# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ถั่วลิสง

ถั่วลิสงเป็นพืชตระกูลถั่วที่ใช้เป็นอาหารและจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในอุตสาหกรรมของประเทศไทยและของโลก มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ ได้แก่ บริเวณ Morto Gasso ประเทศบราซิล, แถบเทือกเขา Andes ประเทศโบลิเวีย, แถบลุ่มน้ำอเมซอน (Amazon) และตอนใต้ของประเทศอุรุกวัย (Uruguay) ถั่วลิสงอยู่ในวงศ์ *Arachis* ซึ่งมีอยู่ 30-40 สปีชีส์ และกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณแหล่งกำเนิดดังกล่าว ถั่วลิสงที่ปลูกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogaea* โดยคำว่า *Arachis* ในภาษากรีกหมายถึง legume และ *hypogaea* หมายถึง ใต้ดิน ดังนั้นในภาษาไทยจึงเรียกเป็นถั่วลิสง ถั่วดิน หรือถั่วใต้ดิน (ธีระ, 2545) สำหรับพันธุ์ของถั่วลิสงที่นิยมปลูกในประเทศไทยคือ พันธุ์ไทนาน 9 โดยมีการปลูกมากกว่า 80% ของพื้นที่การเพาะปลูกถั่วลิสงทั่วประเทศ (วิชัยและเพ็ญขวัญ, 2540)

ถั่วลิสงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆ และเส้นใยอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของถั่วลิสง

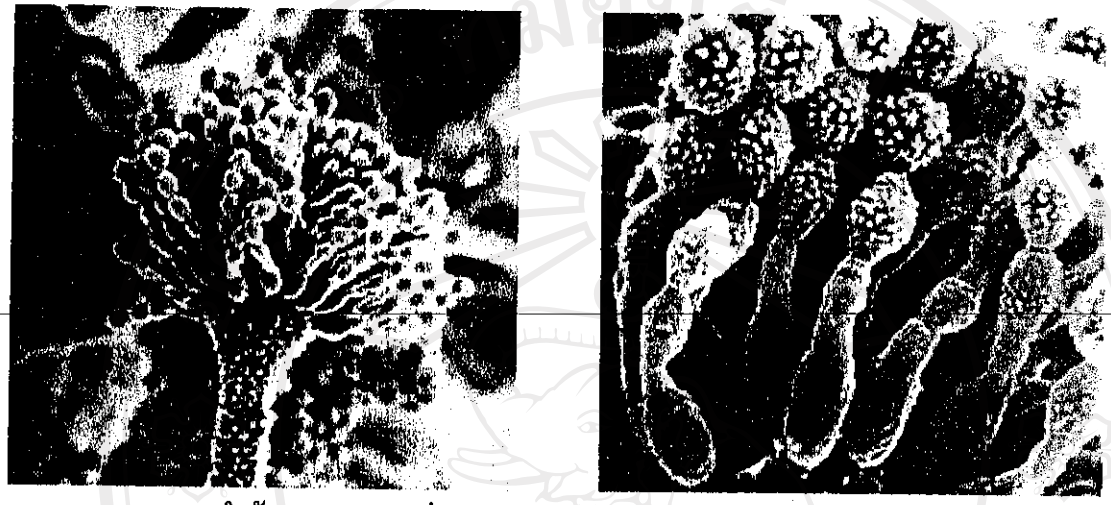
| ส่วนประกอบทางเคมี | ปริมาณ |
|---|---|
| โปรตีน (%) | 26 |
| คาร์โบไฮเดรต (%) | 23 |
| ไขมัน (%) | 45-50 |
| แคลเซียม (มิลลิกรัม) | 52 |
| เหล็ก (มิลลิกรัม) | 1.9 |
| เส้นใยอาหาร (%) | 1.9-3.0 |
| ถั่วลิสง 100 กรัมให้พลังงาน (แคลอรี) | 546 |

ที่มา : ภูวนาถ (2531)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## 2.2 อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2.1 และสปีชีส์ของเชื้อราที่ผลิตสารพิษและสารพิษหลักจากเชื้อราชนิดนั้นๆ แสดงดังตารางที่ 2.2



*A. flavus* กำลังขยาย 1000 เท่า

*A. parasiticus* กำลังขยาย 3000 เท่า

**รูปที่ 2.1** ลักษณะของเชื้อรา *A. flavus* (ซ้าย) และ *A. parasiticus* (ขวา) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

ที่มา : Reddy and Waliyar (2003)

ชื่อภาษาอังกฤษ aflatoxin มาจากชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อราดังกล่าว นั่นคือ "A" มาจากคำว่า *Aspergillus* "fla" มาจากคำว่า *flavus* นำมารวมกับคำว่า toxin กลายเป็น aflatoxin (Chung and Baker, 1990; Kubena *et al.*, 1991)

พืชผลทางการเกษตรโดยทั่วไป เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโอ๊ต มะพร้าวแห้ง เมล็ดทานตะวัน และเมล็ดฝ้าย มักมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินในอาหารดังกล่าวในหลายๆ ประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และนอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ (feed) และอาหารของคน (food) โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนของโลกดังแสดงในตารางที่ 2.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 2.2** สปีชีส์ของเชื้อราที่ผลิตสารพิษและสารพิษจากเชื้อรา

| สปีชีส์ของเชื้อรา | สารพิษจากเชื้อรา |
|---|---|
| *Aspergillus flavus; A. parasiticus* | Aflatoxins |
| *A. flavus* | Cyclopiazonic acid |
| *A. ochraceus; Penicillium viridicatum; P. cyclopium* | Ochratoxin A |
| *P. expansum* | Patulin |
| *Fusarium culmorum; F. graminearum; F. sporotrichioides* | Deoxynivalenol |
| *F. sporotrichioides; F. poae* | T-2 toxin |
| *F. sporotrichioides; F. graminearum; F. poae* | Diacetoxyscirpenol |
| *F. culmorum; F. graminearum; F. sporotrichioides* | Zearalenone |
| *F. moniliforme* | Fumonisins |
| *Acremonium coenophialum* | Ergopeptine alkaloids |
| *A. lolii* | Lolitrem alkaloids |
| *Phomopsis leptostromiformis* | Phomopsins |
| *Pithomyces chartarum* | Sporidesmins |

ที่มา : D'Mello and MacDonald (1997)

**ตารางที่ 2.3** การเกิด *Aspergillus* ของผลิตผลทางการเกษตรในบางประเทศ

| ชนิดของผลิตผลทางการเกษตร | ประเทศ | สปีชีส์ของเชื้อรา |
|---|---|---|
| ถั่วลิสง | ซูดาน | *A. flavus* |
| | อียิปต์ | *A. flavus + A. niger* |
| | แอฟริกาใต้ | *A. flavus + A. parasiticus* |
| ข้าวโพด | อินเดีย | *A. flavus* |
| | จีน | *A. flavus* |
| | อูกานดา | *A. flavus + A. parasiticus* |
| | ไนจีเรีย | *A. flavus + A. parasiticus + A. niger* |
| | สหรัฐอเมริกา | *A. flavus* |
| ข้าวสาลี | จีน | *A. flavus* |
| | รัสเซีย | *A. flavus* |
| ข้าว | จีน | *A. flavus* |
| | อินเดีย | *A. flavus + A. parasiticus* |
| ข้าวฟ่าง | อินเดีย | *A. flavus + A. parasiticus* |
| ถั่วเหลือง | อาร์เจนตินา | *A. flavus + A. parasiticus* |
| น้ำมันดอกทานตะวัน | จีน | *A. flavus* |
| | รัสเซีย | *A. flavus* |
| มะพร้าว | อินเดีย | *A. flavus* |
| ถั่ว Pistachio | สหรัฐอเมริกา | *A. flavus + A. parasiticus* |
| | ตุรกี | *A. flavus* |
| มะเดื่อ | สวิตเซอร์แลนด์ | *A flavus + A. parasiticus* |
| เมล็ดมัสตาร์ด | อินเดีย | *A. flavus* |

ที่มา : Rustom (1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ 2.4** การเกิดอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์และอาหารคน

| อาหาร | ประเทศ | Contaminated/total examined | Aflatoxin | Concentration ($\mu g.kg^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| ข้าว | จีน | 33/252 | $B_1$ | 5-50 |
| | อินเดีย | 1/1 | $B_1$ | 20 |
| ข้าวโพด | เคนยา | 70/78 | -[a] | 30-920 |
| | สหรัฐอเมริกา | 2370/2633 | - | 10-700 |
| | เม็กซิโก | 86/96 | - | 2.5-30 |
| | บราซิล | 40/328 | $B_1$ | >20 |
| | เดนมาร์ก | 6/197 | Total[b] | 5-174 |
| | ฝรั่งเศส | 3/3 | $B_1$ | 20 |
| | อินเดีย | 47/100 | $B_1$ | >20 |
| ข้าวฟ่าง | แอฟริกาใต้ | - | $B_1$ | 0-25 |
| | อินเดีย | - | $B_1$ | 7-75 |
| เนื้อมะพร้าวตากแห้ง | เกาะทองกา | 1/2 | $B_1$ | 37 |
| ลูกเดือย | อินเดีย | 49/75 | $B_1$ | 17-2110 |
| ถั่วเหลือง | เกาะฟิจิ | 7/20 | $B_1$ | 6-12 |
| | สหรัฐอเมริกา | 11/11 | $B_1$ | <20 |
| | สหรัฐอเมริกา | 3/24 | $B_1$ | <6 |
| | สวีเดน | 20/116 | $B_1$ | 50-400 |
| | สวีเดน | 16/27 | - | 5-67 |
| | สวีเดน | 19/267 | $M_1$ | >0.05 |
| | สเปน | 1/50 | $B_1$, $G_1$ | 67, 46 |
| | สเปน | 1/1 | $B_1$ | 20 |
| | สเปน | 14/47 | $M_1$ | 20-100 |
| | อังกฤษ | 8/93 | Total | 10-40 |
| | อินเดีย | 46/105 | $B_1$ | 120-810 |
| | อินเดีย | 44/100 | - | 75 |
| | อียิปต์ | 9/150 | $B_1$, $B_1$ | 4-15, 2-25 |
| | อาร์เจนตินา | 9/94 | $B_1$ | 1-36 |
| | อาร์เจนตินา | 5/5 | $B_1$ | 20-200 |
| | อบูดาบี | 443/445 | $M_1$ | 0.002-3.0 |

[a] _, not mentioned.

[b] $B_1+G_1+B_2+G_2$.

ที่มา : Rustom (1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากข้อมูลในตารางที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่าผลิตผลทางการเกษตรในแต่ละประเทศมีอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ เป็นส่วนใหญ่ รองลงมาเป็นอะฟลาทอกซินชนิด $M_1$ และ $G_1$ ตามลำดับ มีบางประเทศ เช่น เดนมาร์ก และอังกฤษ ที่พบอะฟลาทอกซินทุกชนิด แต่มีบางประเทศที่ไม่พบอะฟลาทอกซินเลย ทั้งนี้ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินที่พบอยู่ในช่วง 0.002-920.00 ส่วนต่อพัน-ล้านส่วน หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Rustom, 1997)

ในประเทศไทย นอกจากวัตถุดิบข้างต้นแล้ว ยังพบสารอะฟลาทอกซินในเครื่องเทศ เช่น พริกแห้ง หอม กระเทียม ตลอดจนผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปโดยใช้วัตถุดิบการเกษตรเหล่านี้ เช่น อาหารสัตว์ ถั่วลิสงแปรรูป ถั่วตุ๊บตั๊บ ถั่วกระจก น้ำมันถั่วลิสง อาหารสำเร็จรูป เมล็ดทานตะวันแปรรูป รวมทั้งพบการปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร เช่น ในเนื้อสัตว์ น้ำนม และไข่ อีกด้วย (สุวรรณา, 2546)

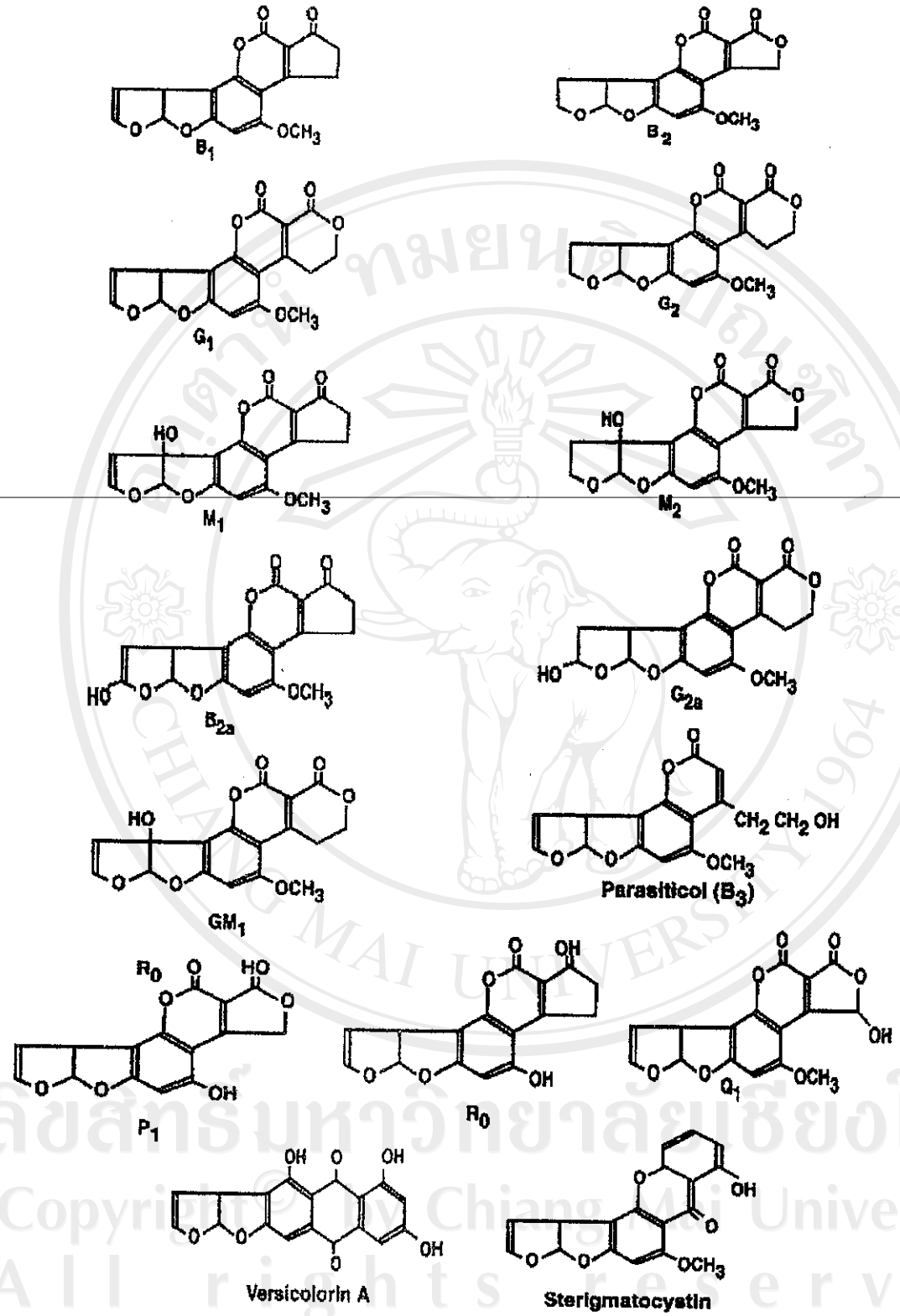
ตามปกติเชื้อราจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-90% เชื้อราจะเจริญได้ดียิ่งขึ้นในอาหารที่มีโปรตีนสูงและสร้างสารพิษได้มากด้วย เนื่องจากเชื้อราสามารถนำไนโตรเจนที่อยู่ในรูปเกลือแอมโมเนียมาใช้ในการสร้างสารพิษ ซึ่งสารพิษนี้จะคงตัวอยู่ในอาหารได้นานนับสิบปี นอกจากเชื้อราจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีโปรตีนสูงแล้ว เชื้อรายังสามารถเจริญได้ดีในข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวเหนียว รวมถึงผลไม้บางชนิด เช่น ขนุน มะม่วงสุก กล้วย องุ่น อาหารหมักดอง อาหารขบเคี้ยวที่มีธัญพืชเป็นส่วนผสม และอาหารสัตว์ การเจริญของเชื้อราอาจสังเกตได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากเชื้อรามีสีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียวเข้ม (ศรีสิทธิ์, 2540)

**2.3 การจำแนกชนิดของอะฟลาทอกซิน**

อะฟลาทอกซินที่พบและศึกษากันในปัจจุบันมี 16 ชนิด คือ $B_1$, $B_2$, $G_1$, $G_2$, $B_{2a}$, $G_{2a}$, $M_1$, $M_2$, $GM_1$, $GM_2$, $M_{2a}$, $GM_{2a}$, $B_3$, อะฟลาทอกซิคอล (aflatoxicol; $R_0$), $P_1$ และ $Q_1$ แต่ที่พบมากตามธรรมชาติจำแนกออกได้เป็น 4 ชนิด คือ $B_1$, $B_2$, $G_1$ และ $G_2$ ($AFB_1$, $AFB_2$, $AFG_1$ และ $AFG_2$) และพบอะฟลาทอกซินชนิด $M_1$ และ $M_2$ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ และ $B_2$ อยู่ในน้ำนมของคนและสัตว์ที่บริโภคอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อน (เยาวมาลย์และคณะ, 2543)

อะฟลาทอกซินแต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน อะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ มีความเป็นพิษสูงสุดและเป็นชนิดที่พบมากที่สุดด้วย รองลงมา คือ อะฟลาทอกซินชนิด $G_1$, $B_2$ และ $G_2$ ตามลำดับ ซึ่งการเรียกชื่อของอะฟลาทอกซินนั้นพิจารณาจากสมบัติการเรืองแสง คือ $B_1$, $B_2$ หมายถึง มีสมบัติการเรืองแสงในช่วงแสงสีน้ำเงิน ส่วนชนิด $G_1$, $G_2$ มีสมบัติเรืองแสงในช่วงแสงสีเขียว (Cardona *et al.*, 2003) สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




**รูปที่ 2.2** สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$, $B_2$, $G_1$, $G_2$, $M_1$, $M_2$, $B_{2a}$, $G_{2a}$, $GM_1$, $B_3$, $P_1$, $R_0$, $Q_1$, Versicolorin A และ Sterigmatocystin

ที่มา : Thomson Instrument Company (2003); เยาวมาลย์และคณะ (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างทางเคมี จะเห็นว่าอะฟลาทอกซินทุกชนิดมีหมู่ methoxy ($-OCH_3$) เป็นองค์ประกอบ และแต่ละโครงสร้างมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย เช่น เปรียบเทียบระหว่างอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ กับชนิด $B_2$ แตกต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เพราะชนิด $B_1$ เป็นพันธะคู่ แต่ชนิด $B_2$ เป็นพันธะเดี่ยว ชนิด $B_1$ จะเหมือนกับชนิด $G_1$ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 แต่แตกต่างกันตรง ring ที่ 5 เพราะชนิด $B_1$ เป็น five-membered ring แต่ชนิด $G_1$ เป็น six-membered ring ความเหมือนกันและแตกต่างกันของโครงสร้างทางเคมีเพียงเล็กน้อยนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อความเป็นพิษ (toxicity) โดยเฉพาะคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 และเนื่องจากอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ อันตรายที่สุด ดังนั้นการศึกษาจึงเน้นที่ชนิด $B_1$ เป็นส่วนใหญ่ (Samuel Roberts Noble Foundation, 2003)

**2.4 สมบัติสำคัญของอะฟลาทอกซิน**

อะฟลาทอกซินมีสมบัติต่างๆ ดังนี้

ก. อะฟลาทอกซินเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จากสมบัตินี้จึงนำมาใช้ในการตรวจสอบหาชนิดของอะฟลาทอกซิน โดยอะฟลาทอกซินชนิด B จะเรืองแสงสีน้ำเงิน และอะฟลาทอกซินชนิด G จะเรืองแสงสีเขียว

ข. ละลายได้ดีในน้ำมันและไขมัน ละลายได้บ้างในน้ำและน้ำเกลือ

ค. ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล (methanol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) อะซีโตน (acetone) เบนซีน (benzene) และอื่นๆ จากสมบัตินี้จึงนำมาใช้ในการสกัดอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ

ง. ไม่ละลายในตัวทำละลายบางชนิด เช่น เฮกเซน (hexane) อีเทอร์ (ether) และอื่นๆ จากสมบัตินี้จึงนำมาใช้ในการทำให้อะฟลาทอกซินบริสุทธิ์

จ. อะฟลาทอกซินถูกทำลายได้ง่ายด้วยสารละลาย 10% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) และ 6% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) จึงนำมาใช้ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

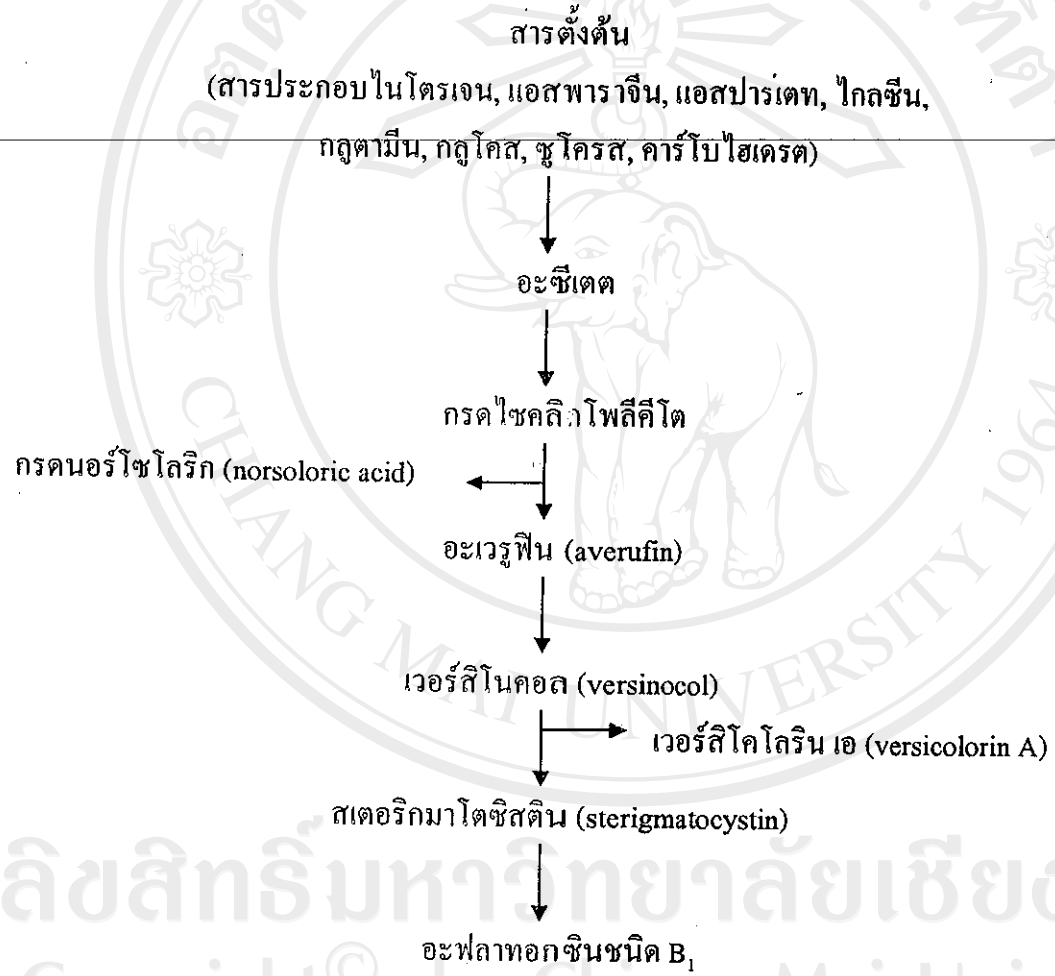
ฉ. จุดหลอมเหลวของอะฟลาทอกซินอยู่ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ ตุ๋น หรือนึ่ง จึงไม่สามารถทำลายสารนี้ได้ อย่างไรก็ตาม อะฟลาทอกซินสามารถถูกทำลายได้บ้างด้วยแสงและความร้อนในรูปต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ (อรุณศรี, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.5 กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน**

กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยเชื้อรานั้น มีสารตั้งต้นจากสารพวกอะซีเตต (acetate) โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เป็นวงแหวนที่มีคาร์บอน 20 ตัว ได้เป็นกรดไซคลิกโพลีคีโต (cyclicpolyketo acid) ขึ้นก่อน แล้วจึงมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน จนกระทั่งได้เป็นอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (เยาวมาลย์และคณะ, 2543; นิธิยาและวิบูลย์, 2543)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินเริ่มต้นจากอะซีเตต และมีขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงดังนี้




**รูปที่ 2.3** ปฏิกิริยาการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน
ที่มา : เยาวมาลย์และคณะ (2543); นิธิยาและวิบูลย์ (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สับสเตรตที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินนั้น พบว่า น้ำตาลซูโครส กลูโคส และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งให้โครงสร้างคาร์บอน (carbon skeleton) ที่ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน คือ สารประกอบไนโตรเจน กรดอะมิโนแอสพาราจีน (asparagine) แอสปาร์เตท (aspartate) ไกลซีน (glycine) และกลูตามีน (glutamine) ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เชื้อราจะสร้างอะฟลาทอกซินภายใน 24 ชั่วโมง และสามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้นานติดต่อกันถึง 10 วัน โดยระดับสูงสุดของอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นสามารถตรวจพบได้ในวันที่ 7 ภายหลังจากเชื้อราเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงหรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ (feed ingredient) ในช่วงสัปดาห์แรก อะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ และ $G_1$ จะถูกสังเคราะห์มากที่สุด และลดระดับการสังเคราะห์ลง ในขณะที่อะฟลาทอกซินชนิด $B_{2a}$ และ $G_{2a}$ มีระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (เยาวมาลย์และคณะ, 2543; นิธิยาและวิบูลย์, 2543)

**2.6 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน**

อะฟลาทอกซินจัดเป็นสารพิษประเภทสารก่อมะเร็ง (carcinogen หรือ carcinogenic substance) กล่าวคือ เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังเป็นพิษต่อตับ โดยทำให้เกิดตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับ และเป็นมะเร็งที่ตับ (Wogan, 1999) ในปี ค.ศ. 1960 ได้มีรายงานการเกิดพิษเนื่องจากอะฟลาทอกซินเป็นครั้งแรกในประเทศอังกฤษ โดยเกิดโรคตับอักเสบเป็นแผลฟกช้ำในสัตว์ปีก โดยเฉพาะในไก่งวง เรียกว่า "Turkey X-disease" ผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสาเหตุของการเกิดโรคนี้ พบว่า เกิดจากอาหารสัตว์ที่เป็นกากถั่วลิสง (groundnut meal) ซึ่งมาจากประเทศบราซิล และอาหารสัตว์นั้นมีเฉพาะถั่วลิสงเท่านั้นที่มีการปนเปื้อน เชื้อราที่สร้างสารพิษในถั่ว คือ *A. flavus* (Steering Group on Food Surveillance, 1987)

นักวิทยาศาสตร์หลายคนทดลองจนได้ข้อมูลยืนยันว่าอะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็ง โดยให้หนูทดลองบริโภคอาหารที่เจือปนด้วยสารอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ด้วยปริมาณและเวลาต่างๆ กัน และสังเกตการเปลี่ยนแปลง พบว่า หนูทดลองเกือบทั้งหมดมีภาวะของการเกิดมะเร็งในตับในช่วงเวลาหนึ่งๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแต่ละการทดลอง และยังมีหลักฐานการศึกษาที่เกี่ยวกับผลของสารพิษนี้อีก โดยการทดลองในสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ลูกเป็ด หนูตะเภา สุนัข กระต่าย และลิง เป็นต้น (เยาวมาลย์และคณะ, 2543)

เมื่อสัตว์ต่างๆ เหล่านี้ได้รับอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ เข้าไปในร่างกายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ขึ้นที่ตับเป็นส่วนใหญ่ การเปลี่ยนแปลงนี้อาจแบ่งออกเป็น 2 ทิศทางด้วยกัน ตามการตอบสนองทางชีวเคมีของเซลล์ตับต่อสารเมแทบอไลต์ (metabolites) ที่เกิดขึ้น คือ การเปลี่ยนแปลงเพื่อกำจัดออกนอกร่างกาย (metabolic route) และการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนแปลงเพื่อให้สารเมแทบอไลต์ไปทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ตับ ซึ่งมีผลต่อการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดมะเร็งด้วย

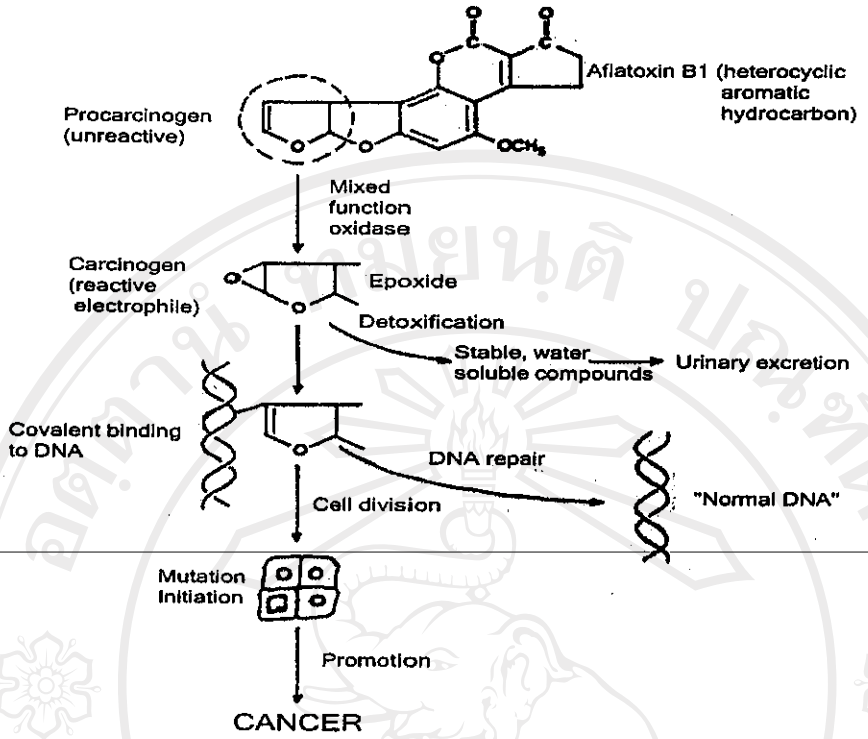
**การเปลี่ยนแปลงเพื่อการกำจัดออกจากร่างกาย**

เมื่ออะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ เข้าสู่ร่างกายแล้ว บางส่วนจะถูกกำจัดออกจากร่างกาย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเลย แต่ส่วนใหญ่แล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเมแทบอไลต์ชนิดอื่นๆ เช่น อะฟลาทอกซินชนิด $M_1$, $P_1$ และ $Q_1$ เป็นต้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะเกิดมากที่สุดในตับ โดยเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่อาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในส่วนเอนโดพลาสมิคเรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) (เยาวมาลย์และคณะ, 2543)

**การเปลี่ยนแปลงเพื่อทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ตับ**

เมื่ออะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ เข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไปที่ตับจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยกระบวนการที่คล้ายคลึงกันกับอะฟลาทอกซินเมแทบอไลต์ (aflatoxin metabolite) เพื่อกำจัดออกจากร่างกาย แต่อะฟลาทอกซินเมแทบอไลต์ที่พบในการเปลี่ยนแปลงนี้ก็คือ อะฟลาทอกซินชนิด $B_1$-epoxide ซึ่งจะจับตัวกับสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ของตับได้เป็นอย่างดี แต่ก็มีบางส่วนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาและถูกกำจัดทิ้งได้ในปัสสาวะหรืออุจจาระ อะฟลาทอกซินชนิด $B_1$-epoxide จะเข้าไปรวมตัวกับ DNA และ RNA ทำให้ DNA เสียหายหรือถูกทำลาย ซึ่งจะไปทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องทำหน้าที่ไม่ได้ โดยเฉพาะเอนไซม์โพลีเมอเรส (polymerase) มีผลทำให้การสร้าง DNA และ RNA ลดน้อยลง ถึงแม้ว่า DNA บางส่วนสามารถที่จะซ่อมแซมตัวเองได้ให้เป็นปกติเหมือนเดิม ดังนั้นเมื่อสารพิษรวมตัวกับ DNA แล้วจะมีผลทำให้หน้าที่ทางชีวภาพเปลี่ยนไป เอนไซม์นิวคลีอิกแอซิดโพลีเมอเรส (nucleic acid polymerase) ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ การสังเคราะห์โปรตีนหยุดชะงัก และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน ทำให้เซลล์ตับตายและเกิดมะเร็งได้ในตับ (University of Wisconsin Medical School, 2003) กลไกการก่อมะเร็งของอะฟลาทอกซินแสดงดังรูปที่ 2.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูปที่ 2.4 กลไกการก่อมะเร็งของอะฟลาทอกซิน

ที่มา : University of Wisconsin Medical School (2003)

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับอะฟลาทอกซินส่วนใหญ่ทดลองในสัตว์นานาชนิด เช่น ในประเทศไทยนักวิจัยจากคณะเกษตรศาสตร์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ศึกษาผลของอะฟลาทอกซินต่อความเสี่ยงของสุขภาพและการผลิตสัตว์ คือ เป็ด ไก่ สุกร โค ปลาดุก และปลานิล (เยาวมาลย์และคณะ, 2543) ต่อมาในระยะหลังๆ ได้มีนักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาในคน เพื่อจะได้ข้อมูลสนับสนุนให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากเป็นเรื่องที่เสี่ยงต่อชีวิตและผิดจรรยาบรรณ จึงยากที่จะได้รายละเอียดเพิ่มเติมอย่างชัดเจน และมีหลายรายงานได้ให้ข้ออธิบายในรูปแบบของการศึกษาในเชิงระบาดวิทยา หรือเป็นการศึกษาจากการเกิดโรคของตับ โดยเฉพาะโรคมะเร็งในตับระยะเริ่มแรก ร่วมกับภาวะการที่คนเหล่านั้นได้รับสารอะฟลาทอกซิน ที่แน่ชัดก็คือ มีรายงานจำนวนมากซึ่งพบว่าสารอะฟลาทอกซินเจือปนอยู่ในอาหารที่คนเราบริโภคเป็นประจำ เพียงแต่ยังไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนว่ามากเท่าใดที่เข้าสู่ร่างกายจึงจะทำให้คนเราเป็นมะเร็งตับได้ The International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้ระบุว่าอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในคน การค้นคว้าเกี่ยวกับเรื่องนี้ยังคงจำเป็นต้องศึกษากันต่อไปทั้งในปัจจุบันและอนาคต แต่จากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์พอจะสรุปได้ว่า กลไก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซินในคนเหมือนกับสัตว์ทดลอง (National Center for Agricultural Utilization Research, 2003)

นอกจากนี้ยังพบว่า อะฟลาทอกซินมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่คล้ายโรคเรย์ในประเทศไทย นิวซีแลนด์ เชคโกสโลวาเกีย สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย เวเนซูเอลา และยุโรป โดยพบว่ามีผลทำให้คนตายจากโรคที่เกี่ยวกับตับ 106 ราย มีอาการไม่สบายหลังจากบริโภคข้าวโพดที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินอีกจำนวน 397 ราย เนื่องจากเกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันจากอะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ สำหรับในเด็กนั้นพบว่า มีลักษณะอาการคล้ายโรคเรย์ คือ ชัก และหมดสติ เนื่องจากเกิดความผิดปกติของเซลล์ตับและเซลล์สมอง เด็กจะเสียชีวิตภายในเวลา 2-3 วันเท่านั้น ซึ่งเป็นภาวะของโรคที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลันหลังจากได้รับสารพิษแล้ว นับว่าเป็นอันตรายร้ายแรงต่อชีวิตเด็กเป็นอย่างมาก (กนกรัตน์, 2546)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาทางระบาดวิทยาเกี่ยวกับโรคสมองในเด็กที่จังหวัดอุดรธานี โดยคณะแพทย์ไทยและแพทย์อเมริกา (Bourgeois *et al.*, 1971) พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีไข้ อาเจียน ปวดท้อง หัวใจเต้นเร็ว อัตราการหายใจไม่คงที่ ตับโตเล็กน้อย มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการของโรคเรย์ที่พบในประเทศนิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา แอฟริกาใต้ และเชคโกสโลวาเกีย (Becroft and Webster, 1972) สาเหตุของโรคดังกล่าวน่าจะเกิดจากสารพิษมากกว่าเกิดการติดเชื้อ เพราะไม่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อสมอง สารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารไทยมีหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคอีสานมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินมากที่สุด เนื่องจากมีการระบาดของโรคสมองมากกว่าภาคอื่นๆ ซึ่งอาการดังกล่าวสามารถพบได้ในลิงที่กินอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่ เมื่อตรวจอวัยวะต่างๆ ของลิงจึงพบอะฟลาทอกซิน ผลการทดลองดังกล่าวจึงเป็นข้อเสนอให้มีการตรวจหาอะฟลาทอกซินในอวัยวะของผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคสมองที่จังหวัดอุดรธานี และพบอะฟลาทอกซินในอุจจาระ 123 ส่วนต่อพันล้านส่วน อาหารที่อยู่ในกระเพาะและลำไส้พบอะฟลาทอกซิน 127 ส่วนต่อพันล้านส่วน ในน้ำดีพบอะฟลาทอกซิน 8 ส่วนต่อพันล้านส่วน แต่ตรวจไม่พบอะฟลาทอกซินในอวัยวะของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคอื่น ทำให้สรุปได้ว่าโรคสมองในเด็กที่จังหวัดอุดรธานีนั้นเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษของอะฟลาทอกซิน (ศรีสิทธิ์, 2540)

อะฟลาทอกซินยังอาจทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับปอดได้ โดยตรวจพบอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ในปอดของคนงาน 2 คนที่ทำงานเกี่ยวกับเกษตรกรรม และอีก 1 คนที่ทำงานเกี่ยวกับสิ่งทอ ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่ามีโอกาสได้รับอะฟลาทอกซินผ่านทางระบบหายใจและเกิดเป็นโรคปอดได้ (Thrasher, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.7 อะฟลาทอกซินที่ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์**

**2.7.1 อะฟลาทอกซินและการเกิดโรคในคน**

เมื่อคนได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา อาการพิษเฉียบพลันที่เกิดขึ้น คือ อาเจียน ปวดท้อง น้ำท่วมปอด ชัก หมดสติ และตาย เนื่องจากเส้นเลือดในสมองแตกและไขมันอุดตันในตับ ไต และหัวใจ โดยความรุนแรงของพิษที่เกิดขึ้นผันแปรตามปริมาณของสารพิษที่อยู่ในอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เชื้อราสามารถเจริญได้ (Nabil, 2003)

ผลการศึกษาทางระบาดวิทยาของประชากรในประเทศจีนที่อาศัยอยู่ใน 4 หมู่บ้าน ซึ่งมีการบริโภคถั่วลิสง น้ำมันถั่วลิสง และข้าวโพด พบว่า การบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันอย่างมากกับอัตราการตายจากโรคมะเร็งตับที่เพิ่มขึ้น และพบเมแทบอไลต์ของอะฟลาทอกซินชนิด $M_1$ ในปัสสาวะของผู้ที่ได้รับอะฟลาทอกซินในปริมาณปานกลางเท่านั้น ดังนั้นเมื่อพบเมแทบอไลต์ของอะฟลาทอกซินชนิด $M_1$ ในปัสสาวะ จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่ามีอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ เข้าไปในร่างกาย (เยาวมาลย์และคณะ, 2543; Thrasher, 2003)

**2.7.2 อะฟลาทอกซินและการเกิดโรคในสัตว์**

ผลการศึกษาทางชีวเคมีพบว่า สัตว์ทดลองที่กินอาหารที่มีอะฟลาทอกซินเข้าไป อะฟลาทอกซินจะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กและถูกพาไปที่ตับ จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้อะฟลาทอกซินมีพิษน้อยลงโดยเอนไซม์ที่ตับ แล้วถูกขับถ่ายออกทางน้ำนมและปัสสาวะ ในกรณีที่ได้รับอะฟลาทอกซินในปริมาณสูงมากจนตับไม่สามารถทำลายพิษได้ทัน จะทำให้เกิดการสะสมของอะฟลาทอกซินในตับ และแพร่ไปสู่อวัยวะอื่นๆ เซลล์ของตับจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากมีไขมันสะสม มีเลือดออกในตับทำให้เกิดการตายของเซลล์ เกิดอาการตับแข็ง ตับอักเสบ จำนวนเซลล์ของท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นทำให้ท่อน้ำดีอุดตัน เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ในที่สุดจะเกิดมะเร็งตับ และเสียชีวิต เนื่องจากอะฟลาทอกซินไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดการลดลงของ DNA replication และปริมาณ RNA รวมทั้งลดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย (เยาวมาลย์และคณะ, 2543; Nabil, 2003)

**2.7.3 ผลของอะฟลาทอกซินต่อการเกิดเนื้องอกในสัตว์**

เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินเป็นระยะเวลานานๆ จะทำให้เกิดเนื้องอกที่ตับของเป็ดปลาเทร้าท์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่คน (non-human primates) (ตารางที่ 2.5) การเกิดเนื้องอกในปศุสัตว์ไม่ค่อยพบบ่อยนัก เนื่องจากต้องอาศัยระยะเวลานานเป็นปี และสัตว์ส่วนมากมักมีน้ำหนักได้ขนาดที่จะส่งจำหน่ายตลาดแล้ว อาจจะพบเนื้องอกบ้างในสัตว์ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน (เยาวมาลย์และคณะ, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.5 ผลของอะฟลาทอกซินต่อการเกิดเนื้องอกในสัตว์

| ชนิดสัตว์ | ปริมาณอะฟลาทอกซินและระยะเวลา | ชนิดของเนื้องอก |
|---|---|---|
| ปลาเทร้าท์ | 0.4 ไมโครกรัม/กิโลกรัม นาน 36 สัปดาห์ | เนื้องอกที่ตับ |
| เป็ด | 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม นาน 2-4 สัปดาห์ | เนื้องอกที่ตับ |
| หนู (mice) | 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม นาน 76 สัปดาห์ | เนื้องอกที่ตับ |

ที่มา : เยาวมาลย์และคณะ (2543)

**2.8 การกำหนดปริมาณของอะฟลาทอกซินที่ยอมให้มีได้ในอาหาร**

เนื่องจากอะฟลาทอกซินเป็นสารที่เข้าสู่ร่างกายแล้วก่อให้เกิดพิษรุนแรงมาก แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดอันตรายได้ จึงกำหนดหน่วยวัดเป็นส่วนต่อพันล้านส่วน หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) รายงานว่าปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีอยู่ในผลิตผลเกษตร อาหารสัตว์ และอาหารคนนั้น มีการกำหนดค่าผันแปรแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ สำหรับประเทศไทยให้ถือตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่องมาตรฐานที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4 กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ส่วนพัฒนามาตรฐานอาหารและสนับสนุนการกำกับดูแล, 2545) ซึ่งปริมาณอะฟลาทอกซินที่กำหนดนี้เป็นปริมาณของอะฟลาทอกซินทุกชนิดรวมกันต้องไม่เกินค่าที่กฎหมายกำหนด

**2.9 วิธีตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน**

การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินที่มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้มีอยู่หลายวิธี อาจจำแนกเป็น 3 ระดับ คือ วิธีการสันนิษฐานในขั้นต้น (presumptive test) วิธีการตรวจสอบขั้นต้นอย่างรวดเร็ว (rapid screening method) และวิธีการวิเคราะห์ปริมาณอย่างละเอียด (quantitative method) (อรุณศรี, 2540)

**2.9.1 วิธีการสันนิษฐานในขั้นต้น** เป็นการตรวจสอบเพื่อให้ทราบว่าอาจจะมีอะฟลาทอกซินหรือไม่ ในปริมาณที่มากหรือน้อยเท่านั้น โดยตรวจจุดเรืองแสงด้วยวิธี Bright Greenish Yellow Fluorescence (BGYF) ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดีกับข้าวโพด แต่ใช้ไม่ได้กับถั่วลิสงหรือผลิตผลเกษตรที่มีปริมาณน้ำมันสูง

จุดเรืองแสงนี้เกิดจากเอนไซม์บางชนิดในข้าวโพดทำปฏิกิริยากับกรดโคจิก (kojic acid) ที่สร้างโดยเชื้อรา *A. flavus* ดังนั้นการที่ตรวจพบจุดเรืองแสง ย่อมแสดงว่าข้าวโพดมีเชื้อราอยู่ แต่เนื่องจากไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ของเชื้อราที่สร้างสารพิษได้ เพราะฉะนั้นการตรวจพบจุด BGYF จึงไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่ามีอะฟลาทอกซิน จึงจัดวิธีการตรวจสอบ BGYF ไว้เป็นเพียงการสันนิษฐานในขั้นต้น ซึ่งจำเป็นต้องมีการตรวจสอบในขั้นต่อไปเพื่อให้ทราบว่ามีอะฟลาทอกซิน

**2.9.2 วิธีตรวจสอบขั้นต้นอย่างรวดเร็ว** เพื่อให้ทราบว่ามีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ในระดับใดโดยประมาณ วิธีการที่ใช้มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้กันแพร่หลายและได้ผลดี คือ วิธีมินิคอลัมน์ (minicolumn) โดยเป็นการอ่านค่าความเข้มของแสงที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับมินิคอลัมน์มาตรฐาน (standard minicolumn) ที่ทราบความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในระดับต่างๆ กัน เช่น 10, 50 และ 100 ส่วนต่อพันล้านส่วน (AOAC, 1995) ดังนั้นการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาสั้น ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือน้อย และวัดปริมาณอะฟลาทอกซินได้

**2.9.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณอย่างละเอียด** โดยวิธีการนี้สามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของอะฟลาทอกซินได้อย่างละเอียด แต่ขั้นตอนการปฏิบัติค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ใช้เครื่องมือหลายชนิด ต้องการความชำนาญพิเศษ ค่าใช้จ่ายสูง แต่อ่านผลได้ละเอียดและถูกต้อง สามารถอ่านค่าได้ในปริมาณที่ต่ำมาก ผลจากการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับทั่วไป โดยเฉพาะในด้านกฎระเบียบและข้อบังคับเกี่ยวกับปริมาณอะฟลาทอกซิน

การวิเคราะห์ปริมาณโดยละเอียด มีขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปแยกชนิดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยวัดความเข้มของแสงที่เรืองออกมาทั้งแสงสีน้ำเงินและสีเขียว เปรียบเทียบกับความเข้มของการเรืองแสงจากอะฟลาทอกซินมาตรฐาน วิธีการต่างๆ ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน ได้แก่ Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Immunology เช่น Radio Immuno Assay (RIA) และ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Nabil, 2003) การวิจัยในครั้งนี้ใช้วิธี HPTLC ซึ่งมีหลักการและทฤษฎีดังนี้

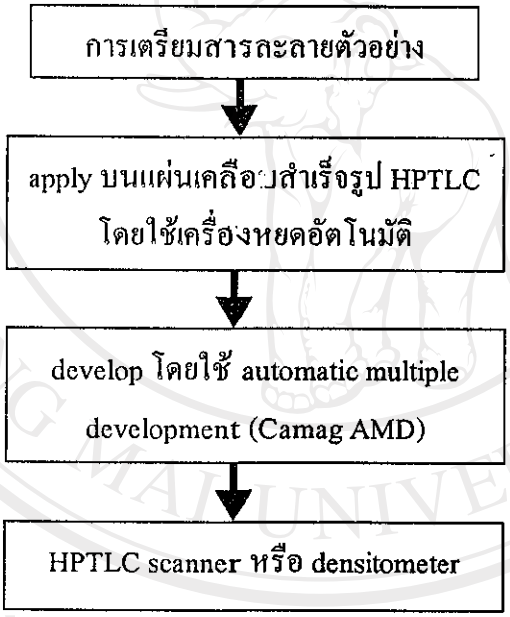
วิธีการของ HPTLC ถูกพัฒนามาจาก TLC เพื่อทำให้สามารถใช้แยกสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลงด้วย และเทคนิคของ HPTLC นั้น ต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วยวิเคราะห์ เพราะต้องมีความแม่นยำมาก นอกจากนี้ HPTLC ยังมีความแตกต่างจาก TLC ที่ขนาดอนุภาคของสารดูดซับที่ฉาบอยู่บนเพลต คือ TLC มีขนาดอนุภาคประมาณ 12 ไมโครเมตร และมีความหนา 250 มิลลิเมตร HPTLC มีขนาดอนุภาคของสารดูดซับประมาณ 7 ไมโครเมตร และมีความหนาประมาณ 100 มิลลิเมตร เท่านั้น การฉาบต้องทำให้มีความบาง เรียบสม่ำเสมอและแน่น HPTLC มีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า TLC มาก สามารถแยกสารผสมหลายชนิดออกจากกันได้โดยใช้ระยะทางเพียง 5 เซนติเมตร เท่านั้น ในขณะที่ TLC ใช้ประมาณ 10-15 เซนติเมตร ดังนั้น เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะน้อยกว่าประมาณ 1/3 ปริมาณของสารตัวอย่างที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้วิเคราะห์ใน HPTLC ประมาณ $10^{-9}$-$10^{-12}$ กรัม ในสารละลายที่มีปริมาตรน้อยกว่า 1 ไมโครลิตร เท่านั้น (ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2546)

ข้อแตกต่างที่สำคัญระหว่าง HPTLC และ TLC ธรรมดา คือ ขนาดอนุภาคและรูพรุนของสารดูดซับ ซึ่ง HPTLC ใช้สารดูดซับที่ผลิตขึ้นด้วยขนาดอนุภาคและรูพรุนที่สม่ำเสมอและเล็กมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ TLC ธรรมดา ทำให้ HPTLC มีประสิทธิภาพสูงกว่า

เทคนิค HPTLC เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการแยกสูง ซึ่งจะขึ้นกับค่าคงที่ของอัตราเร็วของวัฏภาคเคลื่อนที่ ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ของสารประกอบในวัฏภาคเคลื่อนที่ และค่าการกระจายของขนาดอนุภาคที่มีความใกล้เคียงกันของวัฏภาคที่อยู่กับที่ นอกจากนี้เทคนิค HPTLC ยังมีแผ่นเคลือบสำเร็จรูปที่มีการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น ลดการแพร่ของตัวอย่างเมื่อ develop และการหยดตัวอย่างด้วยเครื่องอัตโนมัติจะช่วยเพิ่มความแม่นยำของปริมาตรการหยดตัวอย่าง ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยวิธี HPTLC แสดงดังรูปที่ 2.5




**รูปที่ 2.5** แผนภาพขั้นตอนการวิเคราะห์ HPTLC
ที่มา : Liang *et al.* (1996); นิตยา (2540)

Liang *et al.* (1996) วิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงโดยใช้วิธี HPTLC สามารถวัดปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$, $B_2$, $G_1$ และ $G_2$ ได้ต่ำสุด 4.5, 3.0, 4.9 และ 3.3 พิโคกรัม สามารถวัดเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) ของอะฟลาทอกซินมาตรฐานที่เติมลงไปได้ 97.85, 90.38, 100.2 และ 98.75% ตามลำดับ และดวงจันทร์ (2539) ศึกษาการเตรียมตัวอย่างมาตรฐานลงในข้าวโพดเพื่อวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ โดยใช้วิธี TLC และ HPTLC สามารถวัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ได้ต่ำสุด 1.0 นาโนกรัมต่อกรัม และสามารถวัดเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของอะฟลาทอกซินมาตรฐานได้ 84.58-100.00%

**ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน**

การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การสุ่มตัวอย่าง (sampling) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เพราะลักษณะการกระจายตัวของอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงจะไม่สม่ำเสมอกัน หากเกิดความผิดพลาดจากการสุ่มตัวอย่างแล้ว ผลการตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินก็จะผิดพลาดไปด้วย สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ วิธีการสุ่มตัวอย่างและขนาดของตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์ ซึ่งขึ้นกับลักษณะของงานและความเป็นไปได้ในการปฏิบัติจริง

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ (sample preparation) ภายหลังการสุ่มเก็บตัวอย่างมาแล้ว ควรส่งเข้าห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด ถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันที ควรทำตัวอย่างให้แห้งอยู่ในระดับความชื้นที่ปลอดภัยจากเชื้อรา และเก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท ตัวอย่างที่จะตรวจวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซิน ถ้าเป็นเมล็ดพืชต้องบดหยาบก่อน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-9 มิลลิเมตร) คลุกเคล้าตัวอย่างให้เข้ากันดีแล้ว แบ่งตัวอย่างให้มีปริมาณลดลงโดยใช้เครื่องแบ่งสอง (divider) หรือแบ่ง 4 ส่วน แล้วเก็บไว้ 2 ส่วนที่อยู่ทะแยงมุมกัน นำมาผสมคลุกเคล้ากันแล้วแบ่งเป็น 4 ส่วนอีก ทำไปเรื่อยๆ จนได้ขนาดตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ จึงนำไปบดละเอียด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร) อีกครั้ง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน

3. การสกัด (extraction) คือ การแยกอะฟลาทอกซินออกมาจากสารอื่นๆ โดยการใช้ตัวทำละลาย เขย่าหรือปั่นเพื่อให้อะฟลาทอกซินละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลาย ปล่อยไว้ให้เกิดการแยกชั้น แล้วดูดหรือกรองเก็บชั้นของสารละลายที่มีอะฟลาทอกซินละลายอยู่

4. การทำให้บริสุทธิ์ (clean-up) เป็นขั้นตอนที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมแต่ละชนิดมากำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออก เช่น ไขมัน และสี โดยไม่ละลายอะฟลาทอกซินออกไปด้วย ในขั้นนี้จะได้อะฟลาทอกซินที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

5. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ (quantitative analysis) นำสารละลายอะฟลาทอกซินที่ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นแล้วมาตรวจหาชนิดและปริมาณโดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร กับอะฟลาทอกซินมาตรฐานที่ทราบชนิดและปริมาณ นอกจากอ่านค่าด้วยสายตาแล้ว ยังอาจใช้เครื่องมือพิเศษมาช่วยเพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องยิ่งขึ้น เช่น เครื่อง densitometer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การตรวจสอบยืนยันผล (confirmation test) เป็นการปฏิบัติเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่งว่าถูกต้องหรือไม่ โดยการใช้สารเคมีบางชนิดทำปฏิกิริยากับจุดเรืองแสง เช่น ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 25% ฉีดพ่น TLC plate ปล่อยไว้สักครู่ ถ้าเป็นอะฟลาทอกซินจะเห็นเป็นจุดสีเหลืองตรงบริเวณที่เห็นเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (อรุณศรี, 2540)

**2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซิน**

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราคือ ชนิดของเชื้อรา ชนิดของอาหาร ธาตุอาหาร อุณหภูมิ ความชื้น การเข้าทำลายของแมลง และความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแต่ละปัจจัยมีรายละเอียดดังนี้ (อรุณศรี, 2540)

**ชนิดของเชื้อรา** ผลการศึกษาความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* มากกว่า 500 ตัวอย่าง พบว่าสามารถสร้างสารพิษได้ประมาณ 40% ของจำนวนตัวอย่าง และสามารถสร้างสารพิษได้ในระดับต่างๆ กัน ฉะนั้นการที่ไม่มีเชื้อรา *A. flavus* เจริญอยู่บนเมล็ดพืช ไม่ได้หมายความว่าปลอดภัยจากสารอะฟลาทอกซิน เพราะบางครั้งเชื้อราถูกทำลายไป แต่อะฟลาทอกซินจะยังอยู่ในเมล็ดพืช (อรุณศรี, 2540)

**ชนิดของอาหาร** เชื้อราเจริญและสร้างสารพิษได้มากน้อยแตกต่างกันในผลิตผลเกษตรต่างๆ หรือถึงแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่พันธุ์แตกต่างกัน บางครั้งถึงแม้ว่าเชื้อราเจริญได้ แต่อาจจะไม่สร้างอะฟลาทอกซิน ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากความแตกต่างของส่วนประกอบทางเคมีของพืชแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งสมบัติในการยับยั้งการสร้างสารพิษหรือยับยั้งปัจจัยที่ส่งเสริมการสร้างสารพิษ (อรุณศรี, 2540)

**ธาตุอาหาร** ธาตุอาหารที่จำเป็นในการสร้างสารพิษของเชื้อรา ได้แก่ อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และแร่ธาตุ เช่น เหล็ก และสังกะสี เป็นต้น ถ้าขาดธาตุอาหารที่จำเป็นเหล่านี้ การสร้างอะฟลาทอกซินก็จะไม่เกิดขึ้น หรือถ้าแร่ธาตุที่ส่งเสริมการสร้างสารพิษมีปริมาณน้อยลง เนื่องจากไปจับตัวกับสารอื่นก็จะทำให้ปริมาณการสร้างสารพิษลดน้อยลงไปด้วย เช่น ถั่วเหลืองมีปริมาณกรดไฟติก (phytic acid) อยู่สูงและจับตัวกับสังกะสีได้มาก จึงมักพบว่ามีอะฟลาทอกซินในถั่วเหลืองน้อยกว่าในถั่วชนิดอื่น (อรุณศรี, 2540)

**อุณหภูมิ** เชื้อรา *A. flavus* เจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 11-37 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อรานี้จะสร้างอะฟลาทอกซินได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (อรุณศรี, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ความชื้น** ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศต่ำสุดที่เชื้อรา *A. flavus* จะเจริญได้คือ 85% ถ้าปริมาณความชื้นในอากาศยิ่งสูง เชื้อราจะเจริญได้ดียิ่งขึ้น ความชื้นในผลิตผลเกษตรแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ ส่วนประกอบทางเคมี และโครงสร้างของผลิตผลนั้น เพราะฉะนั้นที่สภาพความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศเท่ากัน ผลิตผลแต่ละชนิดจะมีความชื้นสัมพัทธ์แตกต่างกันไป ระดับความชื้นในผลิตผลการเกษตรที่เชื้อราไม่สามารถเจริญได้เรียกว่าระดับความชื้นที่ปลอดภัย ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเจริญของราได้ โดยการทำให้ผลิตผลแห้งจนมีความชื้นในระดับที่ปลอดภัย ซึ่งจะแตกต่างกันในผลิตผลแต่ละชนิด เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวโพดและข้าวฟ่างมีความชื้นเท่ากับ 13% หรือต่ำกว่า ถั่วลิสงมีความชื้น 7% ถั่วเหลืองมีความชื้น 8% และเมล็ดฝ้ายมีความชื้น 10% เป็นต้น (อรุณศรี, 2540)

**การเข้าทำลายของแมลง** การทำลายของแมลงจะเร่งให้การเกิดการสร้างอะฟลาทอกซินได้สองทาง คือ ทำให้พืชอ่อนแอ เชื้อราเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น และแมลงยังช่วยเปิดทางให้เชื้อรา เข้าสู่พืชได้ด้วย การทำลายของแมลงจะเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ก่อนเก็บเกี่ยวจนกระทั่งเมื่อเก็บรักษา นอกจากนี้การทำลายของแมลงยังทำให้ความชื้นในเมล็ดสูงขึ้นด้วย (เยาวมาลย์และคณะ, 2543)

**ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์** ความเข้มข้นของก๊าซทั้งสองนี้จะมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา พบว่า ถ้าลดปริมาณของก๊าซออกซิเจนลง หรือเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้สูงขึ้นจะทำให้การเจริญของเชื้อราช้าลง และปริมาณของอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นก็มีระดับต่ำด้วย (เยาวมาลย์และคณะ, 2543)

## 2.11 รายงานผลการวิจัยของอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

การผลิตถั่วลิสงในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ ดังนั้นปัญหาเรื่องอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงจึงเป็นปัญหาภายในประเทศ ซึ่งกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้ศึกษาถึงการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* และการเกิดอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงตั้งแต่ในไร่ระยะเก็บเกี่ยว และกระบวนการหลังเก็บเกี่ยวถั่วลิสง จนถึงการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภค รวมทั้งปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลาย และสร้างสารพิษของเชื้อรา เช่น การขาดน้ำ การเข้าทำลายของแมลงในดิน และอายุการเก็บเกี่ยวที่สัมพันธ์กับความชื้นในเมล็ดถั่วลิสง

ผลการศึกษาพบว่า ปัญหาของสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นปัญหาหลังการเก็บเกี่ยว และไม่สามารถลดความชื้นลงได้ทันเวลาต่อการเข้าทำลายและการสร้างสารพิษของเชื้อรา สำหรับปัญหาการเกิดสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงในไร่จะพบในกรณีที่ถั่วลิสงอยู่ในระยะพัฒนาฝัก และเกิดผลกระทบจากความแห้งแล้งอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในช่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 วันก่อนเก็บเกี่ยว ทำให้การพัฒนาเนื้อเยื่อของฝักไม่สมบูรณ์ จึงเป็นช่องทางให้เชื้อรา *A. flavus* ที่อยู่ในดินเข้าทำลายได้ง่าย และอีกสาเหตุหนึ่ง คือ เกิดขึ้นได้ในกรณีที่ฝักถั่วลิสงถูกแมลงในดินเข้าทำลายก็จะเป็นช่องทางให้เชื้อรา *A. flavus* ที่อยู่ในดินเข้าทำลายได้ รวมทั้งในกรณีที่ฝักถั่วลิสงแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยว แต่ยังไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการเกิดอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงในไร่นา เพราะธรรมชาติของถั่วลิสงเมื่อแก่เต็มที่แล้ว ฝักถั่วลิสงจะแตกออกจึงเป็นช่องทางให้เชื้อราเข้าทำลายได้ง่าย จากข้อมูลเหล่านี้จะเห็นได้ว่า โอกาสที่เชื้อรา *A. flavus* จะเข้าทำลายและสร้างสารพิษในถั่วลิสงขณะอยู่ในไร่เป็นไปได้ง่าย หากมีการป้องกันในเรื่องของการขาดน้ำ การเข้าทำลายของแมลงในดิน และเก็บเกี่ยวถั่วลิสงให้ตรงตามอายุการเก็บเกี่ยวก็จะช่วยป้องกันได้ เพราะโดยธรรมชาติของพืชในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตจะมีการสร้างสารออกมาป้องกันตัวเองอยู่แล้ว (อรุณศรี, 2540)

สำหรับปัญหาการเกิดสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า ถั่วลิสงจากไร่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ค่อนข้างต่ำ (1.1%) และพบอะฟลาทอกซินไม่เกิน 30 ส่วนต่อพันล้านส่วน แต่พบปริมาณของเชื้อราและอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่อยู่บนลานตากและระยะเวลาที่เก็บรักษาไว้ในโกดังของพ่อค้า สำหรับถั่วลิสงคัดเกรด พบว่า ถ้าเป็นถั่วใหม่ทั้งชนิดเมล็ดใหญ่และเล็กจะพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ประมาณ 21.5% และพบอะฟลาทอกซินประมาณ 20-50 ส่วนต่อพันล้านส่วน ถ้าเป็นถั่วลิสงชนิดแตกซีกและถั่วเมล็ดเสียทั้งถั่วเก่าและใหม่จะพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินค่อนข้างสูง โดยเฉพาะถั่วเมล็ดเสียเมื่อนำไปบีบเอาน้ำมันถั่วลิสง ตรวจพบอะฟลาทอกซินทุกตัวอย่างในปริมาณ 52-6,375 ส่วนต่อพันล้านส่วน และน้ำมันถั่วลิสงนี้จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแผ่นก๋วยเตี๋ยว ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเป็นอย่างมาก สำหรับถั่วลิสงเมล็ดจากตลาดส่วนใหญ่ตรวจพบอะฟลาทอกซินต่ำกว่าระดับมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข คือ 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่ถ้าเป็นถั่วลิสงปนจากตลาดจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงกว่าระดับมาตรฐานมาก (18-605 ส่วนต่อพันล้านส่วน) (อรุณศรี, 2540)

Kheiralla *et al.* (1992) ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการบ่ม อุณหภูมิ และสับสเตรตต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน พบว่า *A. flavus* ซึ่งแยกได้จากข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าว มีการผลิตอะฟลาทอกซินปริมาณสูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ภายหลังการบ่มนาน 2 สัปดาห์ และมีการผลิตอะฟลาทอกซินปริมาณต่ำที่สุดภายหลังการบ่มนาน 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีการผลิตอะฟลาทอกซินที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักของไมซีเลียม นอกจากนี้ยังศึกษาชนิดของสับสเตรต 13 ชนิดที่เหมาะสมแก่การผลิตอะฟลาทอกซินจาก *A. parasiticus* NRRL 2999 ซึ่งภายหลังการบ่มกับสับสเตรตนาน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบปริมาณอะฟลาทอกซินสูงที่สุดอยู่ในถั่วลิสง ข้าว เมล็ดแตงโม และเมล็ดงา อยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในช่วง 29-50 ส่วนต่อพันล้านส่วน นอกจากนี้ยังพบว่าในข้าวสาลี แป้งข้าวสาลี ข้าวโพด แป้งข้าวโพด และพืชตระกูลถั่ว มีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 11-21 ส่วนต่อพันล้านส่วนและพบในถั่วเหลือง ถั่วแขกสีแดง และถั่วลิสงอบคลุกเกลือ ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 2-4 ส่วนต่อพันล้านส่วน

Ellis *et al.* (1993) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยใช้ Malt extract agar (MEA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้กลีเซอรอลปรับค่า $a_w$ ให้ได้ตามที่ต้องการ เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่มีการดัดแปลงสภาพบรรยากาศ (modified atmosphere packaging; MAP) โดยศึกษาปัจจัย 4 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 5 ระดับ คือ $a_w$ (0.94, 0.95, 0.96, 0.97 และ 0.98) พีเอช (5, 6, 7, 8 และ 9) อุณหภูมิที่เก็บรักษา (15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) และความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนภายในบรรจุภัณฑ์เป็น 0, 5, 10, 15 และ 20% ซึ่งปรับให้สมดุลด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจน (60 : 40) ส่วนบรรจุภัณฑ์ชนิดสุญญากาศใช้ถุง Cryovac มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนเป็น 3-6 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อ 24 ชั่วโมง บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างๆ ตามกำหนด นาน 15 วัน แล้ววิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ พบว่าปัจจัยที่ระดับต่างกันมีผลต่อการเจริญของเชื้อราแตกต่างกัน ($p<0.01$) การเจริญของเชื้อราเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และเมื่อความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจน 10-20% การเจริญของ *A. flavus* ถูกยับยั้ง เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ในทุกตัวอย่างเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส โดยไม่คำนึงถึงสภาพบรรยากาศที่เก็บรักษา แสดงว่า *A. flavus* สามารถเจริญได้ในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงสรุปได้ว่าเมื่อใช้ปัจจัยต่างๆ ร่วมกันในการเก็บรักษาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หรือลดปริมาณอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ที่มีการดัดแปลงบรรยากาศในบรรจุภัณฑ์เพื่อให้เกิดความปลอดภัยและมีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (<20 ส่วนต่อพันล้านส่วน)

ต่อมา Ellis *et al.* (1994a) ศึกษาการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินจาก *A. flavus* ในถั่วลิสงที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่มีการดัดแปลงสภาพบรรยากาศ โดยศึกษาผลของการใช้ปัจจัยรวมกัน 3 ปัจจัยๆ ละ 5 ระดับ คือ $a_w$ (0.91, 0.92, 0.94, 0.96 และ 0.97) อุณหภูมิที่เก็บรักษา (16.6, 20.0, 25.0, 30.0 และ 33.4 องศาเซลเซียส) และปริมาณก๊าซออกซิเจนในบรรจุภัณฑ์ (1.6, 5.0, 10.0, 15.0 และ 18.4% ปริมาตร/ปริมาตร) โดยใช้ตัวอย่างถั่วลิสงที่ปราศจากเชื้อ พบว่า ทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) โดยการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้นในช่วงสัปดาห์แรกที่เก็บรักษา และภาวะที่ทำให้เชื้อราเจริญได้มากที่สุดในถั่วลิสง คือมีค่า $a_w$ เท่ากับ 0.97 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และในบรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10% และภายหลังเก็บรักษาไว้นาน 21 วัน เชื้อราผลิตอะฟลาทอกซินได้มากที่สุดที่ $a_w$ เท่ากับ 0.94 ในภาวะที่มีอุณหภูมิในการเก็บรักษาและปริมาณก๊าซออกซิเจนเท่ากัน

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าบรรจุภัณฑ์หรือภาวะการเก็บรักษาที่มีการดัดแปลงสภาพบรรยากาศ มีผลต่อทั้งการเจริญของเชื้อราและการผลิตอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง และผลของอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาและภาวะแวดล้อมอื่น โดยเฉพาะค่า $a_w$ และปริมาณก๊าซออกซิเจนในบรรยากาศก็เป็นปัจจัยสำคัญ การเก็บรักษาในภาวะที่มี $a_w$ ต่ำและปริมาณก๊าซออกซิเจนน้อยกว่า 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการผลิตอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงได้ อย่างไรก็ตาม ในการควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจนในบรรจุภัณฑ์ร่วมกับการควบคุม $a_w$ สามารถทำได้ง่ายและให้ผลดีกว่าการควบคุม $a_w$ เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า การใช้บรรจุภัณฑ์ที่ป้องกันการซึมผ่านเข้าออกของก๊าซออกซิเจนได้ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินได้ แต่ถ้าใช้ร่วมกับปัจจัยอื่น เช่น $a_w$ และอุณหภูมิที่เก็บรักษาก็จะให้ผลดีเช่นเดียวกัน ซึ่งเทคโนโลยีนี้ทำได้ง่ายและมีต้นทุนต่ำ (Ellis *et al.*, 1994a)

ในปีเดียวกัน Ellis *et al.* (1994b) ศึกษาเทคนิคใหม่ที่ใช้ควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินโดย *A. parasiticus* ในถั่วลิสงที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่ดัดแปลงสภาพบรรยากาศ โดยใส่สารดูดซับก๊าซออกซิเจน ควบคุมอุณหภูมิที่เก็บรักษา และลักษณะของฟิล์มบรรจุภัณฑ์ พบว่าการเจริญของเชื้อราที่มองเห็นได้มีน้อยมากในถั่วลิสงที่เป็นอากาศในบรรจุภัณฑ์ โดยวัสดุของบรรจุภัณฑ์เป็นฟิล์ม 2 ชนิด คือ ฟิล์มที่อัตราการผ่านเข้าออกของก๊าซได้สูง (ASI) และฟิล์มที่มีอัตราการผ่านเข้าออกของก๊าซได้ต่ำ (ASIII) แต่ภาวะของบรรยากาศภายในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดเหมือนกัน จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อราของถั่วลิสงในบรรจุภัณฑ์ นอกจากนี้ยังศึกษาการใช้สารดูดซับก๊าซออกซิเจน 2 ชนิด คือ Ageless type S และ G ใส่ในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด แล้วเก็บรักษาอุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าถั่วลิสงที่บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์ที่เป็นฟิล์มชนิด ASI และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ มากกว่าที่กฎหมายกำหนดไว้ (20 ส่วนต่อพันล้านส่วน) และพบอะฟลาทอกซินมีปริมาณมากที่สุด (52.95 ส่วนต่อพันล้านส่วน) ในถั่วลิสงที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่เป็นฟิล์มชนิด ASIII และยังพบอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ทั้งหมดที่มีสารดูดซับออกซิเจน แต่มีปริมาณน้อยกว่าที่กฎหมายกำหนด นอกจากนี้การบรรจุถั่วลิสงด้วยฟิล์มชนิด ASIII ทำให้เกิดสีที่ไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส และเกิดขึ้นมากกว่าบรรจุภัณฑ์ที่เป็นฟิล์มชนิด ASI ดังนั้นผลการใช้เทคโนโลยีที่มีสารดูดซับออกซิเจนนี้เป็นสิ่งที่ง่าย และมีผลต่อการควบคุมการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน นอกจากนี้ผลของการใช้สารดูดซับก๊าซออกซิเจนยังขึ้นอยู่กับสมบัติของฟิล์มบรรจุภัณฑ์ที่ป้องกันการผ่านเข้าออกของก๊าซรอบๆ ผลิตภัณฑ์ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hilmy *et al.* (1995) ศึกษาถึงผลของความชื้นสัมพัทธ์หลังจากฉายรังสีต่อการผลิตอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ของ *A. flavus* ในลูกจันทน์เทศและถั่วลิสง โดยศึกษาผลของความชื้นสัมพัทธ์ช่วง 75-97% และการผลิตอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ที่แยกจาก *A. flavus* ปริมาณรังสีที่ให้ต่อครั้งมี 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1 และ 3 kGy ตรวจพบอะฟลาทอกซินหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 วัน ถึง 5 เดือน ที่ภาวะความชื้นสัมพัทธ์ 91 และ 97% จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยใช้ HPLC พบว่า *A. flavus* ไม่สามารถเจริญหรือส่วนใหญ่เจริญไม่ได้เมื่อมีความชื้นสัมพัทธ์น้อยกว่า 85% หากมีความชื้นสัมพัทธ์ 91-97% การเจริญของไมซีเลียมและการผลิตสารพิษถูกยับยั้งได้เมื่อได้รับการฉายรังสี 1 kGy สำหรับการฉายรังสี 3 kGy หรือมากกว่าสามารถยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมและการผลิตสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ และการผลิตอะฟลาทอกซินในลูกจันทน์เทศเกิดขึ้นหลังจากบ่มนาน 25 และ 45 วัน ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 97% สำหรับในถั่วลิสงเริ่มผลิตอะฟลาทอกซินหลังจากบ่มนาน 3 และ 6 วัน ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 91% ตามลำดับ

Oyebanji และ Efiuvwevwere (1999) ศึกษาการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค และการผลิตอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ ในข้าวโพด ซึ่งมีการปนเปื้อนตามธรรมชาติหรือปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อและศึกษาอิทธิพลของปริมาณความชื้นในเขตร้อน โดยใช้ตัวอย่างข้าวโพดพันธุ์ TSZB ทำให้มีปริมาณความชื้นที่แตกต่างกันเป็น 13, 15, 17, 20, 25, 30 และ 35% แล้วเก็บรักษาไว้ในถุงโพลีเอทิลีนที่อุณหภูมิห้อง (28±3 องศาเซลเซียส) นาน 180 วัน สุ่มตัวอย่างออกมาหาปริมาณความชื้น ตรวจหาเชื้อราเริ่มต้น ปริมาณเชื้อราระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธี pour plate และแยกเชื้อราแต่ละชนิด และวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด $B_1$ โดยใช้ TLC โดยใช้ตัวอย่างเชื้อ คือ *A. flavus, A. niger, Penicillium purpurogenum* และ *Fusarium moniliforme* ทั้งชนิดเดี่ยวและหลายชนิดรวมกัน ผลการทดลองพบว่าในตัวอย่างข้าวโพดที่มีความชื้น 13% ปริมาณของเชื้อราเกิดขึ้นได้เล็กน้อย ส่วนตัวอย่างที่มีความชื้นที่ 17 และ 20% มีปริมาณเชื้อราเพิ่มมากขึ้น โดยมีมากที่สุด 7 โคโลนีต่อกรัม ข้าวโพดที่มีความชื้นมากกว่าหรือเท่ากับ 20% มีปริมาณอะฟลาทอกซินในระดับที่เป็นอันตราย (มากกว่า 20 ส่วนต่อพันล้านส่วน) การเพิ่มความชื้นตั้งแต่ 13, 15, 17 จนถึง 20% พบว่า ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อราที่เพิ่มขึ้นด้วย สำหรับตัวอย่างข้าวโพดที่มีความชื้นต่ำ (13, 15 และ 17%) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มของเชื้อราน้อย ตัวอย่างข้าวโพดที่มีความชื้น 25% มีการเพิ่มขึ้นของ *A. flavus* ที่เพาะเชื้อลงไป ส่วนตัวอย่างข้าวโพดที่มีการเพาะเชื้อหลายชนิดมีผลทำให้ *A. flavus* ลดลง ดังเช่นตัวอย่างที่เพาะเลี้ยง *A. flavus* ร่วมกับ *P. purpurogenum* มีปริมาณอะฟลาทอกซินต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นจากการเพาะเชื้อราเพียงชนิดเดียวที่เป็นตัวควบคุม ในระยะเริ่มต้นของการเก็บรักษามีความชื้นมากกว่า 20% การเจริญของเชื้อราเกิดขึ้นมากที่สุดโดยเฉพาะ *A. flavus* ขณะที่เชื้อรา *F. moniliforme* มีปริมาณมากที่สุดในตัวอย่างข้าวโพดที่มีความชื้น 35%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved