บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเรื่อง การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในพริกป่นที่จำหน่ายในตลาดสดเขตเทศบาลนครเชียงใหม่ ผู้ศึกษาได้ศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลการศึกษา ซึ่งครอบคลุมหัวข้อดังต่อไปนี้

1. อะฟลาทอกซิน
    1.1 เชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน
    1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา
    1.3 การปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตร
    1.4 ชนิด และสมบัติของอะฟลาทอกซิน
    1.5 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน
    1.6 กฎหมายของประเทศไทยที่เกี่ยวกับอะฟลาทอกซิน
    1.7 วิธีการตรวจหาอะฟลาทอกซิน
2. หลักการของชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit)
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อะฟลาทอกซิน

1.1 เชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 ในประเทศอังกฤษ โดยพบว่าไก่งวง ลูกเป็ด และสัตว์เล็ก ตายเป็นจำนวนมาก เมื่อผ่าซาก พบว่ามีความผิดปกติที่ตับ ไต และท่อน้ำดี โดยมีอาการตกเลือด และบวมพอง เรียกโรคนี้ว่า Turkey X-disease (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) เกิดจากสารพิษชื่อ อะฟลาทอกซิน จัดอยู่ในกลุ่มไมโคทอกซิน ซึ่งเป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา ชื่อภาษาอังกฤษ aflatoxin มาจากชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อราดังกล่าว นั่นคือ “A” มาจากคำว่า Aspergillus “fla” มาจากคำว่า flavas นำมารวมกับคำว่า toxin กลายเป็น aflatoxin (อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2554) เชื้อราที่มีการค้นพบว่าสามารถสร้างอะฟลาทอกซินมี 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Aspergillus กลุ่ม Penicillium และกลุ่ม Rhizopus (ตาราง 2.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.1 เชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน

เชื้อรา	ผู้ค้นพบ	ชนิดอะฟลาทอกซิน			
		B1	**B2**	**G1**	**G2**
กลุ่ม Aspergillus					
A. flavus	Sageant *et al*. (1961)	/	/	/	/
A. flavus var.*columnaris*	Van Walbeck (1968)		/		
A. oryzae	Basappa *et al*. (1967)	/	/		
A. parasiticus	Codner *et al*. (1966)	/	/	/	/
A. parasiticus var. *globosus*	Murakam *et al*. (1966)	/	/	/	/
A. niger	Kulik and Holaday (1967)	/			
A. wentil	Kulik and Holaday (1967)	/			
A. ruber	Kulik and Holaday (1967)	/			
A. ostianus	Scott *et al*. (1967)	/			
A. ochraceus	Van Walbeck (1968)	/			
กลุ่ม Penicillium					
P. puberulum	Hodges *et al*. (1964)	/			
P. variable	Kulik and Holaday (1967)	/			
P. frequentans	Kulik and Holaday (1967)	/			
P. critinum	Kulik and Holaday (1967)	/			
กลุ่ม Rhizopus	Van Walbeck (1968)		/		/

ที่มา : ดัดแปลงจาก Diener and Davis (1969)

1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

การเจริญเติบโตของเชื้อราขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย (เบญจมาส บุญศาสตร์, 2549) ดังนี้

ก) อุณหภูมิ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการสร้างสารพิษ ของเชื้อราซึ่งเชื้อราเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างมาก คือ 0 – 60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เจริญได้ดีอยู่ในช่วง 14 – 32 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข) เชื้อราจะเจริญได้ดี ในบริเวณที่มีความชื้นสูง คือมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศร้อยละ 75 ขึ้นไป สำหรับ *Aspergillus flavus* เจริญได้ดีในบริเวณที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 – 90

ค) ปริมาณออกซิเจนก็เป็นปัจจัยสำคัญ เชื้อรา *Aspergillus flavus* เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน

ง) สารอาหารจากเมล็ดพืชที่แตกหักหรือผ่านการบดแล้ว เป็นอาหารชั้นดีให้กับเชื้อรา

จ) ความเป็นกรดด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดหรือเมล็ดพืชที่มีไขมันซึ่งมีความเป็นกรดสูง จะมีเชื้อราเข้ามาทำลาย และสร้างสารพิษ

1.3 การปนเปื้อนเชื้อราในผลิตผลเกษตร

การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรสามารถเกิดการปนเปื้อนได้ทุกขั้นตอน (เยาวมาลย์ ค้าเจริญ เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และสาโรช ค้าเจริญ, 2543)

การปนเปื้อนเชื้อราในเมล็ดพืชตั้งแต่ก่อนปลูก และเกิดเพิ่มขึ้นในระหว่างการปลูก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้คือ กลุ่มแรกคือเชื้อราที่เกิดขึ้นในระหว่างการปลูก และเก็บเกี่ยว (field fungi) เชื้อราพวกนี้เกิดขึ้นในระหว่างที่เมล็ดอยู่บนต้น ซึ่งมีความชื้นประมาณร้อยละ 22 – 25 เมื่อเมล็ดพืชร่วงหรือแตกจากการทำลาย เมื่อมีความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม เชื้อราจะฟุ้งกระจายในอากาศ และขยายการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว กลุ่มที่สอง เชื้อราที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บ (storage fungi) การปนเปื้อนในกรณีนี้ส่วนใหญ่มักเป็นผลต่อเนื่องมาจากในระหว่างการปลูกและเก็บเกี่ยว เพราะการปนเปื้อนจากช่วงแรกจะเป็นเชื้อตั้งต้นให้มีการขยายจำนวนของเชื้อราให้ปนเปื้อนไปยังเมล็ดอื่นได้ เชื้อราพวกนี้ต้องการความชื้นประมาณร้อยละ 13 – 18 และเชื้อรากลุ่มที่สาม เกิดขึ้นในขณะที่ผลิตผลเกษตรเน่าเปื่อย (advance decay fungi) เชื้อราพวกนี้เกิดขึ้นอาหารที่เน่าเสียซึ่งต้องการความชื้นร้อยละ 22 – 25

การปนเปื้อนระหว่างขนส่ง เป็นการปนเปื้อนจากผลิตผลเกษตรด้วยกัน ทำให้เชื้อราเพิ่มจำนวนได้

การปนเปื้อนในระหว่างการผลิตหรือการบรรจุหีบห่อ ผลิตผลเกษตรที่ผ่านการอบแห้งไม่ดีพอหรืออาหารที่ติดอยู่ในเครื่องมือการผลิต ถ้าไม่เปิดทำงานอย่างต่อเนื่องมีโอกาสที่เชื้อราจะเจริญได้สูง นอกจากนี้ภาชนะบรรจุไม่ดีหรือฉีกขาด ทำให้เชื้อราเข้าไปปนเปื้อนหรือเพิ่มจำนวนได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรมวิชาการเกษตรได้แนะนำการผลิตพริกป่นที่ป้องกันการปนเปื้อนเชื้อรา โดยการนำพริกแห้ง และพริกป่นไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมงทันที ช่วยลดการเกิดอะฟลาทอกซินดีกว่าการตากแห้งร้อยละ 22

1.4 ชนิด และสมบัติของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็นสองชนิดคือ อะฟลาทอกซินชนิดบี (B) เป็นสารพวก bis-furanon-isocumarin และชนิดที่สองคือ อะฟลาทอกซินชนิดจี (G) มีโครงสร้าง isocumarin (รูป 2.1 และรูป 2.2)

อะฟลาทอกซินที่พบมากตามธรรมชาติจำแนกออกได้เป็น 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (B1) บีสอง (B2) จีหนึ่ง (G1) และ จีสอง (G2) สำหรับอะฟลาทอกซินชนิดเอ็มหนึ่ง (M1) และเอ็มสอง (M2) ซึ่งเป็นเมทาบอไลท์ของอะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่ง (B1) และบีสอง (B2) นั้นมักพบในน้ำนม และสัตว์ที่บริโภคอาหารที่มีอะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่ง (B1) และบีสอง (B2) (อนงค์ บัณฑวิหค, 2546)

อะฟลาทอกซินละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซิน เมธานอล เอธานอล และอะซิโตน ละลายได้บ้างในน้ำ และน้ำเกลือ ไม่ละลายในตัวทำละลายบางชนิด เช่น เฮกเซน และ อีเทอร์ (วราภา มหากาญจนกุล, 2553)

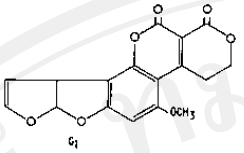
อะฟลาทอกซินสามารถเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ช่วงความยาวคลื่น 256 – 365 นาโนเมตร อะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่ง (B1) และบีสอง (B2) เรืองแสงสีน้ำเงิน อะฟลาทอกซินจีหนึ่ง (G1) และ จีสอง (G2) เรืองแสงสีเขียว (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

อะฟลาทอกซินสามารถทนความร้อนได้ถึง 260 องซาเซลเซียส ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันไอน้ำไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ แต่ถูกทำลายได้โดยไฮโปคลอไรด์ แอมโมเนีย ด่าง และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะฟลาทอกซินแต่ละชนิดมีสูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล และจุดหลอมเหลวแตกต่างกัน (สถาบันอาหาร, 2554) (ตาราง 2.2)

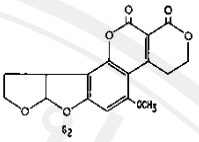
รูป 2.1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี (B)

ที่มา: http://www.mycotoxins.info/myco_info/science_moa.html

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



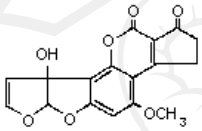
G1



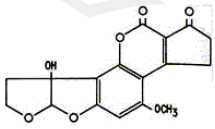
G2

รูป 2.2 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดจี (G)

ที่มา: http://www.mycotoxins.info/myco_info/science_moa.html



M1



M2

รูป 2.3 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดเอ็ม (M)

ที่มา: http://www.mycotoxins.info/myco_info/science_moa.html

ตาราง 2.2 สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล และจุดหลอมเหลวของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด

ชนิดของอะฟลาทอกซิน	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (°C)
บีหนึ่ง (B1)	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268 - 269
บีสอง (B2)	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286 - 289
จีหนึ่ง (G1)	$C_{17}H_{12}O_7$	328	244 - 246
จีสอง (G2)	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237 - 240
เอ็มหนึ่ง (M1)	$C_{17}H_{12}O_7$	328	299
เอ็มสอง (M2)	$C_{17}H_{14}O_7$	330	293

ที่มา: นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์ (2553)

1.5 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน

องค์การอนามัยโลกจัดให้อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ร้ายแรงมากที่สุดชนิดหนึ่ง (potent carcinogen) เนื่องจากปริมาณของอะฟลาทอกซิน 1 ไมโครกรัมสามารถทำให้เกิดการกลายพันธ์ในแบคทีเรีย และทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้หากได้รับอย่างต่อเนื่อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรคที่ตรวจพบในคนอันเนื่องมาจากอะฟลาทอกซิน ได้แก่ โรคมะเร็งตับ โรคตับอักเสบ โรคตับแข็ง โรคสมองอักเสบนอกจากนี้ยังพบความผิดปกติที่อวัยวะอื่นร่วมด้วย เช่น เซลล์ปอดและเซลล์หลอดลมผิดปกติ อาการพิษเกิดจากการสะสมพิษเป็นเวลานาน ความเป็นพิษแสดงออกมากน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ภาวะของการบริโภคอาหาร อายุ เพศ ฮอร์โมน การทำงานของเอนไซม์ต่างๆในตับ และจำนวนพิษที่เข้าสู่ร่างกาย (สถาบันอาหาร, 2554)

อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (B1) เป็นชนิดที่มีความเป็นพิษในสัตว์รุนแรงมากที่สุด รองลงมาคือ ชนิดจีหนึ่ง (G1) บีสอง (B2) และจีสอง (G2) ตามลำดับ (อนงค์ บัณฑวิหค, 2546) เมื่ออะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายแล้ว บางส่วนจะถูกกำจัดออกจากร่างกาย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเลย แต่ส่วนใหญ่แล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเมทาบอไลท์ชนิดอื่นๆ เช่น อะฟลาทอกซินเอ็มหนึ่ง (M1) สำหรับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะเกิดมากที่สุดในตับ (ชุติภัสร์ เรืองวุฒิ, 2549) สัตว์แต่ละชนิดจะแสดงอาการ และมีความไวต่อการเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน ต่างกัน เป็ด ไก่ และไก่งวง มีความไวต่อสารอะฟลาทอกซินมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ สุกร หนู และคน ส่วนสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความต้านทานดีกว่าสัตว์อื่น ยกเว้นลูกสัตว์จะมีความไวต่ออะฟลาทอกซิน มากกว่าสัตว์ที่โตเต็มที่ (อนงค์ บัณฑวิหค, 2546) งานวิจัยของ John *et al* (1987) ทดลองให้หนูได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่ง ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกันหลายเดือน พบว่าเดือนที่ 19 หนู 19 ตัวใน 20 ตัวเป็นมะเร็งตับ และให้หนูได้รับอะฟลาทอกซินชนิดเอ็มหนึ่ง ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกันหลายเดือน พบว่า หนู 3 ตัวใน 20 ตัวเป็นมะเร็งลำไส้เล็ก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Robens and Richard (1992) ซึ่งรายงานว่าอะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งในหนู และปลาเทราท์ และเป็นสาเหตุของมะเร็งตับในคน

พิษของอะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ 2 แบบ คือ พิษแบบเฉียบพลัน (acute aflatoxicosis) มักเกิดในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ อาการที่เกิดคล้ายกับอาการของเด็กที่เป็นโรค Rye's syndrome คือ มีอาการชักและหมดสติได้ เนื่องจากมี ความผิดปกติของตับ และสมอง น้ำตาล ในเลือดลดต่ำลง สมองบวม มีการคั่งของไขมัน เช่น ตับ ไต หัวใจ และปอด บางครั้งอาจตรวจพบอะฟลาทอกซินในตับของผู้ป่วยด้วย ในผู้ใหญ่หากได้รับอะฟลาทอกซินในปริมาณมาก จะเกิดพยาธิสภาพที่ตับ และอวัยวะภายในอย่างเฉียบพลัน มีการตกเลือดภายใน เนื้อตายที่ตับ บวมน้ำ หายใจลำบาก เข้าสู่สภาวะหมดสติ หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงทีจะเสียชีวิตในที่สุด (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2555) การเกิดพิษแบบเรื้อรัง (chronic aflatoxicosis) เซลล์ตับจะเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง ในคนมีอาการคล้ายโรคตับอักเสบเรื้อรัง ระบบภูมิคุ้นกันต่ำลง เจ็บป่วยได้ง่าย โปรตีนในเลือดต่ำ หลังจากนั้นจะพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งตับในที่สุด (วิเชียร ยงมานิตชัย และวราภา มหากาญจนกุล, 2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6 กฎหมายของประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับอะฟลาทอกซิน

หลายประเทศมีการกำหนดปริมาณของอะฟลาทอกซินที่ยอมให้ได้มีในอาหาร เนื่องจากอะฟลาทอกซินเป็นสารที่เข้าสู่ร่างกายแล้วก่อให้เกิดพิษรุนแรงมาก แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดอันตรายได้ จึงกำหนดหน่วยวัดเป็น ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือส่วนต่อพันล้านส่วน สำหรับประเทศไทยให้ถือตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4 (2) กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินในอาหารได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 20 ส่วนต่อพันล้านส่วน ซึ่งปริมาณอะฟลาทอกซินที่กำหนดนี้เป็นปริมาณของอะฟลาทอกซินทุกชนิดรวมกัน

1.7 วิธีการตรวจหาอะฟลาทอกซิน

การตรวจหาอะฟลาทอกซินสามารถตรวจหาได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้มีอยู่ 3 วิธี (ประพฤกษ์ และปกรณ์, 2549) ดังนี้

ก) วิธี Enzyme – Linkage Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่มีความจำเพาะกัน หากต้องการตรวจหาแอนติเจน จะต้องนำแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาเคลือบที่ solid phase หรือ หลุมทดสอบ ซึ่งนิยมใช้เป็นพลาสติก แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติเจนตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยการใส่ substrate เพื่อไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เมื่อมีการย่อยเอนไซม์จะทำให้มีการเปลี่ยนสี จึงสามารถอ่านผลด้วยสายตา หรือวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ดัดแปลงให้เหมาะสมกับการอ่านค่าปริมาณแอนติเจนจากหลอดทดลอง วิธีการนี้เหมาะสำหรับการทดสอบแบบคัดกรอง (screening method) ก่อนจะใช้วิธีทดสอบแบบยืนยันผล (confirmatory method) วิธีนี้มีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ต่ำที่สุด แต่ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบบยืนยันผล

ข) วิธี High Performance Liquid Chromatograhy (HPLC) เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง กระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารประกอบจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับการละลายของสารประกอบกับเฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่ สารประกอบที่ละลายได้ดีในเฟสเคลื่อนที่หรือละลายได้ไม่ดีในเฟสอยู่กับที่จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารประกอบที่ละลายได้ไม่ดีในเฟสเคลื่อนที่หรือละลายได้ดีในเฟสอยู่กับที่ จะแยกออกมาทีหลัง สารประกอบที่แยกออกมาได้จะถูกตรวจวัดสัญญาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งออกมาในรูปกราฟ เรียกว่า โครมาโตแกรม วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความละเอียดสูง มีความถูกต้องแม่นยำ แต่มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง

ค) วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง กระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสอยู่กับที่มีลักษณะเป็นของแข็ง ฉาบเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นแก้วหรือพลาสติก เทคนิคนี้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบยืนยันผล อาศัยวิธีการแยกสารบนแผ่นบางของตัวดูดซับ แล้ววัดค่าความเข้มข้นด้วยการดูระดับการเรืองแสงใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง และแม่นยำสูง และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์สูงกว่าเทคนิค ELISA แต่ต่ำกว่าวิธี HPLC

หลักการของชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit)

แอนติเจน คือสิ่งแปลกปลอม หรือสารที่ไม่มีอยู่ในร่างกาย สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในน้ำเหลืองหรือสารคัดหลั่ง โดยอาศัยการรวมตัวระหว่าง ตำแหน่งย่อยเล็กๆ (antigen determinant) ของแอนติเจน กับตำแหน่งย่อยเล็กๆของแอนติบอดี (combining site) ที่มีความจำเพาะต่อกัน โดยส่วนประกอบทั้งสองนี้จะต้องเข้ากันได้อย่างเหมาะเจาะ จึงจะสามารถทำปฏิกิริยากันได้ดี

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ เช่นในทางการแพทย์ เพื่อตรวจหาสิ่งซึ่งอาจเป็นจุลชีพที่เป็นตัวก่อโรคติดเชื้อต่างๆ หรือหาระดับสารต่างๆในร่างกาย เป็นต้น การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยหลักของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีสามารถแบ่งตามลักษณะของปฏิกิริยาได้ 5 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ คือ การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการจับกลุ่ม การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาซึ่งต้องอาศัยคอมพลีเมนท์ร่วมด้วย และการทดสอบที่ต้องอาศัยแอนติเจนหรือแอนติบอดีติดฉลากด้วยสารต่างๆ (สุวิน ว่องวัจนะ, 2555)

ชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit) เป็นชุดตรวจสอบของกลุ่มงานวิจัย และพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักวิจัย และพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร เป็นชุดตรวจสอบที่อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีเทคนิค Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) แบบแข่งขันตรง โดยอะฟลาทอกซินซึ่งก็คือแอนติเจน จะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างที่บดละเอียดด้วยสารละลายเมธานอล อะฟลาทอกซินในสารสกัดที่กรองได้ ซึ่งเรียกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อะฟลาทอกซินอิสระ(free toxin) จะถูกนำไปแข่งกับอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) ในการที่จะไปเกาะจับกับแอนติบอดี ที่ถูกเคลือบไว้ที่ก้นหลุมทดสอบ หลังจากบ่มไว้ประมาณ 30 นาที ส่วนของอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก ที่เกาะจับกับแอนติบอดีในหลุมทดสอบสามารถประเมินได้โดยการเติมซับสเตรท (substrate) ที่จะทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรท สามารถอ่านได้ด้วยสายตาเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบของอะฟลาทอกซินมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ หลุมทดสอบใดมีปริมาณอะฟลาทอกซินอิสระน้อยจะเกิดสีเข้ม ถ้ามีสารพิษอิสระมากจะเกิดสีจางตามลำดับ (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาครั้งนี้ แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งคือการตรวจหาอะฟลาทอกซินใน พริกสด พริกแห้ง พริกป่น และธัญพืชอื่นๆ มีการศึกษาทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ ส่วนที่สองคือผลกระทบของอะฟลาทอกซินต่อสุขภาพของคน และสัตว์

งานวิจัยส่วนแรก สุรจิต ธรรมาเจริญราช (2545) ศึกษาเรื่อง อะฟลาทอกซินในพริกแห้งป่นในตลาดเทศบาลเมือง จังหวัดลำปาง เก็บตัวอย่างพริกป่น 3 ลักษณะ คือ พริกป่นแบบตักแบ่งขาย พริกป่นแบบมัดปากถุงด้วยยางรัด และพริกป่นแบบเชื่อมปิดสนิทด้วยความร้อน จากตลาดเทศบาลลำปาง ในเดือนมีนาคม – เมษายน พ.ศ. 2545 แล้วนำตัวอย่างพริกป่นมาตรวจหาอะฟลาทอกซินด้วยชุดทดสอบ Veratox ® ที่ใช้หลักการ ELISA พบว่าพริกป่นทั้ง 3 ลักษณะมีปริมาณอะฟลาทอกซินไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

นอกจากนี้ รัตตา สุทธยาคม และ อมรา ชินภูติ (2550) ศึกษาเรื่อง การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง และพริกป่น ทำการศึกษา 4 ส่วน ส่วนที่หนึ่งทำการตรวจหาเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง พบว่าร้อยละการพบเชื้อ *Aspergillus flavus* ในพริกแห้งมีมากกว่าพริกป่น ส่วนที่สองทดสอบความร้อนต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* พบว่าการอบพริกแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสทำให้การงอกของสปอร์ลดลง ส่วนที่สามทำการเก็บรักษาพริกแห้งในถุงpolyethelene และถุง low density polyethelene ไว้นาน 4 เดือน แล้วนำมาตรวจหาอะฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่เก็บรักษาในถุงทั้ง 2 ชนิดลดลงเล็กน้อย ส่วนที่สี่ศึกษาผลของการทำพริกให้แห้งต่อการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน โดยนำพริกสดที่พบว่ามี *Aspergillus flavus* มาศึกษาด้วยการแบ่งพริกเป็นเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกนำพริกไปตากแดด กลุ่มที่สองนำพริกไปอบ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วตรวจหาอะฟลาทอกทอกซิน 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ครั้งที่หนึ่งหลังการทำแห้ง ครั้งที่สองหลังเก็บรักษาไว้นาน 2 เดือน พบว่าการอบส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของอะฟลาทอกซินน้อยกว่าการตากแดด

การตรวจหาอะฟลาทอกซินในพริกสด พริกแห้ง พริกป่น และธัญพืชอื่นๆ ยังมีการศึกษาในต่างประเทศ โดย Reddy *et al* (2001) ศึกษาเรื่องการตรวจหาอะฟลาทอกซินบีหนึ่งที่ปนเปื้อนในพริกด้วยเทคนิค ELISA ศึกษาในตัวอย่างพริกสด และพริกป่น ทำการเก็บตัวอย่างพริกสด 3 เกรด เกรด 1 มีคุณภาพดีที่สุด เกรด 2 มีคุณภาพ ปานกลาง และเกรด 3 คุณภาพด้อยที่สุด และพริกป่นที่จำหน่ายในประเทศอินเดีย นำตัวอย่างพริกป่นมาตรวจหาอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC พบว่า พริกสดเกรด 1 มีปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนน้อยที่สุด และพริกสดเกรด 3 มีปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนมากที่สุด สำหรับตัวอย่างพริกป่นพบว่ามีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินมากกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด การตรวจหาอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค ELISA ให้ผลการศึกษาที่เชื่อถือได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค HPLC

หลังจากนั้น ยังมีการศึกษาอะฟลาทอกซินในพริกสด และพริกป่น Shazad *et al* (2010) ได้ศึกษาเรื่องอะฟลาทอกซินในพริกที่จำหน่ายในเมืองปันจาบ ประเทศอินเดีย โดยเก็บตัวอย่างพริกสด และพริกป่นมาตรวจหาอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพริกป่นมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินมากกว่าพริกสด และปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินของพริกทั้ง 2 กลุ่มมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ในปีเดียวกัน Iqbal *et al* (2010) ได้ศึกษาเรื่องการประเมินการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินของพริก ในสภาวะการเก็บต่างๆ ทำการศึกษาโดยการปลูกพริกในถุงพลาสติก เมื่อผลพริกสุก เก็บพริกให้ติดก้าน แล้วนำไปตากแห้ง แบ่งพริกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งนำไปตรวจหาอะฟลาทอกซินทันที อีกกลุ่มหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 20 – 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 55 – 75 เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด คือ พลาสติกชนิด low density polyethylene และถุงกระสอบ นำมาตรวจหาอะฟลาทอกซินทุกๆ 50 วัน นาน 5 เดือน ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพริกที่เก็บรักษาไว้ 100 วันที่เก็บในพลาสติกชนิด low density polyethylene ไม่พบอะฟลาทอกซิน

นอกจากการตรวจอะฟลาทอกซินในพริกแล้ว ยังมีการศึกษาอะฟลาทอกซินในธัญพืชอื่นๆ ด้วย Guatam *et al* (2008) ศึกษาเรื่องการประเมินระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในพริก ข้าวโพด และถั่วจากกาฏมัณฑุ เก็บตัวอย่างในเดือน เมษายน ปี ค.ศ.2008 – มกราคม ปี ค.ศ.2009 แล้วนำมาตรวจหาอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค TLC พบว่าพริกมีอะฟลาทอกซินเฉลี่ยน้อยที่สุด และอะฟลาทอกซินเฉลี่ยของตัวอย่างทุกชนิดมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ธัญพืชอื่นๆก็มีการศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินด้วยเช่นกัน Kasa *et al*. (2011) ได้ศึกษาเรื่องการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* spp. และอะฟลาทอกซินในอาหาร ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถั่ว เมล็ดพืชที่ให้น้ำมัน และเครื่องเทศ จากตลาดสด เมืองปีนัง ประเทศมาเลเซีย แล้วนำมาตรวจหาเชื้อรา *Aspergillus* spp. พบเชื้อรา *Aspergillus flavus* มากที่สุด และตรวจหาอะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่งในตัวอย่าง ด้วยเทคนิค ELISA พบว่าอาหารกลุ่มที่ตรวจพบปริมาณอะฟลาทอกซินมากที่สุดคือผลิตภัณฑ์จากถั่ว แต่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กฎหมายที่ประเทศมาเลเซียกำหนด (35 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนที่สองศึกษาผลกระทบของอะฟลาทอกซินต่อสุขภาพของคน และสัตว์ John *et al* (1987) ทดลองให้หนูได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่ง ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกันหลายเดือน พบว่าเดือนที่ 19 ส่วนใหญ่เป็นมะเร็งตับ และให้หนูได้รับอะฟลาทอกซินชนิดเอ็มหนึ่ง ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกันหลายเดือน พบว่า หนูส่วนน้อยเป็นมะเร็งลำไส้เล็ก

หลังจากนั้น Robens and Richard (1992) ได้ศึกษาเรื่องผลกระทบของอะฟลาทอกซินต่อสุขภาพของคนและสัตว์ พบว่า อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อตับ เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายจะทำให้พยาธิสภาพเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะในตับ และเป็นสารก่อมะเร็ง อาการของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซินจะแตกต่างกันไปตาม อายุ สายพันธุ์ เพศ ภาวะโภชนาการ และความเครียด พิษของอะฟลาทอกซินในคนมีผลทั้งแบบเฉียบพลัน และเรื้อรัง และเป็นสารก่อมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งตับเช่นเดียวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved