บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงปริมาณอะฟลาทอกซินในพริกแห้งป่น ซึ่งผู้ทำการศึกษาได้ค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องด้านประวัติของพริก ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริก สารพิษจากเชื้อรา เชื้อราที่สร้างสารไมโคทอกซิน ไมโคทอกซินในอาหาร ความเป็นพิษของไมโคทอกซิน ชนิดของไมโคทอกซิน ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราในอาหารที่ถูกทำให้แห้ง ปัญหาสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา ประวัติของอะฟลาทอกซิน คุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน อันตรายของสารอะฟลาทอกซิน การทำลายสารอะฟลาทอกซิน วิธีการควบคุมเชื้อราเพื่อลดอันตรายจากอะฟลาทอกซินในอาหาร ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารและมาตรฐานอาหาร และหลักการของการวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินโดยวิธีการ ELISA

2.1 ประวัติของพริก

Safford (1926) (อ้างใน มณีฉัตร นิกรพันธุ์ 2541) ให้ข้อมูลไว้ว่า พริกมีแหล่งกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอเมริกา แถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และมีผู้พบผลของพริกในหลุมฝังศพที่มีอายุถึง 2,000 ปี ณ ประเทศเปรู พริกถูกนำไปเผยแพร่ในประเทศสเปนในสมัยโคลัมบัส ค.ศ. 1493 หลังจากนั้นได้กระจายไปยังประเทศต่าง ๆ แถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและประเทศอังกฤษ ต่อมาชาวสเปนและชาวโปรตุเกส เป็นผู้นำมาเผยแพร่ที่เอเชีย ในประเทศอินเดียมีพริกปลูกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1542 อ้างใน Heisr. (1976) สำหรับในประเทศไทยเข้าใจว่าพริกถูกนำเข้าประเทศโดยชาวโปรตุเกส เป็นเวลาหลายร้อยปีแล้ว

พริกมีหลายชนิด เช่น พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า พริกกลาง มีแหล่งปลูกในแถบร้อน ใช้ในการบริโภคภายในประเทศและแปรรูปส่งออกไปต่างประเทศ ในรูปแบบที่เป็นพริกแห้งหรือพริกสดแปรรูปบรรจุกระป๋อง

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการโดยเฉลี่ยของพริก(ต่อส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม)

ส่วนประกอบ	พริกสดเขียว	พริกสดแดง	พริกสด	พริกแห้ง
น้ำ (cc.)	93.3	90.0	90.0	8.0
พลังงาน(Kcal)	23.0	32.0	-	-
โปรตีน (g)	0.7	0.5	2.0	15.0
ไขมัน (g)	0.2	0.3	0.5	11.0
คาร์โบไฮเดรต (g)	5.4	7.8	6.0	33.0
เส้นใย (g)	1.5	1.6	1.0	25.0
ขี้เถ้า (g)	0.4	0.5	-	-
แคลเซี่ยม (mg)	12.0	29.0	20.0	150.0
เหล็ก (mg)	0.6	0.8	1.0	9.0
ไทอามีน (mg)	0.05	0.05	0.06	0.6
ไรโบฟลาวิน (mg)	0.05	0.06	0.06	0.5
ไนอาซีน (mg)	0.5	0.9	-	-
วิตามินซี (mg)	4.0	18.0	150.0	10.0
ฟอสเฟต (mg)	18.0	45.0	-	-
โพแทสเซี่ยม (mg)	170.0	-	-	-
โซเดียม (mg)	8.0	-	-	-

ที่มา : สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคตะวันตก กรมส่งเสริมการเกษตร อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี (2532)

2. 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มณีฉัตร นิกรพันธุ์ (2541) ระบุไว้ว่า พริกมีแหล่งกำเนิดในอเมริกาเขตร้อน ตั้งแต่ก่อนที่โคลัมบัสพบทวีปอเมริกา พันธุ์พริกที่ปลูกในปัจจุบันถูกนำมาจาก ตัวอย่างพริกที่เก็บมาเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการกระจายตัวของพันธุกรรมในธรรมชาติ พริกพันธุ์ที่ปลูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ *Capsicum baccatum Capsicum Pubescens Ruiz.* และ *Capsicum Pubescens Pavon.* ซึ่งแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ และอีกกลุ่มหนึ่งที่รวมกันอยู่ 3 ชนิด คือ *Capsicum annuum L., Capsicum frutesens L.* และ *Capsicum chinense Jacq* อธิบายแยกได้ดังนี้

Capsicum annuum L.

ในประเทศไทยพบว่าพริกสายพันธุ์ *Capsicum annuum* มี 31 สายพันธุ์ มีดอกเดี่ยว ผลเดี่ยว และมีกลีบดอกสีขาว เป็นพริกที่ปลูกมากที่สุดในสายพันธุ์ต่าง ๆ ชื่อสายพันธ์ที่เรียกตามชื่อพันธุ์พื้นเมืองคือ พริกชี้ฟ้า พริกชี้ฟ้าใหญ่ พริกจินดา พริกแดง พริกฟักทอง พริกขี้หนู พริกหวาน พริกยักษ์

Capsicum frutesens L.

พริกสายพันธุ์ *Capsicum frutesens* มี 3 สายพันธุ์ มีดอก 2- 3 ดอกในหนึ่งช่อดอก ผลเล็ก มีความเผ็ดมาก เป็นพริกที่ปลูกรองลงมาจากสายพันธุ์ *Capsicum annuum* ชื่อสายพันธ์ที่เรียกตามชื่อพันธุ์พื้นเมืองคือ พริกชี้ฟ้า พริกเกษตร พริกขาว

Capsicum chinense Jacq

พริกสายพันธุ์ มี *Capsicum chinense Jacq* 18 สายพันธุ์ มีดอก 2 ดอกในหนึ่งช่อดอก มีผลใหญ่ เนื้อหนา รับประทานสด พริกที่เนื้อบางใช้ทำพริกแห้ง มีรสเผ็ดมากที่สุด เป็นพริกที่ปลูกรองลงมาจากสายพันธุ์ *Capsicum annuum* ชื่อสายพันธ์ที่เรียกตามชื่อพันธุ์พื้นเมืองคือ พริกชี้ฟ้า พริกกลาง พริกขี้หนูแดง พริกเล็บมือนาง พริกสวน พริกใหญ่

2.3 สารพิษจากเชื้อรา

สารพิษจากเชื้อรา เรียกว่า ไมโคทอกซิน (mycotoxin) เป็นสารประกอบที่เชื้อราผลิตขึ้นมา สารนี้อาจจะเป็นพิษหรือทำให้เกิดผลร้ายต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยเฉพาะสัตว์ และคนได้ Mykes เป็นภาษากรีก หมายถึง fungus และ toxicum เป็นภาษาลาติน หมายถึง Poison หรือ toxin เมื่อรวมกันเป็น mycotoxins จึงมีความหมายว่า fungus poison หรือ fungus toxin สารพิษจากเชื้อรามีผลทำให้เกิดพิษได้อย่างเฉียบพลันหรือต้องใช้ระยะเวลาช่วงหนึ่งจึงแสดงพิษต่อสัตว์ สารพิษบางชนิดอาจทำให้เกิดมะเร็ง บางชนิดอาจทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์กับสิ่งมีชีวิต หรืออาจทำให้เกิดความผิดปกติระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนมีรูปร่างผิดปกติ การเกิดพิษจะเกิดขึ้นเมื่อบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา หรือนำอาหารที่มีสารพิษจากเชื้อราไปเลี้ยงสัตว์ก็อาจทำให้เกิดพิษได้เช่นเดียวกัน การเกิดพิษจากเชื้อรา เรียกว่า ไมโคทอกซิโคซิส (mycotoxicosis)

2.4 เชื้อราที่สร้างไมโคทอกซิน

เชื้อราเป็นจำนวนมากที่สามารถสร้างไมโคทอกซินได้ และปนเปื้อนอยู่ในอาหารและผลิตผลทางการเกษตร ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดของเชื้อรา ชนิดของอาหาร และไมโคทอกซิน ที่ผลิตขึ้น ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารหลายชนิด ภายใต้สภาวะเหมาะสมเช่น ความชื้น อุณหภูมิ และความเป็นกรด - ด่าง ที่แตกต่างกัน อาหารส่วนมากมีเชื้อราปนเปื้อนและมีการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร ก็จะมีโอกาสทำให้เชื้อราสร้างไมโคทอกซินปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ตัวอย่าง

อาหารที่มีเชื้อราเจริญได้ดี เช่น ถั่วต่าง ๆ ธัญพืช เนยแข็ง ขนมปัง น้ำผลไม้ แยม โยเกิร์ต ครีม และเนื้อหมัก

ตารางที่ 2.2 สารพิษไมโคทอกซินจากเชื้อรา

ชื่อเชื้อรา	สารพิษ	พิษเฉียบพลัน	ผลร้ายที่เกิดขึ้น	แหล่งอาหารที่พบ
Claviceps prupurea	Ergot alkaloids		Ergotism	ข้าวไรย์และข้าวสาลี
Aspergillus flavus	Aflatoxin	7.2 mg. / kg.	มะเร็งตับ	ถั่วลิสง ข้าวโพด
A. parasiticus		(หนู ทางปาก)	ตับแข็ง	ธัญพืช อาหารสัตว์ และน้ำนม
A.versicolor	สเตอริกมาโตซิสติน	120 mg. / kg.	มะเร็งตับ	ข้าวโพด ข้าวสาลี
A . nidulans		(หนู ทางปาก)		และอาหารสัตว์
Penicillium espansum	พาทูลิน	35 mg. / kg.	เซลล์ตาย	น้ำผลไม้
P. urtiace		(หนู ทางปาก)		ธัญพืช
Byssochlamis nivea				
B. fulva				
A. ochraceus	โอคราทอกซินเอ	20 mg. / kg.	ไขมันดั่งที่ตับและ	ข้าวบาร์เลย์และ
A. meqwlleus		(หนู ทางปาก)	ไตอักเสบ	ข้าวโพด
Fusarium	ซีราลีโนน	0.1 mg. / kg.	เอสโตรเจน	
Graminearum	(ฟูซาริโอทอกซิน F_2)	นาน 5 วัน	เป็นหมัน	ข้าวโพด ธัญพืช
		(ท่าน ทางปาก)		และอาหารสัตว์
Fusarium oxysporum	ฟูซาริโอทอกซิน T_2	3.8 mg. / kg.	เม็ดเลือดขาวน้อย	ธัญพืชและอาหารสัตว์
F. tricinctum		(หนู ทางปาก)	มีจ้ำเลือด	

ที่มา : นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์ (2543)

เมื่อมีเชื้อราชนิดที่สร้างสารพิษปนเปื้อนอยู่ในอาหารไม่จำเป็นจะต้องมีไมโคทอกซินเกิดขึ้นเสมอไป โดยเฉพาะเมื่อเชื้อรานั้นยังไม่ได้เจริญในอาหาร แต่ก็มีแนวโน้มที่อาจจะมี ไมโคทอกซินปนเปื้อนอยู่ได้ ในทางตรงข้ามหากอาหารนั้นตรวจแล้วไม่พบว่ามีเชื้อราชนิดที่สร้างสารพิษ ก็ไม่สามารถรับรองได้ว่าอาหารนั้นจะปราศจากไมโคทอกซิน เพราะสารพิษอาจยังมีเหลืออยู่แต่เชื้อราได้ถูกทำลายหรือตายไปแล้วก็ได้ นอกจากนั้นไมโคทอกซินบางชนิดอาจถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ผลผลิตยังอยู่ในแปลงปลูกก่อนการเก็บเกี่ยว และยังคงติดมาหรือปนเปื้อนอยู่กับผลผลิต

สารพิษจากเชื้อราโดยทั่วเป็นแบบเมแทบอลีซึมทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) ที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญเติบโต (Growth Phase) ช่วงสุดท้ายของเชื้อรา ส่วนเมแทบอลีซึมปฐมภูมิ (Primary Metabolite)เป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต แต่ในกรณีของอะฟลาทอกซินนี้ จะถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโต

2.5 ไมโคทอกซินในอาหาร

เมื่อนำเชื้อราที่ผลิตสารพิษไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบว่ามีสารชนิดต่าง ๆ ถูกสังเคราะห์ขึ้นมามากมายหลายชนิด บางชนิดก็ทำให้เกิดโรคต่อคนและ/หรือสัตว์ บางชนิดก็ไม่เป็นอันตราย สำหรับไมโคทอกซินชนิดที่มีอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารพบว่ามีอยู่ 13 ชนิด คืออะฟลาทอกซิน ซีราเลโนน ซีราเลนอล ไตรโคเรซีน โอคราทอกซิน ซิตรินิน กรดเพนิซิลลิก พาทูลิน สเตอริกมาโตซิสติน แอลเทอนาริออลเมทิลอีเทอร์ กรดไมโคฟีนอลิก เพนิเทรม เอ และพีอาร์ทอกซิน

อะฟลาทอกซินและไตรโคเรซีน เป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกี่ยวข้องกัน ไมโคทอกซิน ที่พบได้เสมอ ๆ ในอาหารมี 9 ชนิด คือ Aflatoxin B_1 Aflatoxin G_1 Aflatoxin M_1 ซีราลีโนน โอคราทอกซิน เอ พาทูลิน กรดเพนิซิลลิก นิวาเลนอล และดีออกซีนิวาเลนอล ไมโคทอกซินเหล่านี้ ส่วนใหญ่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus* , *Penicillium* และ *Fusarium* สารพิษที่เชื้อรา ผลิตขึ้นเป็นสารที่เป็นอันตรายและพบได้ในอาหารซึ่งอาจมีสาเหตุ ดังนี้

1. ไมโคทอกซิน ที่ทนต่อความร้อนและทนต่อกระบวนการแปรรูปอาหารต่าง ๆ
2. ไมโคทอกซิน สามารถถูกสร้างขึ้นและปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ตั้งแต่ระหว่างการปลูก การเก็บเกี่ยวหรือหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งทำให้มีไมโคทอกซินแพร่กระจายไปในอาหารได้ เช่น อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง หอมแดง กระเทียม เป็นต้น
3. ไมโคทอกซิน ในอาหารสามารถทำให้เกิดโรคหรือทำให้เกิดพิษ ซึ่งอาจเป็นพิษเรื้อรังหรือพิษเฉียบพลันขึ้นอยู่กับปริมาณ ระยะเวลา และช่องทางที่ได้รับสารพิษ
4. ไมโคทอกซินบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น Aflatoxin B_1 ทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ

2.6 ความเป็นพิษของไมโคทอกซิน

การที่จะบ่งชี้ว่าสารใดเป็นสารก่อมะเร็งต่อคน จะต้องพิจารณาจากข้อมูลดังต่อไปนี้

1. การศึกษาทางระบาดวิทยาในประชากรที่เป็นมะเร็ง
2. มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง
3. มีการทดสอบว่าในหลอดทดลองที่ชี้บ่งว่าสารนั้นมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่โมเลกุล DNA

4. มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารก่อมะเร็งที่ทราบแน่ชัดแล้วแต่การพิจารณาจากสูตรโครงสร้างทางเคมีสำหรับไมโคทอกซินว่าจะเป็นสารก่อมะเร็งหรือไม่โดยวิธีนี้ค่อนข้างยาก เพราะไมโคทอกซินแต่ละชนิดมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเฉพาะและแตกต่างกันจึงอาจทำให้มีความเป็นพิษต่อสิ่งที่มีชีวิตแตกต่างกันด้วย

ความสามารถของสารเคมีที่จะทำให้เกิดมะเร็งหรือทำให้เกิดเนื้องอกได้ในสัตว์ทดลองจะเป็นตัวบ่งชี้แนวโน้มของสารเคมีชนิดนั้นที่จะทำให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็งในคน

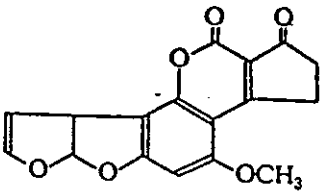
จุดเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งส่วนใหญ่มักจะเริ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ ดังนั้นการทดสอบเบื้องต้นว่าสารใดสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ จะถูกจัดว่ามีความสามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ นอกจากนี้ การเกิดมะเร็งยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น สารเร่งการเกิดมะเร็ง (cancer promoter) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดมะเร็ง ดังนั้นการที่จะสรุปว่าไมโคทอกซินชนิดใดเป็นสารก่อมะเร็งจะต้องอาศัยผลการศึกษาในสัตว์ทดลองและทางระบาดวิทยาร่วมด้วย

2.7 ชนิดของไมโคทอกซิน

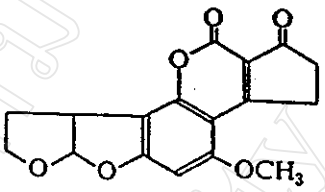
อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* บางสายพันธุ์ สารอะฟลาทอกซินมีหลายชนิด ได้แก่ B_1 B_2 G_1 G_2 M_1 และ M_2 สาร Aflatoxin M นี้เป็นอนุพันธ์ไฮดรอกซี ของชนิด B_1 ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจากน้ำนมของสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่จึงได้ชื่อว่า เอ็ม (M) สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซิน แต่ละชนิดมี ดังรูปที่ 2.1

อะฟลาทอกซินแต่ละชนิดเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตได้แตกต่างกัน คือ Aflatoxin B เรืองแสงให้สีน้ำเงิน (blue) ชนิด G เรืองแสงสีเขียว (green) และชนิด M เรืองแสงให้สีม่วง (violet) และอะฟลาทอกซินทนความร้อนได้ถึง 260 องศาเซลเซียส วิธีกำจัดสารนี้ออกทำได้โดยสารละลายด่างความเข้มข้นร้อยละ 2 หรือสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 6 หรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ร้อยละ 5

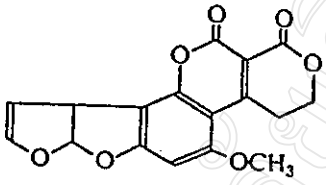
Aflatoxin B_2 เป็นอนุพันธ์ที่อยู่ในรูป 2,3 – ไดไฮโดรของ Aflatoxin B_1 และ Aflatoxin G_2 เป็นอนุพันธ์ที่อยู่ในรูป 2,3- ไดไฮโดรของ Aflatoxin G_1 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนี้ $B_1 > M_1 > G_1 > B_2 > M_2 \neq G_2$



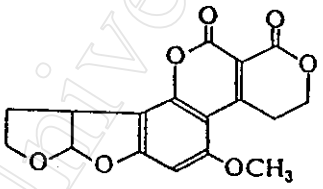
อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง



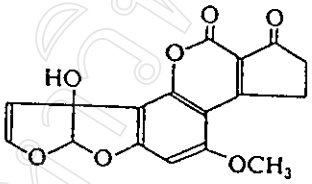
อะฟลาทอกซินบีสอง



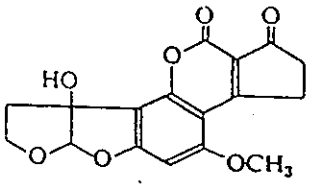
อะฟลาทอกซินจีหนึ่ง



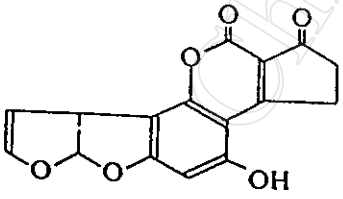
อะฟลาทอกซินจีสอง



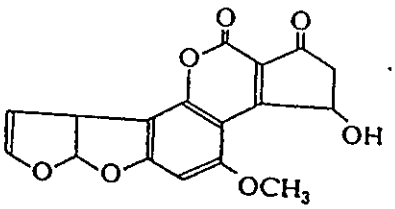
อะฟลาทอกซินเอ็มหนึ่ง



อะฟลาทอกซินเอ็มสอง



อะฟลาทอกซินพีหนึ่ง



อะฟลาทอกซินคิวหนึ่ง

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ

ที่มา : นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์ (2543).

การเจริญเติบโตของ เชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ไม่จำเป็นต้องสร้างอะฟลาทอกซินเสมอไป ขึ้นอยู่กับสภาวะระหว่างการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด - ด่าง (pH) และค่า water activity (a_w) ตัวอย่างเช่น เมื่อให้เชื้อราชนิดนี้เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7.5 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส พบว่าจะไม่มีการสร้างอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นเลย เชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส pH 5 และ a_w 0.99 ส่วนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสจะเจริญได้เมื่อมี a_w เป็น 0.95 และไม่เจริญเมื่อค่า a_w ลดลงเหลือ 0.90 แต่ที่อุณหภูมิช่วง 27 – 33 องศาเซลเซียส จะเจริญได้บ้างเมื่อค่า a_w เป็น 0.85 หรือมากกว่า

ผลการทดลองวัดปริมาณสารพิษพบว่าเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เจริญได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสแต่ผลิตสารพิษได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารพิษอยู่ในช่วง 24 - 28 องศาเซลเซียส

อะฟลาทอกซินชนิด G_1 สามารถถูกสร้างได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า ชนิด B_1 และที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส จะสร้างชนิด B_1 มากกว่า G_1 การสังเคราะห์อะฟลาทอกซินสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยคาเฟอีน เนื่องจากคาเฟอีนไปยับยั้งการนำเข้าของคาร์โบไฮเดรตทำให้เชื้อราผลิตพลังงานได้น้อยลง เพราะการที่เชื้อรา *Aspergillus flavus* จะปล่อยอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ออกมาได้ต้องอาศัยพลังงานด้วย

การเจริญของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง จะเกิดขึ้นระหว่างการผึ่งแห้งภายหลังจากที่ถอนต้นออกมาจากแปลงปลูกแล้ว ปริมาณตัวอย่างถั่วลิสงที่ใช้วิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินควรสุ่มมาอย่างน้อย 1 กิโลกรัม เพราะถั่วลิสงแต่ละเมล็ดจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินไม่เท่ากัน ส่วนการผลิตอะฟลาทอกซินบนข้าวโพดโดยเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* สามารถยับยั้งได้โดยโซเดียมไบคาร์บอเนตและจะมีการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้นเมื่อเติมวิตามินซีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราในอาหารที่ถูกทำให้แห้ง

1. ความชื้น เชื้อราจะไม่สามารถเจริญได้ ถ้าไม่มีความชื้นในปริมาณที่เหมาะสม เชื้อราจะมีค่า a_w ที่เหมาะสม หาก a_w ลดต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม อัตราการเจริญและการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของเชื้อราจะลดลง ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญของ เชื้อราส่วนใหญ่มีค่า ประมาณ 0.70 – 0.80

2. ความเป็นกรด – ด่าง (pH) ความเป็นกรด – ด่างของอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของเชื้อรา โดยทั่วไปเชื้อราจะทนดี ที่ความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงกลางถึงกรด คือ 4.5 – 6.8 อาหารส่วนใหญ่จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงดังกล่าว

3. อุณหภูมิ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา การเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อรา

ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ผลิตสารพิษได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารพิษอยู่ในช่วง 24 – 28 องศาเซลเซียส อ้างใน วิวัฒน์ หวังเจริญ (2538)

2.9 ปัญหาสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา

ในกรณีของผลิตภัณฑ์ที่มี a_w ต่ำ เช่น ธัญพืชต่าง ๆ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึงสารพิษจากเชื้อรา ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในธัญพืชดังกล่าว ซึ่งอาจมีตั้งแต่ในแปลงปลูกจนถึงช่วงของการเก็บรักษา โดยทั่วไปแล้วเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารพิษ ได้แก่ เชื้อรา ***Aspergilus*** , ***Fusarium*** และ ***Penicillium*** สำหรับสารพิษจากเชื้อราดังกล่าวหลายชนิด ดังรายชื่อดังนี้ คือ aflatoxin, ochratoxins , penicillic acid , patulin ergot , zearalenone , citrinin ,T - 2 , tenuazonic acid , Kojic acid และ sterigmatocystin โดยที่ aflatoxin , penicillic acid และ sterigmatocystin จัดเป็นสารที่ ก่อให้เกิดมะเร็งหรือ carcinogen ด้วย (Hesseltine , 1974) ถึงแม้ว่าอาหารแห้งจะเป็นกรรมวิธีหนึ่งในการถนอมอาหารที่สะดวกก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะเกิดการเสื่อมเสียของอาหารดังกล่าวยังคงมีอยู่ จึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมรักษาความสะอาดของแต่ละขั้นตอนการผลิต โดยเฉพาะขั้นตอนการรับวัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารแห้ง เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ตั้งแต่จุดเริ่มต้นเป็นสำคัญ ซึ่งจะทำให้อาหารแห้งนั้นมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานและปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

2.10 ประวัติของอะฟลาทอกซิน

Frazier (1988) (อ้างใน สุมณฑา วัฒนสินธุ์ 2543) ระบุไว้ว่า ประวัติความเป็นมาของอะฟลาทอกซิน เริ่มที่ประเทศอังกฤษ ในปี พ.ศ. 2503 กล่าวคือ ได้เกิดโรคระบาดสัตว์ มีผลทำให้ลูกเป็ด ไก่งวง และสัตว์เลี้ยงตายเป็นจำนวนมาก โดยสัตว์เลี้ยงมีอาการเบื่ออาหาร ปีกตก คออ่อนพับ ขาไม่มีกำลัง และตายในที่สุด เมื่อตรวจซากสัตว์พบว่ามีความผิดปกติที่ตับและไต จึงใช้ชื่อในขณะนั้นว่า โรค Turkey ต่อมาได้นำอาหารสัตว์ คือถั่วลิสงที่ส่งมาจากประเทศบราซิล ที่สงสัยว่าเป็นเหตุให้เกิดโรคมาตรวจทดลองในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อราในอาหารสัตว์นั้นถึง 27 ชนิด และ 1 ใน 3 ของจำนวนนั้นเป็นเชื้อราตระกูล *Aspergillus* ส่วนผลการทดลองทางเคมีพบว่า สารที่สกัดได้จากอาหารสัตว์ตัวอย่างเดียวกันนั้นเมื่อนำไปเลี้ยงสัตว์มีผลทำให้สัตว์ทดลองมีอาการเช่นเดียวกัน และเรียกสารพิษนี้ว่า "Aflatoxin" ต่อมาได้มีผู้ทำการวิจัยอะฟลาทอกซินจาก ถั่วลิสงประเทศต่าง ๆ และสรุปว่าอะฟลาทอกซินนั้น สามารถเกิดได้ในถั่วลิสงทุกประเทศ แม้แต่ถั่วลิสงจากสหรัฐอเมริกา

2.11 คุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน

M.T. Bartram (1969) อ้างใน พัฒน์ สุจำนงค์ (2537) ระบุไว้ว่าอะฟลาทอกซินเป็น Toxin หรือสารมีพิษที่เกิดจากเชื้อรามี ชื่อว่า เชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งคุณสมบัติในข้อนี้ได้นำมาใช้ในการทดสอบอะฟลาทอกซินที่พบในธรรมชาติแบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 ,G_2 ชนิด B_1 กับ B_2 ให้แสงเรืองสีน้ำเงินในแสง

อัลตราไวโอเลต ส่วน G_1 กับ G_2 ให้แสงเรืองสีเขียว Aflatoxin B_1 พบมากที่สุดและมีพิษรุนแรงที่สุด สารพิษชนิดนี้ทนต่อความร้อนได้สูงถึง 260 องศาเซลเซียส เชื้อราบางตัวในตระกูล *Aspergillus flavus* เมื่อเก็บไว้นาน ๆ และอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะสร้างสารพิษ เชื้อราเหล่านี้ต้องการความชื้นสูงกว่าเชื้อราชนิดอื่น ๆ เชื้อราจะเจริญได้ในที่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 – 85 สำหรับถั่วลิสงและความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 9 หรือร้อยละ 16 ในกากถั่ว ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอุณหภูมิที่สูงกว่า 26.6 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุนี้จึงพบสารพิษนี้ได้มากที่สุดในเขตร้อน เชื้อรานี้เมื่อเจริญเต็มที่อาจจะมีสีขาว สีเขียว สีเหลือง หรือคละกันไป แต่สำหรับสปอร์แล้วส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองอมเขียวหรือสีเหลือง ตามความเป็นจริง อะฟลาทอกซินเกิดขึ้นได้ภายใน 48 ชั่วโมงก่อนที่จะสังเกตเห็นว่าอาหารนั้น ๆ ขึ้นราขณะที่พืชผลการเกษตรกำลังเติบโตนั้น ไม่พบว่าเกิดเชื้อราชนิดที่ให้อะฟลาทอกซินทั้งที่ความชื้นในระยะนั้นสูงถึงร้อยะ 25 แต่ถ้าปล่อยทิ้งไว้จนเกินระยะเก็บเกี่ยวหรือระหว่างเก็บเกี่ยวจะพบสารพิษ อะฟลาทอกซินนี้ในถั่วที่เปลือกแตกหรือร้าวได้

2.12 อันตรายของอะฟลาทอกซิน

Amla และคณะ (อ้างใน พัฒน์ สุจำนงค์ 2537) กล่าวว่าอะฟลาทอกซินทำให้เกิดโรคในสัตว์ทดลองได้หลายแบบ ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ ปริมาณอาหารโปรตีนกับอาหารประเภทไขมัน ชนิดของสัตว์ทดลองและอายุ ถ้ายิ่งอายุน้อยจะยิ่งมีความไวต่ออะฟลาทอกซินสูง การทดลองในหนูพบว่าถ้าให้อะฟลาทอกซินแก่หนูที่ได้รับอาหารโปรตีนต่ำจะเกิดอาการเฉียบพลันเซลล์ตับถูกทำลายเปลี่ยนเป็นไขมัน เซลล์ท่อน้ำดีแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ถ้าหนูได้รับอาหารโปรตีนสูงเมื่อให้อะฟลาทอกซินจะไม่มีอาการรุนแรง แต่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์คล้ายกับมะเร็ง สำหรับการทดลองในเซลล์ตับ ไต ของคนหรือสัตว์ที่เพาะเลี้ยงไว้ พบว่า อะฟลาทอกซินปริมาณมากจะทำลายเซลล์ ถ้าปริมาณน้อยจะยับยั้งการสร้างโปรตีน การแบ่งตัวของเซลล์ทำให้เกิด Giant cells และ mutation ซึ่งเหตุผลข้อนี้ พอจะเป็นแนวแสดงให้เห็นว่าอะฟลาทอกซินจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งคนได้เช่นกัน นอกจากหนูแล้วได้พบว่าสัตว์เลี้ยงชนิดต่าง ๆ เช่น ลิง ม้า เก้ง ลา แกะ หมู สุนัข ไก่งวง ไก่ฟ้า เป็ดและปลาน้ำจืดบางชนิด ก็มีอาการเช่นเดียวกับหนูและพบว่า สัตว์ที่ได้เลี้ยงด้วยอาหารที่มี อะฟลาทอกซิน เป็นมะเร็งที่ตับถึงร้อยละ 68

สำหรับการศึกษาในคน โดย Reye เริ่มในปี พ.ศ. 2506 (อ้างใน พัฒน์ สุจำนงค์ 2537) ได้เรียกอาการป่วยของเด็กโดยไม่ทราบสาเหตุว่า Reye' s Syndrome ซึ่งมีอาการคล้ายอาการที่เกิดจากพิษของ Aflatoxin คือผู้ป่วยมีอาการไข้โคม่า ชัก หายใจลำบาก ตรวจพบน้ำตาลในเลือดต่ำ nonesterified fatty acid สูง น้ำไขสันหลังใสและปราศจากเชื้อ ศพของผู้ป่วยพบ Fatty degeneration ที่ตับ หัวใจสมองบวมและพบอาการปอดบวมรวมด้วย ในแอฟริกาพบอะฟลาทอกซินปริมาณสูงในอาหารถั่วและพบมะเร็งตับชนิด Heparoma สูงในอูกันดาและในบูกันดาแต่เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่า ส่วนใน

ประเทศอินเดีย Amla และคณะ (อ้างใน พัฒน์ สุจำนงค์ 2537) พบว่าเด็กที่ป่วยเพราะขาดอาหารโปรตีนหากบังเอิญได้รับอะฟลาทอกซิน ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันถั่วเป็นเวลาตั้งแต่ 5 วัน ถึง 4 สัปดาห์ ตับจะถูกทำลาย

เชื้อรา *Aspergillus flavus* มิใช่เชื้อราเพียงชนิดเดียวที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซิน เพียงแต่เป็นรา ชนิดแรกที่แยกพบอะฟลาทอกซินในอาหาร ปัจจุบันนี้พบว่ามีราหลายประเภทที่ให้ สารพิษได้เช่นกัน

ตารางที่ 2.3 ประเภทของเชื้อรา ซึ่งให้ อะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ

ประเภทของเชื้อรา	Aflatoxin ชนิดต่าง ๆ
Aspergillus flavus Link	B_1, G_1
A. flavus var. Columnaris	B_1, G_1
A. niger var . Tughen	B_1
A.ostianus Wehmer	B_1
A. parasilicum speare	B_1, G_1
A. ruber thom a church	B_1
A. wentii wehmer	B_1
Penicillium itrinum thom	B_1
P. trequentam westling	B_1
P. Puderulun Bainier	B_1 , G_1
P. variabile	B_1

ที่มา : พัฒน์ สุจำนงค์ (2537)

แต่ในอาหารส่วนใหญ่ที่ตรวจพบอะฟลาทอกซินนั้น พบว่าเป็นเชื้อราตระกูล *Aspergillus flavus Link* จากการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus species* ในห้องปฏิบัติการ พบว่าราชนิดนี้เจริญได้ดีใน Gzapek – Dox Agar , Agar ที่ใช้เลี้ยงเพื่อให้เกิดอะฟลาทอกซินนี้อาจจะเพิ่มอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต เช่น เพิ่มถั่วลิสง หรือมันฝรั่ง กลูโคสหรือไม่เพิ่มก็ให้ผลดีเช่นกัน จากความรู้ที่ได้ทำให้ทราบว่าเชื้อรา *Aspergillus species* เจริญได้ดีในอาหารที่มีความชื้นสูงแต่อย่างไรก็ตามในอาหารหรือ media ที่มีความชื้นต่ำหรืออาหารที่ค่อนข้างแห้ง ราชนิดนี้ก็เจริญได้ สภาวะเหมาะสมเกิดอะฟลาทอกซินได้สูงเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศประมาณร้อยละ 98 อุณหภูมิโดยเฉลี่ยระหว่าง 25 – 37 องศาเซลเซียส ส่วนอัตราการเกิดเป็น Aflatoxin B_1 หรือ Aflatoxin G_1 ขึ้นกับอุณหภูมิ ปริมาณอะฟลาทอกซินมีสูงสุดภายใน 7 วัน การเพิ่มออกซิเจนขนาด 9 มิลลิลิตร ใน 1 นาที หรือการเพิ่มโลหะธาตุบางชนิดในอาหาร เช่น Mg , Fe , Cd เป็นการเร่งสร้างอะฟลาทอกซินในทำนอง

เดียวกัน ถ้าเพิ่มน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ กลูโคสร้อยละ 15 , ไรโบส ร้อยละ 15 , ไซโลส ร้อยละ 15, ไกลเซอรีน ร้อยละ 15 ทำให้สาร Aflatoxin B_1 และ G_1 เกิดเร็วขึ้น แต่น้ำตาลแล็กโตส และสารบางชนิด ได้แก่ oleic acid , fumaric acid , sodium acetate , pyruvic, ethyl alcohol จะป้องกันไม่ให้เชื้อราสร้างสารอะฟลาทอกซินขึ้น

2.13 การทำลายสาร อะฟลาทอกซิน

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2543) กล่าวว่า อะฟลาทอกซินเป็นสารที่ทนต่อความร้อน ยากแก่การทำลายได้หมด สารเคมีบางชนิดเท่านั้นที่ทำลายได้ คือสารพวกโซดาไฟและไฮโปคลอไรด์ ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดคือ การป้องกันไม่ให้อะฟลาทอกซินเกิดขึ้น สารที่ยับยั้งการเกิดอะฟลาทอกซินในอาหารได้ดี คือ para aminobenzoic acid , sulfate และ potasssium fluoric Aflatoxin B_1 จะถูกทำลายเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 120 องศาเซลเซียส จากความรู้ข้อนี้จึงนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมผง ส่วนในอุตสาหกรรมน้ำมันพืช การใช้ Diatomaceous earth ร่วมกับความร้อน 85 องศาเซลเซียส จะทำให้น้ำมันปราศจาก อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็น Derivative ของ Cumarin ประกอบด้วย Furanring rings กับ cyclopentawon ring สำหรับ Aflatoxin B ส่วน Aflatoxin G เช่นเดียวกับ B เพียงแต่มีออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้ลดความเป็นพิษลงครึ่งหนึ่งของ Aflatoxin B ถ้า B_1 กับ G_1 ณ ตำแหน่งนอกของ Furan ring ถูกเพิ่ม hydrogen จึงเป็น B_2 และ G_2 Aflatoxin B_2 , G_2 ความเป็นพิษจะลดลง 4.5 เท่า ของ B_1 , G_1 แต่ถ้าเพิ่ม Hydrogen Group ให้ B_1 และ B_2 จะได้สารใหม่ คือ Aflatoxin M ซึ่ง Aflatoxin M นี้พบได้ในน้ำนมของสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซิน ซึ่งความเป็นพิษ ก็ยังคงมีอยู่

อะฟลาทอกซินละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ Methanol , Dimethy sulfoxide และ Chloroform ไม่ละลายใน Ether แต่ถูกทำลายใน Chromic sulfuric acid และโซดาไฟ ภายใต้แสง Ultraviolet (365 nm) อะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ จะเรืองแสง คุณสมบัติข้อนี้เรานำมาใช้ในการวินิจฉัย Aflatoxinในอาหาร เนื่องจาก อะฟลาทอกซินมีพิษร้ายแรง เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง จึงเป็นเหตุผลว่าผู้ที่จะทำงานปฏิบัติการในด้านนี้ต้องมีความรอบคอบระมัดระวังเป็นอย่างมาก เครื่องใช้ต่าง ๆ ต้องสะอาด การทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องใช้ต่าง ๆ ต้องล้างด้วยน้ำยาไฮโปคลอไรด์หรือ Chromic sulfuric acid แล้วจึงล้างน้ำจนสะอาด และล้างด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง ตัวอย่างที่ตรวจพบว่ามีอะฟลาทอกซินนั้นให้แยกใส่ถุงพลาสติกแล้วจึงทิ้ง ส่วนบริเวณที่ปฏิบัติงานให้ทำความสะอาดด้วยน้ำยาไฮโปคลอไรด์ เช่นกันเพื่อเป็นการป้องกันอันตรายอันอาจเกิดขึ้นกับผู้ที่ปฏิบัติงานผู้อื่นที่ทำงานร่วมกันและใช้เครื่องมือร่วมกัน

2.14 วิธีการควบคุมเชื้อราเพื่อลดอันตรายจากอะฟลาทอกซินในอาหาร

การควบคุมปัจจัยร่วมต่าง ๆ คืออุณหภูมิ ความชื้น Water Activity (a_w) pH และออกซิเจนที่ผิวหน้า และการใช้สารกำจัดเชื้อรา จากการวิจัยพบว่า การนำสารกำจัดเชื้อรา (fungicides) 4 ชนิดมาเติมลงในเมล็ดข้าวโพดและเมล็ดทานตะวัน ปรากฏว่าสารกำจัดเชื้อรา 2 ชนิด คือ Rizolex – T และ Vitavax Captan สามารถยับยั้งการเกิดอะฟลาทอกซิน จากการวิจัยใช้วัตถุเจือปนได้แก่ sodium chloride ร้อยละ 0.25 กับ Ammonium Peroxydisulfate ร้อยละ 0.25 คลุกกับเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อน Aflatoxin ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า Aflatoxin B_1 ลดลงจนตรวจไม่พบ สำหรับถั่วเมล็ดแห้งทดลองเติมโซเดียมซัลไฟต์ ร้อยละ 0.5 – 2.0 ต้มถั่วเมล็ดแห้งที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินนาน 1 ชั่วโมง เมื่อนำไปตรวจหาอะฟลาทอกซินภายหลังการต้ม ตรวจไม่พบ Aflatoxin B_1 และจากการหมักถั่วบางชนิดที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินตามกรรมวิธีผลิตอาหารพื้นบ้านของประเทศไนจีเรีย พบว่าสามารถลด Aflatoxin B_1 ลงได้ร้อยละ 71 การใช้แร่ยิบซับในแปลงเกษตร ในการเพาะปลูกถั่วลิสงใช้แร่ยิบซัม (gypsum) เติมลงในดินก่อนปลูกถั่วลิสง หลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว นำเมล็ดถั่วลิสงมาตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับแปลงเพาะปลูกที่ไม่มียิบซัม ปรากฏว่าถั่วลิสงที่ได้จากแปลงเพาะปลูกที่เติมแร่ยิบซัมมีอะฟลาทอกซินลดลงมาก (แปลงที่ใช้แร่ยิบซัมพบ 0.5 – 1.9 มิลลิกรัม/กรัม ส่วนแปลงควบคุมพบ 17.3 มิลลิกรัม/กรัม) การใช้ยากำจัดวัชพืช ผลการทดลองใช้ยากำจัดวัชพืชบางชนิดกับข้าวฟ่าง สามารถลดอะฟลาทอกซินในผลิตผลหลังเก็บเกี่ยวลงได้

2.15 การสลายตัวของสารอะฟลาทอกซินด้วยสารเจือปนอาหาร

เนตรนภิส วัฒนสุชาติ (2538)ได้ตรวจสอบการสลายตัวของสารอะฟลาทอกซินหลายชนิด ได้แก่ Aflatoxin B_1 ,Aflatoxin B_2 , Aflatoxin G_1 และ Aflatoxin G_2 ด้วยการใช้สารเจือปนอาหาร 3 กลุ่ม คือ

1. สารละลายของสารเจือปนที่เป็นกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

2. สารละลายของสารเจือปนที่เป็นด่าง เช่น โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โซเดียมคาร์บอเนต ($Na\,CO_3$) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โซเดียมซัลไฟต์ ($NaSO_3$) และ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ($NaHCl_2$)

3. สารละลายของสารเจือปนอาหารที่เป็นกลาง เช่น โปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ($K_2S_2O_5$) โซเดียมไบซัลไฟต์ ($NaHSO_3$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แอมโมเนียเปอร์ออกโซไดซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_4$) โปแตสเซียมโบรเมต ($K_2Br_2O_7$) โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_3$) ภายใต้สภาวะต่าง ๆ และศึกษา

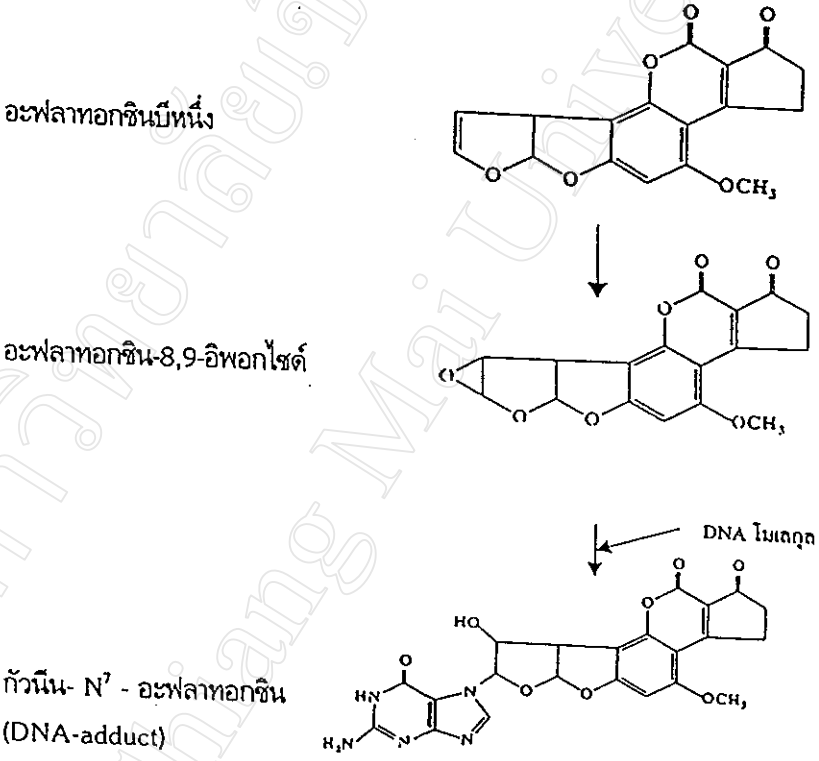
ผลของอุณหภูมิเวลา และความเข้มข้นของสารเจือปนอาหารต่อการสลายตัวของอะฟลาทอกซิน ผลการศึกษาพบว่า $K_2Br_2O_7$, KNO_3 และ $NaNO_3$ไม่มีผลต่ออะฟลาทอกซิน เมื่อเติมอะฟลาทอกซินในข้าวโพดและแช่ในสารละลาย $NaHSO_3$ (0.5% , 48 ชั่วโมง) พบว่า อะฟลาทอกซิน B_1 เหลืออยู่เพียง 20 % ขณะที่แช่ด้วย NaCl (0.5% pH 4 , 48 ชั่วโมง) และแช่ $(NH_4)_2S_2O_4$ (0.25% , 48 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สาร อะฟลาทอกซิน G_1ในเนยถั่ว (butter beans) และแช่ในสารละลาย $NaHSO_3$ 2 % และ 0.5% แล้วต้มให้เดือดพบว่าเหลือ อะฟลาทอกซิน B_1 ต่ำกว่า 5% และ 20% ตามลำดับ จากการศึกษานี้ สรุปได้ว่า สารอะฟลาทอกซินสามารถถูกทำลายได้ด้วยการใช้สารเจือปนอาหาร (Food Additives) ที่ใช้ในขบวนการผลิตแปรรูปอาหาร

2.16 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินพิษอย่างรุนแรงต่อตับของสัตว์ทุกชนิดและเป็นสารก่อมะเร็งต่อสัตว์บางชนิด Aflatoxin ชนิด B_1 มีความเป็นพิษรุนแรงที่สุด พิษของอะฟลาทอกซินต่อสัตว์ทดลองจะผันแปรไปตามชนิดของสัตว์ พันธุ์ ปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ รวมทั้งอาหารหรือภาวะโภชนาการของสัตว์ด้วย การได้รับสารพิษเป็นปริมาณมากอาจมีผลทำให้สัตว์ตายได้ (lethal dose) หากลดปริมาณให้น้อยลง (sub - lethal dose) จะทำให้เกิดพิษเรื้อรังและถ้าได้รับปริมาณต่ำ ๆ ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะมะเร็งที่ตับซึ่งเกิดขึ้นในสัตว์ทดลองที่มีอายุน้อยเมื่อได้รับสารอะฟลาทอกซินจะเกิดพิษขึ้นเฉียบพลันได้รวดเร็วกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัย

อะฟลาทอกซินไม่ได้เป็นสารก่อมะเร็งปฐมภูมิแต่จัดเป็นโปรมิวตาเจน (promutagen) และโปรทอกซิน (protoxin) คือจะต้องเกิดการเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลิซึมเสียก่อนจึงจะเปลี่ยนเป็นสารที่มีพิษและออกฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบว่าอะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ ปอด ไตและลำไส้ใหญ่ แต่ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ได้รับพิษของอะฟลาทอกซินไวที่สุด และทำให้เกิดมะเร็งที่เซลล์ตับ พิษเฉียบพลันของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ ดังตารางแสดงที่ 2.4 และ 2.5

กลไกการออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซินที่ทำให้เกิดมะเร็งตับ มีรายงานว่า Aflatoxin ชนิด B_1 สามารถเข้าไปที่นิวเคลียร์ของเซลล์ตับ ไปรวมกับดีเอ็นเอด้วยพันธะโควาเลนต์และจับกับดีเอ็นเอ ที่ไมโทคอนเดรียมากกว่าที่นิวเคลียสของเซลล์ตับ ผลการศึกษาทางชีวเคมีอธิบายได้ว่า Aflatoxin ชนิด B_1 ต้องการไมโครโซมและเอนซัยม์ เพื่อเปลี่ยน Aflatoxin ชนิด B_1 เป็น Aflatoxin - 8,9 – epoxide ซึ่งสามารถจับกับเบสกัวนีนในโมโลกุลของ ดีเอ็นเอ (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซินที่ทำให้เกิดมะเร็งตับ

ที่มา : นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์ (2543)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 2.4 ค่า LD_{50} ของ Aflatoxin ชนิดต่าง ๆ เมื่อให้แก่หนูทางช่องท้อง

ชนิดของAflatoxin	ปริมาณที่ฉีด (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)	จำนวนหนูที่ตายภายใน 14 วัน ต่อจำนวนที่ทดลอง
Aflatoxin B_1	2.0 - 3.0	6 / 6
	1.0 - 2.0	29 / 46
	0.7 - 0.9	0 / 20
Aflatoxin B_2	12.0 - 200.0	0 / 20
Aflatoxin G_1	3.0 - 10.0	54 / 54
	1.8 - 2.0	11 / 22
	1.9 - 1.5	0 / 19
Aflatoxin G_2	170 - 200	0 / 4

ที่มา: : นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์ (2543)

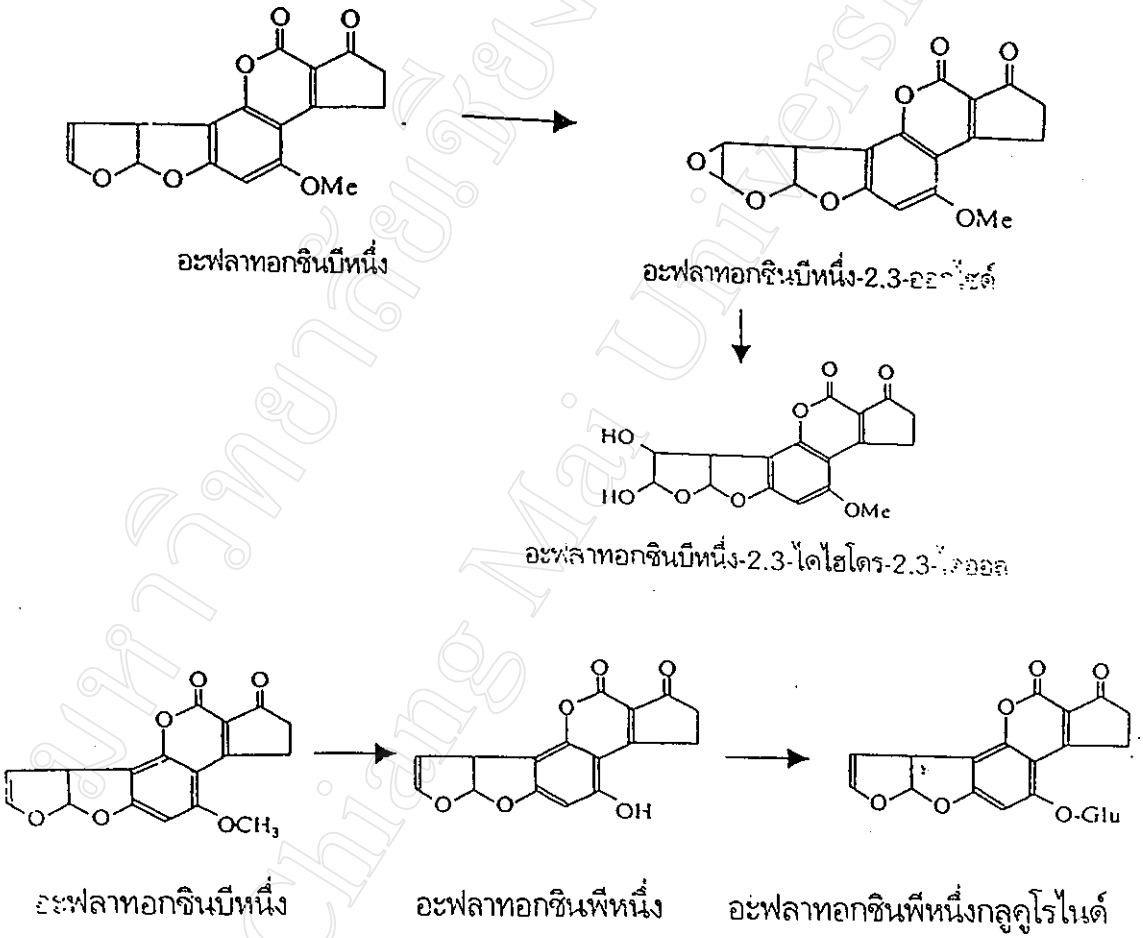
ตารางที่ 2.5 พิษเฉียบพลันของ Aflatoxin ต่อสัตว์ทดลองชนิดต่าง ๆ เมื่อให้ทางปาก

สัตว์ทดลอง	ค่า LD_{50} ของ Aflatoxin ชนิดต่าง ๆ (มิลลิกรัม / กิโลกรัมน้ำหนักตัว)					
	B_1	B_2	G_1	G_2	M_1	M_2
ลูกเป็ด	0.36	1.68	0.78	1.42	0.32	1.22
กระต่าย	0.30	-	-	-	-	-
แมว	0.55	-	-	-	-	-
สุกร	0.65	-	-	-	-	-
สุนัข	0.5 - 1.0	-	-	-	-	-
แกะ	1.0 - 2.0	-	-	-	-	-
หนูตะเภา	1.40	-	-	-	-	-
ลิง	2.2 - 7.8	-	-	-	-	-
ไก่	6.30	-	-	-	-	-

ที่มา : : นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์ (2543)

ในจำนวนชนิดของไมโคทอกซินทั้งหมดที่เชื้อราผลิตขึ้น อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่มีพิษรุนแรงที่สุด และเป็นสารก่อมะเร็งชนิดร้ายแรงด้วย อะฟลาทอกซินมีค่า LD_{50} ต่อลูกเป็ด 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หรือ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวสำหรับหนู สัตว์ที่มีขนาดใหญ่จะต้องใช้ในปริมาณอะฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้น แต่มีสัตว์บางประเภท เช่น แกะ และ สุกร ค่อนข้างจะทนต่อพิษของอะฟลาทอกซินได้มากกว่าสัตว์ชนิดอื่น สาเหตุการตายของสัตว์ทดลองเนื่องจากตับถูกทำลายเพราะความเป็นพิษของ อะฟลาทอกซิน ชนิด B_1 ทำให้เกิดมะเร็งตับมากที่สุด

เชื้อราชนิดที่สร้างอะฟลาทอกซินจะเจริญได้ดี ในสภาวะที่มีอุณหภูมิอบอุ่นและความชื้นสูงโดย เฉพาะในประเทศเขตร้อนและเขตอบอุ่น อะฟลาทอกซินพบมากในอาหารจำพวกถั่วลิสง เนยถั่วลิสง ถั่วลิสงป่น กากถั่วลิสง น้ำมันถั่วลิสง พริกป่น ข้าว และข้าวโพด นอกจากนั้นอะฟลาทอกซินยังเคลื่อนย้ายได้จากที่ปนเปื้อนด้วย Aflatoxin B จะถูกเมแทบอลึซึมได้เป็น Aflatoxin M ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เช่นเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลึซึมของ Aflatoxin B_1 ในโมเลกุลของอะฟลาทอกซิน ส่วนของโมเลกุลที่ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ คือ พันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ที่เป็นส่วน ไดไฮโดรฟูโรฟูแรน (dihydrofurofuran) เมื่อถูกรีดิวส์เป็นอนุพันธ์ 2,3 ไดไฮโดรของ Aflatoxin B_2 จะมีผลทำให้ความสามารถในการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ลดลง 200 - 500 เท่า ส่วนเมแทบอลิซึมของ Aflatoxin B_1 จะถูกขับออกมาในปัสสาวะในรูป Aflatoxin P_1 กลูคูโรไนด์ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลึซึมของ Aflatoxin ชนิด B_1

ที่มา : นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. (2543).

2.17 ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหาร และข้อกำหนดมาตรฐานอาหาร

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดให้ในอาหารคน อาหารสัตว์ นัทชนิดต่าง ๆ ถั่วลิสง และผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงมีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 ppb. และใน น้ำนมมีได้ไม่เกิน 0.5 ppb. (อ้างใน มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พริกแห้ง , 2525)

Stannard C (1997). ให้ข้อมูลเกี่ยวกับข้อกำหนดมาตรฐานในอาหารแห้งที่พร้อมบริโภค เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ทำจาก ถั่ว ผลไม้ต่าง ๆ เครื่องเทศ สมุนไพร ฝ้าย มะพร้าว ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูป ซึ่งมีลักษณะพร้อมในการบริโภค และอาจมีสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคและสารพิษต่าง ๆ จะปรากฏพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในเครื่องเทศและสมุนไพร โดยการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วต่าง ๆ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กันปริมาณอะฟลาทอกซิน ดังนี้คือ ข้อกำหนดGMP *Salmonella spp.* ไม่พบใน 25 กรัมของตัวอย่างและปริมาณสูงสุดที่รับได้ คือไม่พบ *Salmonella sp* ในตัวอย่าง 25 กรัม *B. cereus* (herbs and spices) มีน้อยกว่า 10^2 โคโลนี ปริมาณสูงสุดที่รับได้น้อยกว่า 10^4 โคโลนี ในตัวอย่าง 25 กรัม *C. perfringens* (herbs and spices) มีน้อยกว่า 10^2 โคโลนี ปริมาณสูงสุดที่รับได้น้อยกว่า 10^3 โคโลนี ในตัวอย่าง 25 กรัม และ อะฟลาทอกซิน (nuts) มีน้อยกว่า 4 ppb.และปริมาณสูงสุดที่รับได้น้อยกว่า 4 ppb.

2.18 หลักการของการวิเคราะห์หา อะฟลาทอกซิน โดยวิธีการ ELISA

การวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ซึ่งใช้หลักการของ ELISA คือการสกัดแยกเอาอะฟลาทอกซินจากตัวอย่างที่ผ่านการบด ด้วยสารละลายเมทธานอลผสมกับน้ำ แล้วกรองสารละลายไปตรวจหาสารพิษโดยผสมเข้ากับ conjugate แล้วใส่ลงใน Antibody – coated Well ส่วนผสมที่ประกอบด้วย Free Toxin (สารพิษที่อยู่ในตัวอย่างที่ทำการสกัดออกมา) และ conjugate (สารพิษติดกับ enzyme) จะถูกยึดจับด้วยแขนของ Antibody Conjugateที่เหลือและสารละลายอื่น ๆ ที่ไม่ได้ถูกจับด้วยแขนของ Antibody ก็จะถูกล้างออก หลังจากใส่ substrate สีจะเริ่มปรากฏ โดยปฏิกิริยาระหว่างเอนซัยม์กับ substrate สุดท้ายเติม Red stopping ตัวอย่างที่มีสีน้ำเงินแสดงว่า ไม่มีสารพิษในตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างเป็นสีแดง แสดงว่ามีสารพิษในตัวอย่างที่ตรวจสอบ อ่านค่าความเข้มของแสงผ่านเลนส์กรองแสง 650 nm. เปรียบเทียบกับ control นำไปคำนวณหาสารพิษที่ความเข้มข้นเป็น ppb. (หนึ่งส่วนในพันล้านส่วน) ได้ (อ้างใน ไทย – นิโอไบโอเทค, 2545)

จากการทดลองของ Porn - Ngarm Limtrakul (1999). ได้การศึกษาหาปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ในเมล็ดข้าวโพดและถั่วลิสงโดยวิธีการ ELISA โดยการเตรียม Monoconal Anibody ขึ้นในห้องปฏิบัติการ ในเมล็ดข้าวโพดจำนวน 28 ตัวอย่างและถั่วลิสงจำนวน 28 ตัวอย่าง

ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยโคโรฟอร์ม TLC และ เมทธานอล ร้อยละ 80 สำหรับ cELISA พบปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ในเมล็ดข้าวโพดที่ทดสอบโดยวิธี TLC และวิธี ELISA อยู่ในช่วง 0 –540 ppb. และ 0 – 576 ppb. ตามลำดับ ส่วนในถั่วลิสงพบในช่วง 0 – 695 ppb. และ 4 – 450 ppb. ตามลำดับ ปริมาณต่ำที่สุดตามวิธี ELISA กำหนด ซึ่งทำปฏิกิริยากับ Monoconal Antibody (MAb) พบ AF5 เท่ากับ 1 ppb. ส่วน TLC เท่ากับ 10 ppb. ในการทดสอบค่าความสัมพันธ์ ระหว่าวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบELISA และวิธี TLC ในเมล็ดข้าวโพด พบว่าอยู่ที่ 0.92 และ 0.87 ตามลำดับ(ค่าความเชื่อมั่นที่มากกว่าร้อยละ 95) ส่วนถั่วลิสง มีค่าที่ 0.94 และ 0.84 ตามลำดับ (ค่าความเชื่อมั่นที่มากกว่าร้อยละ 95) ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University