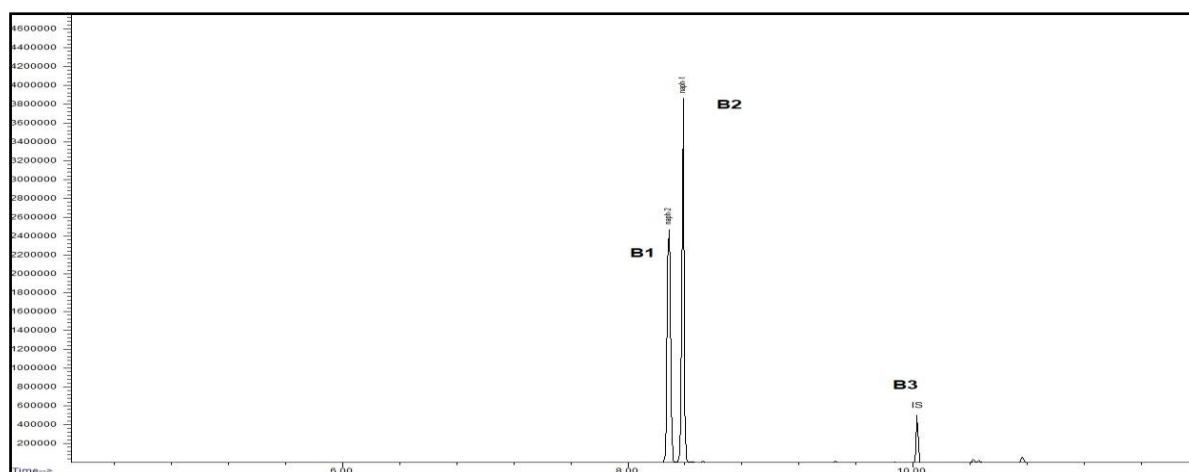
สาร	ความเข้มข้น (ng/ml)	Mean±SD (ng/ml) ^a	%Precision	%Accuracy
1-naph	10.00	9.96±1.93	19.42	99.60
	25.00	24.81±0.94	3.78	99.25
	50.00	49.35±2.74	5.56	98.71
	100.00	117.11±11.56	9.95	117.11
	250.00	246.56±4.26	1.73	98.62
	500.00	497.82±1.34	0.27	99.56
2-naph	10.00	10.66±1.61	15.07	106.55
	25.00	25.05±0.66	2.65	100.18
	50.00	49.41±2.84	5.74	98.81
	100.00	114.96±7.24	6.30	114.96
	250.00	250.13±3.18	1.27	100.05
	500.00	501.42±0.15	0.03	100.28

^aMean, n = 6 สำหรับสร้าง calibration curve, SD คือ Standard Variation

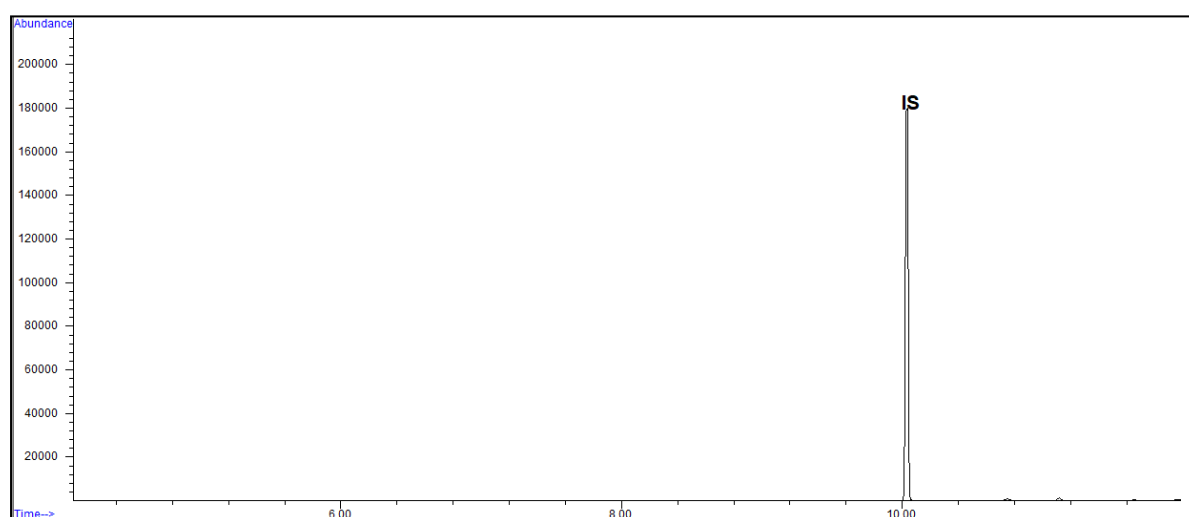
Linearity และ calibration standard curve

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไปแล้วทำการสกัดและนำมาวิเคราะห์โดยทำ standard curve ตั้งแต่ความเข้มข้นของสาร 10.00 – 500.00 ng/ml ในความเข้มข้นของสาร 6 จุดจากการศึกษาพบว่าค่า linearity ของการศึกษาอยู่ที่ $r^2 = 0.998$ สำหรับ 1-naph และ $r^2 = 0.998$ สำหรับ 2-naph ซึ่งค่าที่ได้เกิดจากการคำนวณสัดส่วน

พื้นที่ใต้กราฟของสารที่ศึกษากับสาร IS (รูปที่ 2) ซึ่งค่า r^2 ที่สูง แสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดีระหว่างความเข้มข้นของสารกับสัญญาณที่ได้จากเครื่อง GC-MS และค่า precision และ ค่า %accuracy ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า %CV ของ LOQ อยู่ในช่วง $\pm 20\%$ และทุกความเข้มข้นมี %CV $\pm 15\%$ ดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1. แสดงโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ น้ำนํที่เดิมสารที่ศึกษา B1 คือ 2-naph, B2 คือ 1-naph และ B3 คือ IS



รูปที่ 2. แสดงโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์น้ำนํที่เดิมสาร IS

Precision และ accuracy

การศึกษา precision และ accuracy จะใช้ตัวอย่างที่เดิมสารในความเข้มข้น 10.00 (LLOQ), 25.00, 50.00 และ 100.00 ng/ml นำมาศึกษา โดยจะศึกษาความถูกต้อง เทียบตรงในการวิเคราะห์ ในวันเดียวกัน (Within-run) และการวิเคราะห์ต่อเนื่อง 3 วัน (Between-run) ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นจะทำการศึกษา 6 ซ้ำ เพื่อนำมาคำนวณหา ค่า %accuracy และ %CV ของ precision ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 2

Recovery และ Short-term stability

การศึกษา %Recovery (%Re) และความคงตัวระยะสั้น เป็นการศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์ของวิธีการ ซึ่งได้จากการเดิมสารที่จะศึกษาลงไปตัวอย่างแล้วทำการทำซ้ำ 5 ซ้ำ ใน 3 ความเข้มข้น และความคงตัวระยะสั้นได้ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างใน -20 °C ระยะเวลา 1 เดือน ใน 3 ความเข้มข้น ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2. ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันในการวิเคราะห์วันเดียวกัน และระหว่างวัน

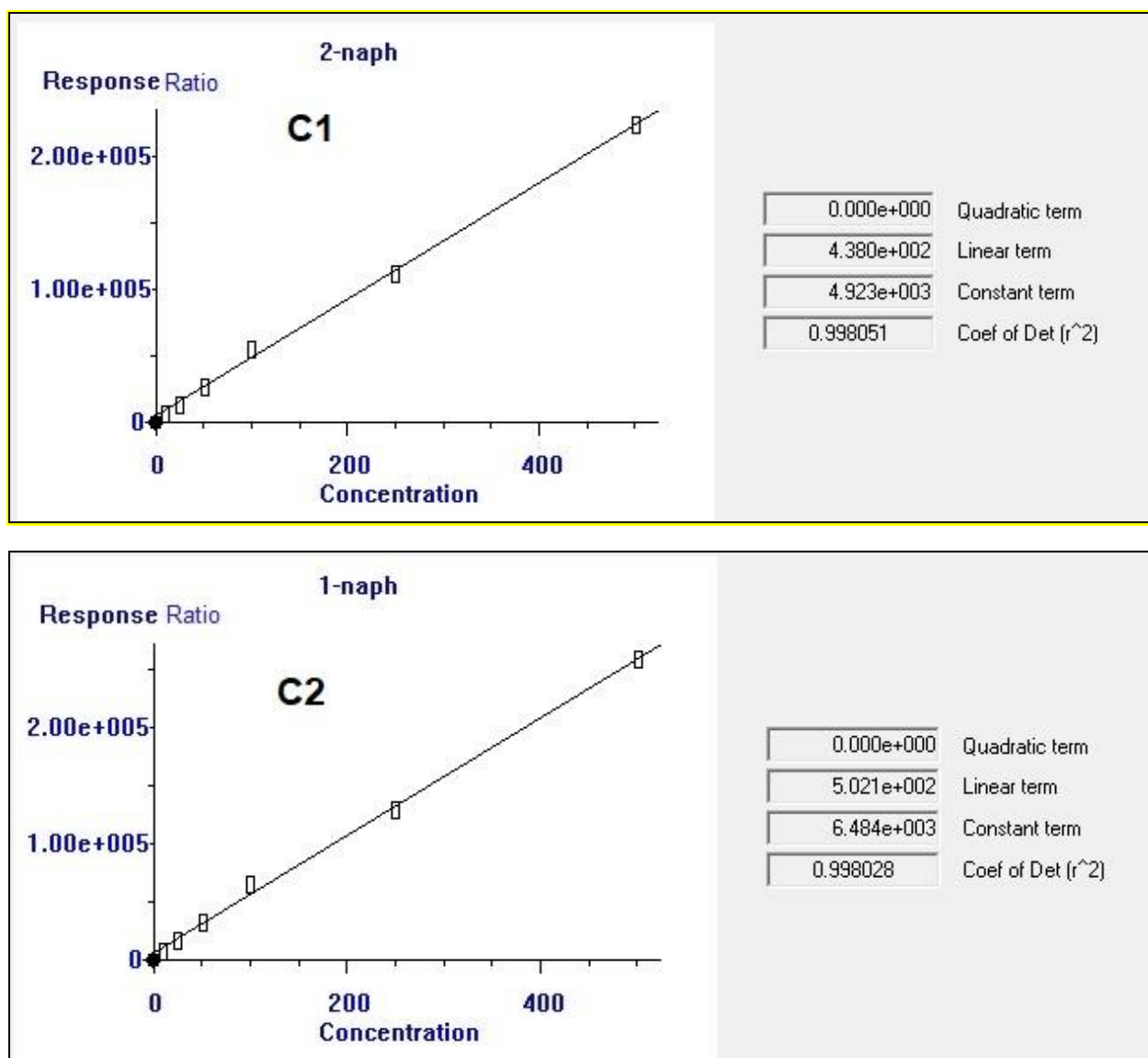
สาร	ความเข้มข้น	Mean±SD	%Accuracy		%Precision	
	(ng/ml)	(ng/ml) ^b	Within run ^c	Between run ^d	Within run ^c	Between run ^d
1-naph	10.00 (LLOQ)	10.31±0.49	103.08	102.87	4.79	11.82
	25.00	24.90±0.16	99.61	99.36	0.63	1.97
	50.00	51.54±3.79	103.08	100.09	7.35	4.94
	100.00	99.85±4.91	99.85	105.94	4.92	6.62
2-naph	10.00 (LLOQ)	9.92±0.52	99.17	103.80	5.29	15.02
	25.00	24.86±0.60	99.42	100.44	2.43	5.18
	50.00	49.94±1.03	99.88	98.86	2.07	5.10
	100.00	100.90±4.24	100.90	108.43	4.20	9.55

^b ค่าเฉลี่ย 3 วัน n=6, ^c วิเคราะห์วันเดียวกัน n=6, ^d วิเคราะห์ต่อเนื่อง 3 วัน n=18

ตารางที่ 3. แสดงค่า %Recovery และการศึกษา Short-term stability

ความเข้มข้น (ng/ml)	Recovery (n=5)		Shot-term stability (n=3)			
	Mean±SD	Re ^a (%)	Mean±SD (ng/ml)	Precision (%)	Accuracy (%)	Differences (%)
1-naph						
10.00(LLOQ)	10.14±0.84	101.44	9.57±0.24	2.53	95.73	-0.57
25.00	25.07±0.61	100.28	24.93±0.21	0.86	99.71	-0.14
50.00	49.87±2.80	99.93	49.35±3.70	7.50	98.69	-0.52
100.00	104.10±10.05	104.10	105.49±1.38	11.19	105.49	1.38
2-naph						
10.00(LLOQ)	10.50±1.05	105.00	10.06±0.77	7.70	100.60	-0.44
25.00	25.85±0.60	103.40	24.93±0.82	3.29	99.73	-0.92
50.00	49.37±3.26	98.74	47.83±3.03	6.33	95.67	-1.53
100.00	100.96±11.26	100.96	98.93±9.67	9.67	98.93	-2.03

^a Re = Recovery



รูปที่ 3. (C1) แสดงค่า standard curve ของ 2-naph, (C2) แสดงค่า standard curve ของ 1-naph คำนวณสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับ IS

วิจารณ์ผลการวิจัย

เนื่องจาก 1-naphthol และ 2-naphthol มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็กและคล้ายคลึงกัน ทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุลได้ง่ายขณะวิเคราะห์ด้วย GC-MS ส่งผลต่อความไวในการตรวจวัด เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้โครงสร้างจึงใช้สาร derivative เข้าไปจับกับโครงสร้างของสารในการศึกษาครั้งนี้ใช้ปฏิกิริยา silylation ชนิด

BSTFA+1%MSTC ที่มีหมู่ silyl (C_3H_9Si , $M = 73$ mol/L) ในการจับกับหมู่แอลกอฮอล์ (OH) ของสารที่ศึกษา ได้โครงสร้างใหม่คือ $C_{13}H_{16}OSi$ มีมวลโมเลกุล 216 mol/L ทำให้มีความเสถียรมากขึ้น และเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดี ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีค่า LOD อยู่ที่ 5 ng/ml ความถูกต้องและแม่นยำของวิธีอยู่

ในเกณฑ์ที่ยอมรับของ US-FDA สำหรับการ
พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์

ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับการ
การศึกษาหาสาร 1-naph และ 2-naph ในน้ำนม
พร้อมกันโดยใช้ GC-MS อย่างไรก็ดี มีรายงาน
วิธีการวิเคราะห์สารดังกล่าวในปัสสาวะด้วย
เทคนิค GC โดยการทำให้เป็นอนุพันธ์ซึ่งเป็น
สารประกอบที่มีขั้วน้อยลง เพื่อให้ได้การ
วิเคราะห์ดีขึ้น เช่น N- (tert-butyl dimethylsilyl) -N-
methyltri fluoroacetamide, acetic anhydride, 8,9 N,
O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, pentaflu-
orobenzyl bromide, trifluoroacetic anhydride, 1 -
chloro- 3 - iodopropane, หรือ N-methyl- N-
(trimethylsilyl) -trifluoroacetamide²⁵⁻³³ เป็นต้น แต่
สารเปลี่ยนรูปบางตัวมีความเป็นอันตรายสูง ก่อ
ฤทธิ์ระคายเคืองเยื่อตาอย่างรุนแรง เช่น
pentafluorobenzyl bromide ต้องปฏิบัติงานอย่าง
ระมัดระวังมาก เพื่อเพิ่มความปลอดภัยของโมเลกุล
และปรับปรุงความไวในการตรวจวัด จึงเลือกใช้
สาร BSTFA+1% TMCS เป็นสาร Derivatization
เนื่องจากมีหมู่ซิลิลที่สามารถจับกับหมู่ไฮดรอก -
ซิลของสารเป้าหมาย และเป็นสารที่ห้องปฏิบัติการ
มีพร้อมใช้งาน

โดยพบว่าได้ค่าความถูกต้องของการ
วิเคราะห์ตามคำแนะนำของ USFDA และเป็นไป
ตามเกณฑ์ที่กำหนด ค่า signals to noise ratio น้อย
กว่า 5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าต่ำสุดที่ศึกษาสามารถ
วิเคราะห์ได้ โดยไม่มีการรบกวนทั้งสองสารที่
ศึกษา (LLOQ) อยู่ที่ 10 ng/ml และผลการ
วิเคราะห์ยังเผยให้เห็นว่าวิธีการที่เสนอมีความ
แม่นยำเพียงพอเนื่องจากค่าเฉลี่ย $\pm(\%)$ CV ของค่า
ต่ำสุดน้อยกว่า $\pm 20\%$ และ ทุกความเข้มข้นของ

การศึกษามีค่า $\pm(\%)$ CV อยู่ที่น้อยกว่า $\pm 15\%$ ซึ่ง
การวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเชื่อมั่นที่ผ่านการ
รับรองตามคำแนะนำของ USFDA Guidance

สรุป

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีตรวจ
วิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของแนปทาลินในนม
ผง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตร
เมทรี เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์การ
ปนเปื้อนสาร 1-naph และ 2-naph ในน้ำนมแม่ที่
ให้นมบุตร รวมถึงน้ำนมที่มีการบริจาคจากแม่ผู้
บริจคน้ำนมในกับเด็กทารกที่มีความจำเป็นใน
การกินนมแม่ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมี
ความถูกต้องแม่นยำสูง มีความเที่ยงตรงสูง ตาม
เกณฑ์การยอมรับของ USFDA standard guideline
กำหนดไว้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไป
ประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสาร
ดังกล่าวในน้ำนมแม่ได้เพื่อความปลอดภัยของ
ทารก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา
คลินิก งานพิษวิทยาศิริราช และข้อมูลสำคัญจาก
ธนาคารนมแม่ศิริราช ที่สนับสนุนทำให้การศึกษา
ครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผลประโยชน์ทับซ้อน

คณะผู้วิจัยขอยืนยันว่าไม่มีผลประโยชน์
ทับซ้อนใดๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Naphthalene, 1- Methyl-naphthalene, and 2- Methyl-naphthalene. Atlanta, GA: U.S.: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2005.
2. IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2002; 82.
3. Government of Canada. Residential Indoor Air Quality Guideline for Naphthalene. Canada Gazette Part I, 2013. Available at <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p1/2013/2013-06-15/pdf/g1-14724.pdf#page=33>, accessed on Jun 15, 2024.
4. Heikkilä P, Luotamo M, Pyy L, et al. Urinary 1- naphthol and 1- pyrenol as indicators of exposure to coal tar products. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 211–17.
5. Bogen KT, Benson JM, Yost GS, et al. Naphthalene metabolism in relation to target tissue anatomy, physiology, cytotoxicity and tumorigenic mechanism of action. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 51: S27-S36.
6. Meeker JD, Barr DB, Serdar B, et al. Utility of urinary 1- naphthol and 2- naphthol levels to assess environmental carbaryl and naphthalene exposure in an epidemiology study. *J ExpoSci Environ Epidemiol* 2007; 17: 314–20.
7. Athanasiou M, Tsantali C, Trachana M, et al. Hemolytic anemia in a female newborn infant whose mother inhaled naphthalene before delivery. *J Pediatr* 1997; 130: 680–81.
8. Molloy EJ, Doctor BA, Reed MD, et al. Perinatal toxicity of domestic naphthalene exposure. *J of Perinatol* 2004; 24: 792–93.
9. Schafer WB. Acute hemolytic anemia related to naphthalene: Report of a case in a newborn infant. *Pediatrics*, 1951: 7172-4.
10. Yoshida T, Yoshida J. Simultaneous analytical method for urinary metabolites of organophosphorus compounds and moth repellents in general population. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; 880(1): 66-73.
11. Hardt J. Naphthalene metabolites 1- naphthol and 2- naphthol, *Biomonitoring Methods*, 2010. Available at <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi9015e0012a>, accessed on Jan 18, 2020.
12. Mattarozzi M, Musci M, Careri M, et al. A novel headspace solid-phase microextraction method using in situ derivatization and a diethoxydiphenylsilane fibre for the gas chromatography- mass spectrometry determination of urinary hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Chromatogr A* 2009; 1216(30): 5634-39.
13. Campo L, Rossella F, Fustinoni S. Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 875(2): 531-40.
14. Yang M, Koga M, Katoh T, et al. A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; 36(1): 99-108.
15. Schmidt L, Müller J, Göen T. Simultaneous monitoring of seven phenolic metabolites of endocrine disrupting compounds (EDC) in human urine using gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(6): 2019-29.
16. Petropoulou SSE, Gikas E, Tsarbopoulos A, et al. Gas chromatographic- tandem mass spectrometric method for the quantitation of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in applicators' urine. *J Chromatogr A* 2006; 1108(1): 99-110.
17. Bravo R, Caltabiano LM, Fernandez C, et al. Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography- tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 820(2): 229-36.
18. Li Z, Romanoff LC, Trinidad DA, et al. Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid- liquid extraction and gas chromatography/ isotope dilution high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78(16): 5744-51.

19. Sams C. Urinary naphthol as a biomarker of exposure: results from an oral exposure to carbaryl and workers occupationally exposed to naphthalene. *Toxics* 2017; 5(1): 3.
20. Preuss R, Angerer J. Simultaneous determination of 1- and 2-naphthol in human urine using on-line clean-up column-switching liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 801(2): 307-16.
21. Onyemauwa F, Rappaport SM, Sobus JR, et al. Using liquid chromatography- tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(11-12): 1117-25.
22. Çok I, Mazmanci B, Mazmanci MA, et al. Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity mediterranean city Mersin, Turkey. *Environ Int* 2012; 40: 63-69.
23. Zanieri L, Galvan P, Checchini L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere* 2007; 67: 1265-74.
24. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018. Available at <https://www.fda.gov/files/dr/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, accessed on Jan 18, 2020.
25. Yoshida T, Yoshida J. Simultaneous analytical method for urinary metabolites of organophosphorus compounds and moth repellents in general population. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; 880(1): 66-73.
26. Hardt J. Naphthalene metabolites 1-naphthol and 2-naphthol. *Biomonitoring Methods*, 2012. Available at <https://doi.org/10.1002/3527600418.bi9015e0012a>, accessed on Jan 18, 2020.
27. Mattarozzi M, Musci M, Careri M, et al. A novel headspace solid-phase microextraction method using in situ derivatization and a diethoxydiphenylsilane fibre for the gas chromatography- mass spectrometry determination of urinary hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Chromatogr A* 2009; 1216(30): 5634-39.
28. Campo L, Rossella F, Fustinoni S. Development of a gas chromatography/ mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 875(2): 531-40.
29. Yang M, Koga M, Katoh T, et al. A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; 36(1): 99-108.
30. Schmidt L, Müller J, Göen T. Simultaneous monitoring of seven phenolic metabolites of endocrine disrupting compounds (EDC) in human urine using gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(6): 2019-29.
31. Petropoulou SSE, Gikas E, Tsarbopoulos A, et al. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of carbonyl-furan, carbaryl and their main metabolites in applicators' urine. *J Chromatogr A* 2006; 1108(1): 99-110.
32. Bravo R, Caltabiano LM, Fernandez C, et al. Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography- tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 820(2): 229-36.
33. Li Z, Romanoff LC, Trinidad DA, et al. Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid- liquid extraction and gas chromatography/ isotope dilution high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78(16): 5744-51.