จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การปนเปื้อนและสาเหตุการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 และเอ็ม1 ในนมปรุงแต่งพาสเจอร์ไรส์ และยูเอชที รสชอคโกแลต

(Contamination and Cause of Contamination of Aflatoxins B1 and M1 in Chocolate-flavored Pasteurized and UHT Milk)

โดย

สุเทพ เรืองวิเศษ

สิงหาคม 2541

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงบประมาณที่ได้ให้ทุนวิจัยโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2539

ขอขอบคุณ คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล คุณวลาศินี รักขาว ที่ช่วยตรวจสกัดตัวอย่างน้ำนม คุณสุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์ ที่ช่วยวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ด้วยเครื่อง HPLC คุณอุมา บริบูรณ์ คุณรัศมี วชิรโกมล ที่ช่วยวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ด้วยเครื่อง densitometer คุณพรทิพย์ เส็งสำเริง ที่ช่วยพิมพ์รายงานวิจัย

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์นมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลต 8 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต และนมยูเอชทีรสชอคโกแลต 5 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต ซึ่งซื้อจากร้านค้าในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนธันวาคม 2538-กันยายน 2539 พบความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 <0.01-0.243 ppb สำหรับนมพาสเจอร์ไรส์ และ <0.01-0.141 ppb สำหรับนมยูเอชที อย่างไรก็ดีการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ และนมยูเอชทีที่ทำการตรวจวิเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่พบในการศึกษาครั้งนี้กับมาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา (0.5 ppb) และมาตรฐานของบางประเทศในยุโรป (0.05 ppb) แล้ว จะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลตอยู่ในระดับที่ยอมรับได้

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ii
บทคัดย่อ..... iii
สารบัญ..... iv
รายการตารางประกอบ..... v
รายการภาพประกอบ..... vi
รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ..... vii
บทที่
1 บทนำ..... 1
2 วิธีการวิจัย..... 3
2.1 ตัวอย่างนม..... 3
2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต..... 3
2.3 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต..... 6
3 ผลการวิจัย..... 8
3.1 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต..... 8
3.2 การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต..... 8
4 การอภิปรายผล..... 17
เอกสารอ้างอิง..... 19

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่

1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตที่เก็บจากท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร..... 12

2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างนมยูเอชทีรสชอคโกแลตที่เก็บจากท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร..... 13

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่

1 การต่ออุปกรณ์สำหรับสกัดอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 จากตัวอย่างน้ำนม..... 5
2 HPLC chromatogram แสดง peaks ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 และ บี 1 ซึ่งเปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ และ บี 2เอ โดย ทำปฏิกริยากับ trifluoroacetic acid..... 9
3 HPLC chromatogram แสดง peaks ของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตและถูกเปลี่ยนเป็น อะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ โดยทำปฏิกริยากับ trifluoroacetic acid..... 10
4 HPLC chromatogram แสดง peaks ของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้จากตัวอย่างนมยูเอชทีรสชอคโกแลต และถูกเปลี่ยนเป็น อะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ โดยทำปฏิกริยากับ trifluoroacetic acid..... 11
5 TLC chromatograms ของ A) สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี1 B) นมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลต..... 15
6 TLC chromatograms ของ A) สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี1 B) นมยูเอชทีรสชอคโกแลต..... 16

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

HPLC.....High performance liquid chromatography
ppb.....Part per billion
TFA.....Trifluoroacetic acid
TLC.....Thin layer chromatography
U.S.FDA.....United States Food and Drug Administration

บทที่ 1
บทนำ

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins) เป็นสารพิษผลิตโดยเชื้อราในตระกูล Aspergillus แต่พบว่า *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* สามารถผลิตได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ราพวก Aspergillus สามารถจริญเติบโตได้ดีบนธัญพืชเช่น ข้าวโพด ถั่ว อะฟลาทอกซินที่พบตามธรรมชาติได้แก่ อะฟลาทอกซิน บี1, บี2, จี1, และ จี2 (Aflatoxins B1, B2, G1 and G2) เมื่อเปรียบเทียบอะฟลาทอกซินทั้งสี่ตัวนี้แล้ว อะฟลาทอกซิน บี1 เป็นตัวที่พบว่ามีการปนเปื้อนในธัญพืชปริมาณสูงที่สุด (EHC, 1979) คำว่า "อะฟลาทอกซิน" ยังรวมถึงเมทาโบไลท์ (metabolites) บางตัวของอะฟลาทอกซินทั้งสี่ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันอีกด้วยเช่น อะฟลาทอกซิน เอ็ม1, เอ็ม2, พี1, และ คิว1 (Aflatoxin M1, M2, P1, and Q1) การศึกษาทางด้านพิษวิทยาแสดงให้เห็นว่าในบรรดาสารพิษกลุ่มนี้ อะฟลาทอกซิน บี1 ทำให้เกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ได้แรงที่สุดทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (EHC, 1979; WHO, 1987)

อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 เป็นเมทาโบไลท์ที่สำคัญตัวหนึ่งของอะฟลาทอกซิน บี1 สามารถตรวจพบได้ในน้ำนมของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินอาหารซึ่งปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซิน บี1 เนื่องจากอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 เป็นสารที่ทนต่อความร้อน การทำนมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) การทำเนย การทำนมผงโดยวิธี spray drying และการแปรรูปนมวิธีต่างๆ จึงทำให้สามารถตรวจพบอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ได้ทั้งในนมสดและผลิตภัณฑ์นมเช่น นมพาสเจอร์ไรส์ นมผง และเนย (Yousef and Marth, 1989) การศึกษาทางพิษวิทยาแสดงให้เห็นว่าอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ทำให้เกิดมะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ในสัตว์ทดลอง (Hsiesh *et al.*, 1984; Cullen *et al*, 1987) การที่อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 เป็นสารก่อมะเร็งนี้เองทำให้หลายประเทศกำหนดค่ามาตรฐานเพื่อควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนมให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคโดยเฉพาะเด็ก U.S.FDA กำหนดมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนมเท่ากับ 0.5 ppb หลายประเทศในยุโรปเช่น เยอรมนี เนเธอร์แลนด์ สวิตเซอร์แลนด์ และสวีเดน กำหนดมาตรฐานสำหรับอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนมที่ต่ำมากคือ 0.05 ppb (van Egmond, 1989) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนมโดยเฉพาะแต่อย่างใด (กระทรวงสาธารณสุข 2529)

จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบจากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย และนมพาสเจอร์ไรส์ชนิดจืดซึ่งซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ตและร้านค้าทั่วไป ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พบว่ามีอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ปนเปื้อนอยู่ในระดับ 0.15-0.80 ppb แต่ตรวจไม่พบอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมผงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (อุมาและดวงจันทร์, 2537)

จากการศึกษาเบื้องต้นการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินรวมในนมยูเอชทีชนิดจืดและชนิดหวานด้วยวิธี Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) โดยใช้ ELISA kit พบว่ามีการปนเปื้อนน้อยมาก (น้อยกว่า 0.5 ppb) แต่พบการปนเปื้อนสูงถึง 1.7 ppb ในนมปรุงแต่งยูเอชทีรสชอคโกแลต (ปราจีน, 2537) ถึงแม้ ELISA kit ดังกล่าวถูกออกแบบมาเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมก็ตาม แต่อะฟลาทอกซิน บี1 ก็อาจเกิด cross-reaction ได้ สารอะฟลา-ทอกซินที่ตรวจพบในปริมาณที่สูงในนมปรุงแต่งยูเอชทีรสชอคโกแลตนี้อาจเป็นอะฟลาทอกซิน บี1 ซึ่งปนเปื้อนในผงชอคโกแลตที่นำมาผสมกับน้ำนมในการผลิตนมยูเอชทีดังกล่าว การตรวจวิเคราะห์เพื่อแสดงให้ชัดเจนว่าเป็นอะฟลาทอกซินชนิดใดนั้นจำเป็นต้องใช้วิธี HPLC (High performance liquid chromatography) งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 และบี 1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต ซึ่งถ้ามีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะได้เป็นข้อมูลสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการแก้ไขต่อไป

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่างนม

ตัวอย่างนมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นนมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีรสชอคโกแลตซื้อจากร้านค้าในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวนตัวอย่างมีดังนี้

นมพาสเจอร์ไรส์ 8 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต (lot) และรุ่นการผลิตละ 3 กล่อง รวมเป็นตัวอย่างนมทั้งหมด 120 ตัวอย่าง

นมยูเอชที 5 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต (lot) และรุ่นการผลิตละ 3 กล่อง รวมเป็นตัวอย่างนมทั้งหมด 75 ตัวอย่าง

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต

สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างนมชอคโกแลตโดยใช้วิธี Official Method 986.16 (AOAC 1990b)

2.2.1 การสกัดอะฟลาทอกซิน เอ็ม1

เตรียมอุปกรณ์การสกัดอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ดังแสดงในรูปที่ 1A ต่อปลายด้านเข้า (ด้านยาว) ของ C18 Sep-Pak กับหลอดยาฉีดพลาสติก (syringe) ขนาด 50 มิลลิลิตร และต่อปลายด้านออกกับ vacuum flask เริ่มการสกัดโดยเติมเมธานอล 5 มิลลิลิตรในหลอดยาฉีด เปิดเครื่องดูดสูญญากาศ (vacuum pump) ปรับให้เมธานอลไหลผ่าน C18 Sep-Pak ทีละหยดจนเกือบหมดแล้วจึงเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร เมื่อน้ำไหลผ่าน C18 Sep-Pak จนเกือบหมดจึงเติมน้ำนมดิบที่เจือจางด้วยน้ำอุ่น 80°ซ ใช้น้ำนมดิบ 20 มิลลิลิตรผสมน้ำอุ่น 20 มิลลิลิตร ปรับเครื่องดูดสูญญากาศให้น้ำนมไหลผ่าน C18 Sep-Pak ประมาณ 10 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อน้ำนมไหลผ่าน C18 Sep-Pak เกือบหมดจึงเติมน้ำยาล้าง (wash solution) ซึ่งเป็นส่วนผสมของน้ำและอะซีโทไนไทร (acetonitrile) 9 : 1 จำนวน 10 มิลลิลิตรลงในหลอดยาฉีด ปรับเครื่องดูดสูญญากาศให้น้ำยาล้างไหลผ่าน C18 Sep-Pak จนหมด ถอด C18 Sep-Pak ออกจาก vacuum flask และหลอดยาฉีด เช็ดปลายทั้งสองข้างของ C18 Sep-Pak ด้วยกระดาษทิชชูจนแห้งสนิท ต่อ C18 Sep-Pak เข้ากับหลอดยาฉีดพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร เพื่อ elute อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ต่อไป

เตรียม minicolumn สำหรับการ clean-up อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้จากขั้นตอนแรก บรรจุซิลิกา เจล 60 (silica gel 60) ประมาณ 1.2 กรัมลงใน minicolumn ซิลิกา เจล 60 นี้ต้องอบแห้งที่ 105°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและเติมน้ำ 1% โดยน้ำหนัก เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 ชั่วโมงก่อนการใช้ นำ minicolumn มาเสียบกับจุกยาง แล้วนำมาต่อกับ vacuum flask เดิมที่ใช้สกัดอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 เติมอีเธอร์ (diethyl ether) 5 มิลลิลิตรลงใน minicolumn เปิดเครื่องดูดสูญญากาศให้อีเธอร์ไหลทีละหยด ก่อนอีเธอร์ไหลออกจาก minicolumn จนหมด

ปิดเครื่องดูดสูญญากาศ elute อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ซึ่งถูกดูดซับไว้ใน C18 Sep-Pak โดยเติมอีเธอร์ 10 มิลลิลิตรในหลอดยาฉีด ดันอีเธอร์ออกจากหลอดยาฉีดโดยใช้ plunger ให้อีเธอร์ไหลผ่าน C18 Sep-Pak ลงสู่ minicolumn ช้า ๆจนหมด เปิดเครื่องดูดสูญญากาศให้อีเธอร์ไหลผ่านซิลิกา เจล 60 ทีละหยดจนหมด อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 จะถูกดูดซับไว้โดยซิลิกา เจล 60 ใน minicolumn

Elute อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 จากซิลิกา เจล 60 ลงสู่หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ซึ่งตั้งอยู่ใน vacuum flask (ดังแสดงในรูปที่ 1B) โดยใช้สารทำละลายผสมไดคลอโร-มีเธน (dichloromethane) : เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 : 5 จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับเครื่องดูดสูญญากาศให้สารละลายไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นำหลอดทดลองพร้อมสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนจนเหลือปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตรจึงปิเปตสารละลายที่เหลือใส่ใน vial ขนาด 5 มิลลิลิตร ทำการระเหยต่อจนแห้ง

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1

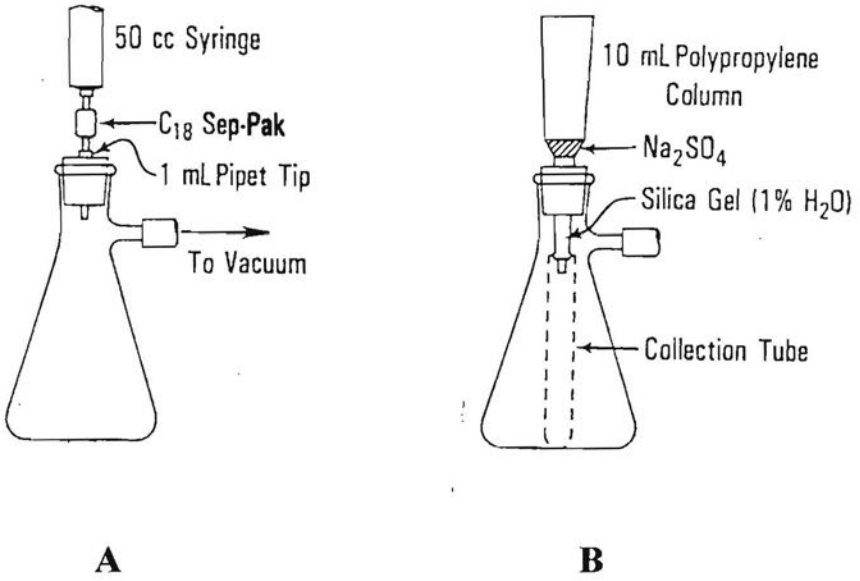
เนื่องจากปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำนมมีปริมาณน้อยมาก การตรวจวิเคราะห์โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มี fluorometer เป็น detector ไม่อาจทำได้โดยตรง จึงทำการ derivatization โดยทำปฏิกริยากับกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) เปลี่ยนให้เป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ (Aflatoxin M2a) ซึ่งมี absorptivity สูงพอเสียก่อน

เติมเฮ็กเซน (*n*-hexane) 200 ไมโครลิตร ลงใน vial จากข้อ 2.2.1 เพื่อละลายอะฟลา-ทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้ ทั้งนี้ต้องทำทันทีที่ระเหยแห้ง เพราะอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่เก็บในภาชนะแก้วในสภาพที่แห้งจะถูกดูดซับโดยแก้วทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ลดลงตามลำดับ ผสมสารละลายอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในเฮ็กเซนที่ได้ให้เข้ากันดี แล้วจึงเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก 200 ไมโครลิตร ปิดฝา vial ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วนำ vial แช่ใน water bath ที่ 40°ซ 10 นาที นำสารละลายมาระเหยแห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน ละลาย residue ด้วยสารละลายผสมน้ำ : อะซิโทรไนไทร (95:5) 0.5 มิลลิลิตร กรองผ่าน nylon filter ที่มี pore size 0.45 mวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 โดย HPLC

เงื่อนไข (conditions) ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน เอ็ม1

Column	:	Spherisorb ODS-2 (5 μm)
		ขนาด 0.4 x 25.0 เซนติเมตร
Mobile Phase	:	water : acetonitrile : iso-propanol 80 : 12 : 8
Flow rate	:	0.7 มิลลิลิตร/นาที
Detector	:	fluorescence detector
		excitation wavelength 365 nm
		emission wavelength 455 nm

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 การต่ออุปกรณ์สำหรับสกัดอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 จากตัวอย่างน้ำนม
A) การต่อ C18 Sep-Pak กับ vacuum flask และหลอดยาฉีด
B) การต่อ minicolumn เพื่อ elute อะฟลาทอกซิน เอ็ม1

2.2.3 การคำนวณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1

คำนวณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างน้ำนมดิบโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (area under the curve) จาก HPLC chromatogram ระหว่างตัวอย่างและสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ซึ่งได้เปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ เช่นเดียวกับตัวอย่างนม

2.3 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต

2.3.1 การสกัดอะฟลาทอกซิน บี1 จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมชอคโกแลตโดยวิธี Official Method 986.16 นี้สามารถตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ได้เช่นกัน ทั้งนี้เพราะอะฟลาทอกซิน บี1 มี retention time ที่แตกต่างจากอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 อย่างชัดเจน (HPLC chromatogram ของอะฟลาทอกซินทั้งสองแสดงในรูปที่ 3 ของบทที่ 3 ผลการวิจัย)

เพื่อเป็นการยืนยันการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ในนมชอคโกแลตโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น (หัวข้อ 2.2) ใช้วิธี Official Method 968.22 (AOAC, 1990a)

ปิเปตตัวอย่างนมชอคโกแลต 50 มิลลิลิตรใส่ใน separatory funnel ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร เขย่าบ่อยๆ ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้น้ำนมและคลอโรฟอร์มแยกชั้น ไขส่วนคลอโรฟอร์มผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 เก็บสารละลายที่กรองได้เพื่อวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซิน บี1

เตรียม chromatographic column โดยเติมคลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร ลงใน chromatographic column แก้วขนาด 22 x 300 mm มี Teflon stopcock ใส่ glass wool ลงใน column ไล่ฟองอากาศออก เติม anhydrous sodium sulfate ประมาณ 5 กรัม เพื่อเป็นฐานรองรับซิลิกาเจล 60 ล้างภายใน column ด้วยคลอโรฟอร์มจนไม่มีผง anhydrous sodium sulfate ติดอยู่ เติมซิลิกาเจล 60 จำนวน 10 กรัมลงใน column (silica gel 60, 0.063-0.2 mm ซึ่งผ่านการ activated โดยอบแห้งที่ 105°ซ 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมน้ำ 1% ปิดจุกขวดแก้ว เขย่าจนเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ในขวดแก้วปิดสนิทอย่างน้อย 15 ชั่วโมง จึงนำมาใช้) เติม anhydrous sodium sulfate 15 กรัมบนชั้นของซิลิกาเจล 60 ล้างภายใน column จนไม่มีผง anhydrous sodium sulfate ติดอยู่ แล้วจึงไขคลอโรฟอร์มออกจาก column จนเหลือคลอโรฟอร์มอยู่เหนือชั้นของ anhydrous sodium sulfate เล็กน้อย

ปิเปตคลอโรฟอร์มที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ใส่ใน column ที่เตรียมไว้ ปล่อยให้สารละลายตัวอย่างไหลผ่าน siliga gel column โดยแรงดึงดูดโลก เมื่อสารละลายตัวอย่างไหลจนหมดจึงล้าง column ด้วย *n*-hexane 150 มิลลิลิตร และ anhydrous ether 150 มิลลิลิตร แล้วจึง elute อะฟลาทอกซิน บี 1 จาก column ด้วยเมธานอล : คลอโรฟอร์ม (3 : 97)

2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน บี1

ระเหยแห้ง eluate ที่ได้โดยใช้แก๊สไนโตรเจน ละลาย residue ในคลอโรฟอร์ม แบ่งสารละลายที่ได้มา spot บนแผ่น TLC (Thin-layer chromatography) พร้อมกับสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี1 develop แผ่น TLC โดยใช้ คลอโรฟอร์ม : อีเธอร์ 90 : 10 เป็น solvent system นำแผ่น TLC ที่แห้งแล้วอ่านความเข้มของแต่ละ spot ของอะฟลาทอกซิน บี1 โดยใช้เครื่อง densitometer (CS-9801PC Dual Wavelength Flying Spot Scanning Densitometer, Shimadzu, Japan)

เพื่อเป็นการตรวจสอบวิธีการวิเคราห์อะฟลาทอกซิน บี1 ในนมชอคโกแลตข้างต้นนี้ จึงหา % recovery ของวิธีนี้โดย standard addition method เติม 10 ไมโครกรัม ของสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี1 ลงในตัวอย่างนมชอคโกแลต แล้วจึงสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน บี1 โดยใช้ TLC เช่นเดียวกับวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มทั้งสองชนิดโดยวิธี Official Method 986.16 (AOAC, 1990b) พบว่ามี % recovery ระหว่าง 80-86% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 83% detection limit ของวิธีนี้เท่ากับ 0.01 ppb โดยคิดจากความสูงของ peak ของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 จาก HPLC chromatogram ต้องเป็นอย่างน้อย 2 เท่าของความสูงของ peak รบกวน (noise)

HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 และบี1 (ซึ่งถูกเปลี่ยนให้เป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ และบี2เอ โดยทำปฏิกริยากับ TFA แล้ว) แสดงในรูปที่ 2 ซึ่งมี retention time ประมาณ 5 และ 10 นาที ตามลำดับ HPLC chromatogram ของนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตและนมยูเอชทีรสชอคโกแลตแสดงในรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ โดย peak ของอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ มี retention time ประมาณ 5 นาทีเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตของทั้ง 8 บริษัทที่ทำการตรวจวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 1 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่พบคือ < 0.01 ppb ซึ่งต่ำกว่า detection limit ของวิธี และความเข้มข้นสูงสุดที่พบคือ 0.243 ppm

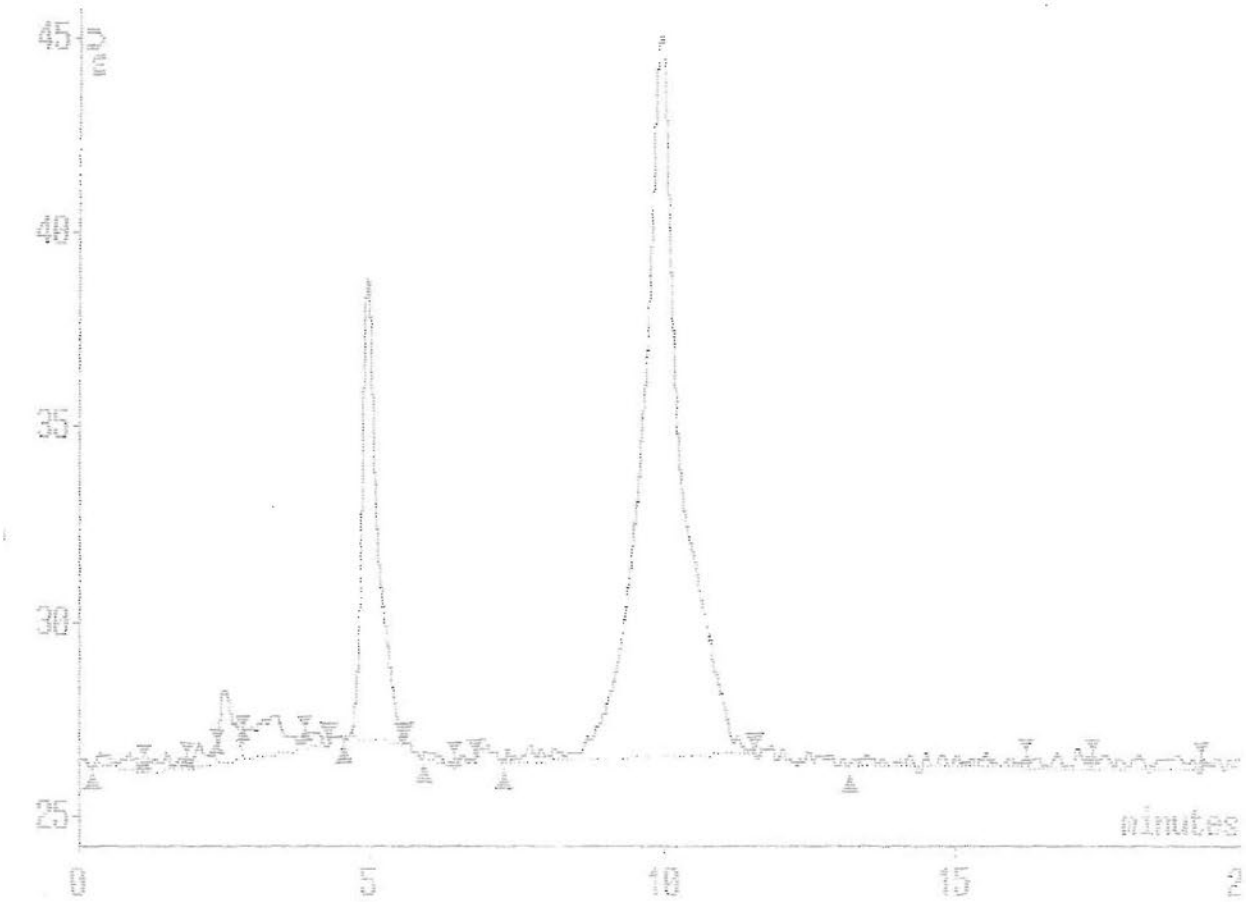
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตของทั้ง 5 บริษัทที่ทำการตรวจวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 2 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่พบคือ < 0.01 ppb ซึ่งต่ำกว่า detection limit ของวิธี และความเข้มข้นสูงสุดที่พบคือ 0.141 ppm

3.2 การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลต

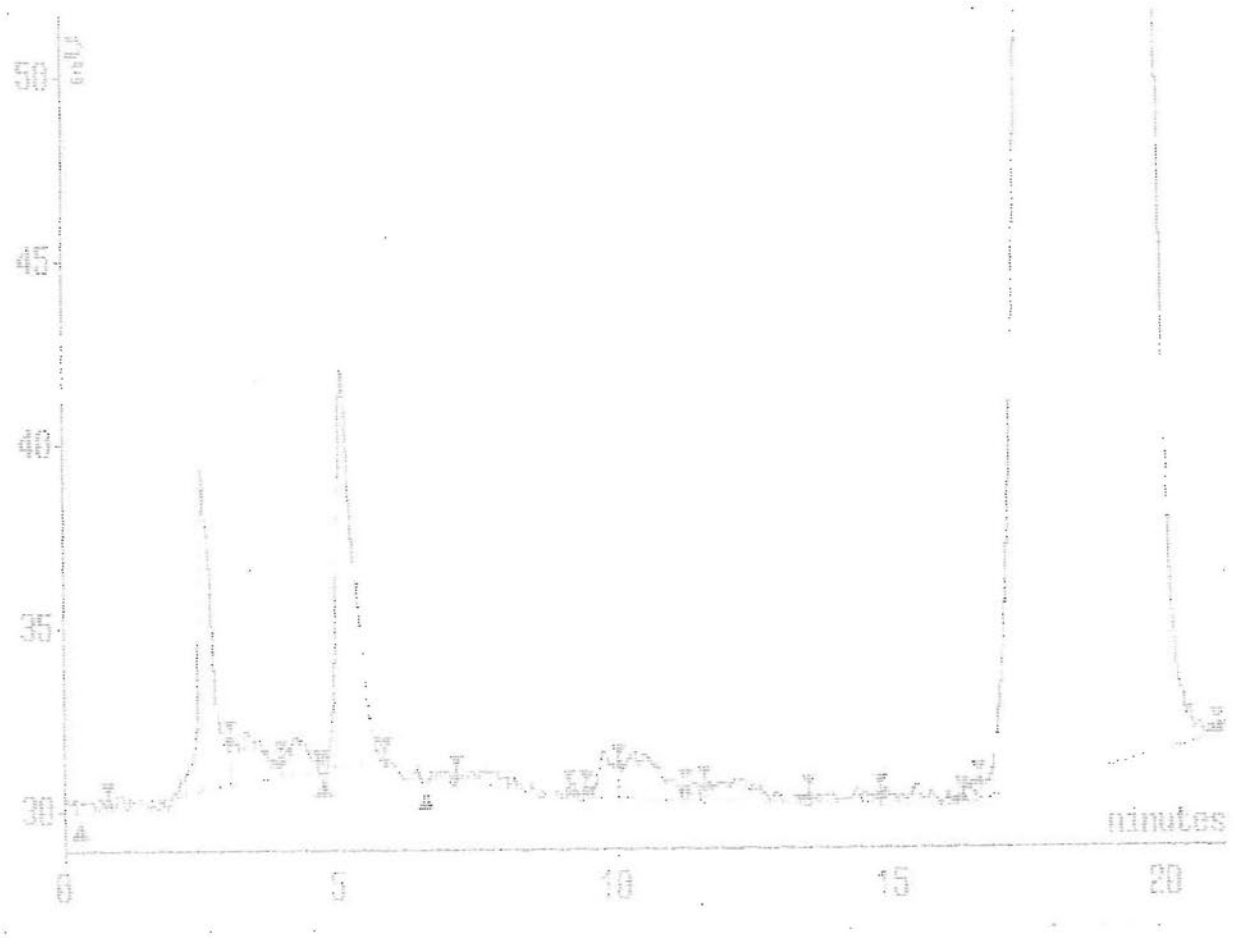
ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 วิธีการวิจัย หัวข้อ 2.3 ว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมชอคโกแลตสามารถตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ได้เช่นกัน ทั้งนี้เพราะ peak ของอะฟลาทอกซิน บี1 มี retention time ที่แตกต่างจากอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 (ดูรูปที่ 2)

HPLC chromatogram ของนมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีรสชอคโกแลตแสดงในรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ไม่ปรากฏ peak ของอะฟลาทอกซิน บี1 ที่ประมาณ 5 นาที ดังแสดงในรูปที่ 2 ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 และบี1 จากการทดสอบ % recovery ของอะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลตโดยวิธี standard addition method พบว่ามีค่าเท่ากับ 86 % ซึ่งทำให้มั่นใจว่าวิธีการสกัดและหาปริมาณอะฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธี Official Method 986.16 (AOAC, 1990) นี้ สามารถตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

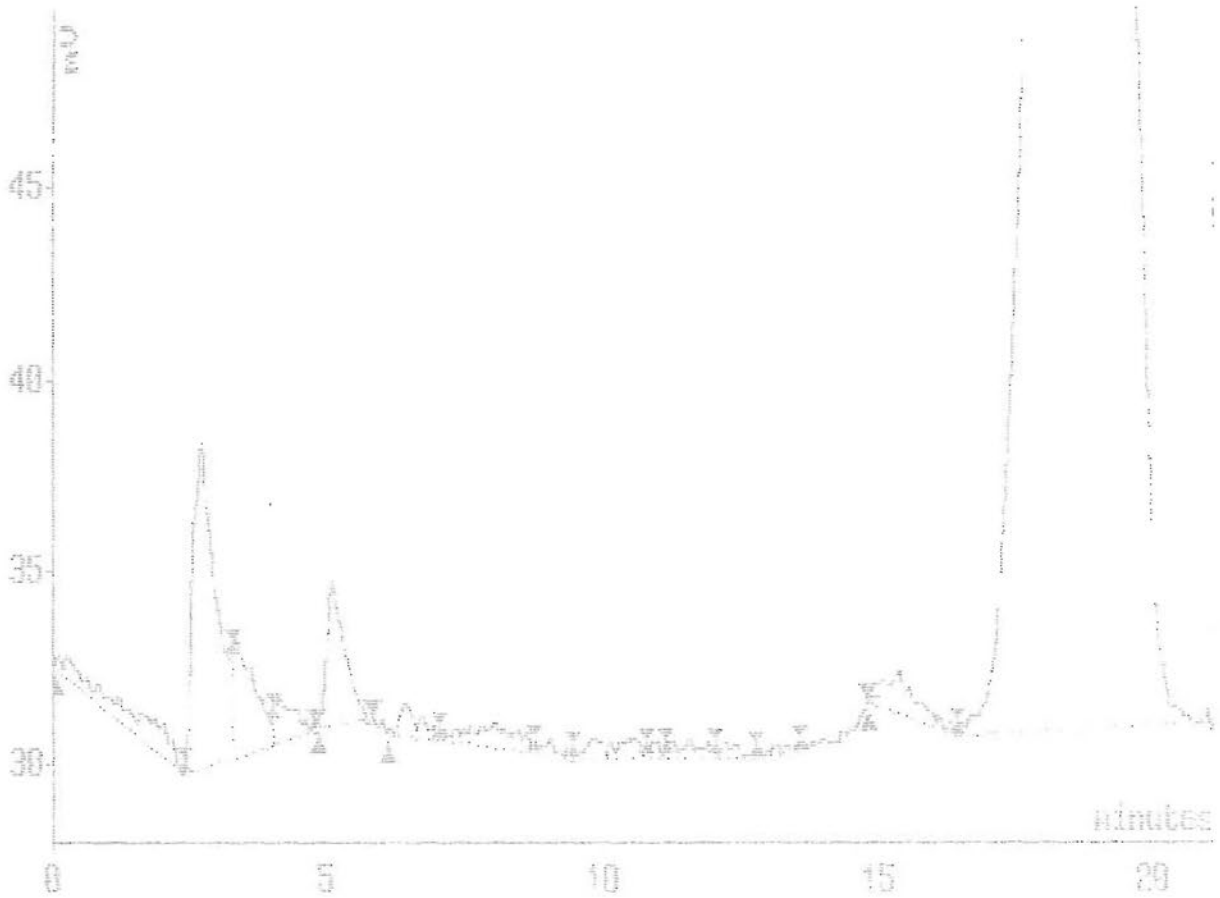
การตรวจวิเคราะห์ยืนยันการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลตโดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี TLC อ่านค่าความเข้มข้นของ spot



รูปที่ 2 HPLC chromatogram แสดง peaks ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 และ บี1 ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ และ บี2เอ โดยทำปฏิกริยากับ trifluoroacetic acid มี retention time ประมาณ 5 และ 10 นาทีตามลำดับ



รูปที่ 3 HPLC chromatogram แสดง peaks ของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้จากตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตและเปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ โดยทำปฏิกริยากับ trifluoroacetic acid ไม่ปรากฏ peaks ของอะฟลาทอกซิน บี2เอ (อะฟลาทอกซิน บี1) ที่ประมาณ 10 นาที



รูปที่ 4 HPLC chromatogram แสดง peaks ของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สกัดได้จากตัวอย่างนมยูเอชทีรสชอคโกแลตและเปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซิน เอ็ม2เอ โดยทำปฏิกริยากับ trifluoroacetic acid ไม่ปรากฏ peaks ของอะฟลาทอกซิน บี2เอ (อะฟลาทอกซิน บี 1) ที่ประมาณ 10 นาที

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลตที่เก็บจากท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนธันวาคม 2538 - กันยายน 2539 (n = 3)

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 (ppb)*				
	รุ่นการผลิต (lot)				
	1	2	3	4	5
บริษัท 1	0.075±0.002	0.044±0.003	0.056±0.003	0.079±0.006	< 0.01
บริษัท 2	0.129±0.011	0.099±0.010	0.072±0.005	0.055±0.003	0.108±0.007
บริษัท 3	0.083±0.004	0.173±0.012	0.202±0.011	0.243±0.015	0.110±0.005
บริษัท 4	0.029±0.001	0.033±0.002	0.022±0.001	< 0.01	0.034±0.002
บริษัท 5	0.111±0.010	0.179±0.011	0.205±0.014	0.108±0.007	0.088±0.004
บริษัท 6	0.013±0.003	0.027±0.001	< 0.01	0.015±0.001	0.019±0.002
บริษัท 7	0.029±0.002	0.017±0.001	0.014±0.001	0.056±0.004	0.083±0.007
บริษัท 8	0.138±0.007	0.067±0.003	0.145±0.012	0.045±0.002	< 0.01

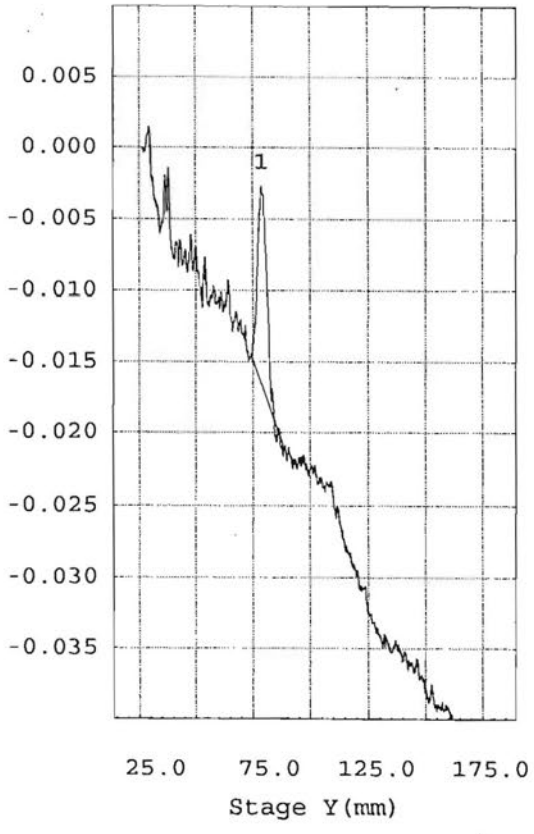
* mean ± SD

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในตัวอย่างนมยูเอชทีรสชอคโกแลต ที่เก็บจากท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนธันวาคม 2538 - กันยายน 2539 (n = 3)

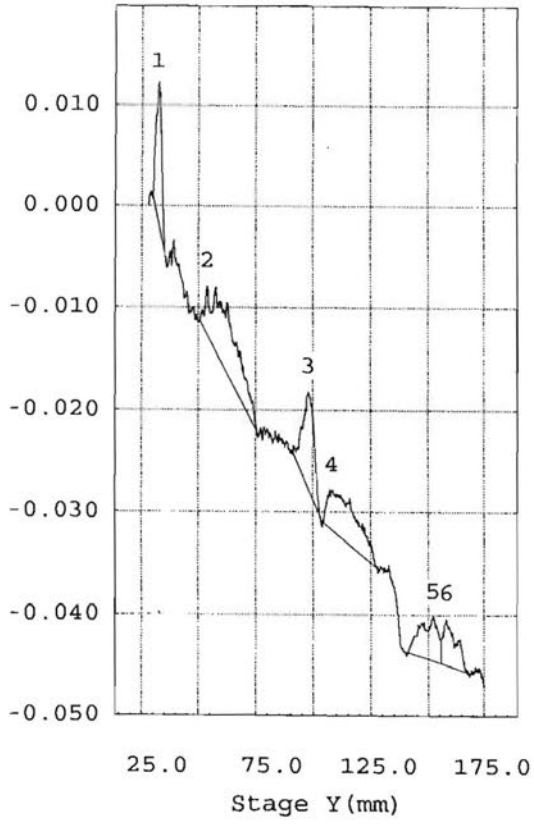
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 (ppb)*				
	รุ่นการผลิต (lot)				
	1	2	3	4	5
บริษัท 1	< 0.01	0.024±0.003	0.021±0.002	< 0.01	0.058±0.005
บริษัท 2	0.044±0.004	< 0.01	< 0.01	0.014±0.002	0.012±0.002
บริษัท 3	0.039±0.004	0.075±0.006	0.049±0.005	0.141±0.009	0.044±0.004
บริษัท 4	< 0.01	0.024±0.002	0.037±0.004	0.101±0.007	0.039±0.004
บริษัท 5	0.131±0.010	0.018±0.001	0.026±0.003	< 0.01	0.031±0.003

* mean ± SD

บน TLC plate ด้วยเครื่อง densitometer ตามหัวข้อ 2.3 ปรากฏว่าไม่พบ peak ของอะฟลาทอกซิน บี1 ในนมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีดังแสดงใน TLC chromatogram รูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ % recovery ของการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธีนี้พบว่าเท่ากับ 84% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน บี1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

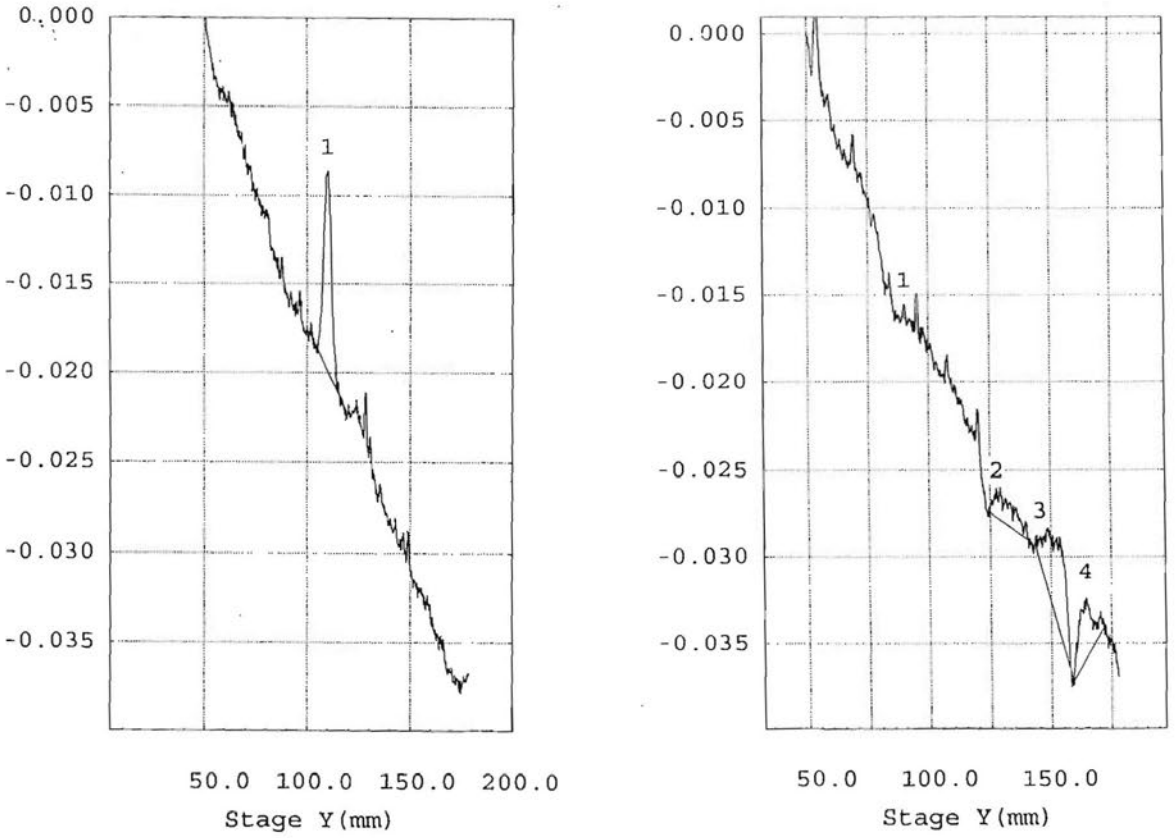


A



B

รูปที่ 5 TLC chromatogram ของ A) สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี1 ซึ่ง peak ที่ run ได้ อยู่ที่ประมาณ 78 มิลลิเมตร จากขอบด้านล่างของ TLC plate B) นมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลต จาก TLC plate แผ่นเดียวกัน ไม่ปรากฏ peak ของอะฟลาทอกซิน บี1 ที่ประมาณ 78 มิลลิเมตร



รูปที่ 6 TLC chromatogram ของ A) สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน บี1 ซึ่ง peak ที่ run ได้ อยู่ที่ประมาณ 110 มิลลิเมตร จากขอบด้านล่างของ TLC plate B) นมยูเอชทีรสชอคโกแลต จาก TLC plate แผ่นเดียวกัน ไม่ปรากฏ peak ของอะฟลาทอกซิน บี1 ที่ประมาณ 110 มิลลิเมตร

บทที่ 4
การอภิปรายผล

การตรวจวิเคราะห์นมพาสเจอร์ไรส์รสชอคโกแลต 8 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต และนมยูเอชทีรสชอคโกแลต 5 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต ซึ่งซื้อจากท้องตลาดในเขตกรุงเทพ-มหานครระหว่างเดือนธันวาคม 2538 - กันยายน 2539 พบความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 <0.01 - 0.243 ppb สำหรับนมพาสเจอร์ไรส์ และ <0.01 - 0.141 ppb สำหรับนมยูเอชที แต่ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์และนมยูเอชทีที่ตรวจวิเคราะห์

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่พบกับมาตรฐานของประเทศต่าง ๆเช่น 0.5 ppb ของประเทศสหรัฐอเมริกา และ 0.05 ppb ของบางประเทศในยุโรป (van Egmond, 1989) แล้ว จะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลตยังอยู่ในระดับที่ยอม-รับได้ ดังจะเห็นได้จากความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ที่สูงที่สุดที่ตรวจพบมีค่าเท่ากับ 0.243 ppb ยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกาอยู่มาก นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างนมที่มีอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ปนเปื้อนน้อยกว่า 0.05 ppb (ซึ่งเป็นมาตรฐานของบางประเทศในยุโรป) มีทั้งหมด 37 ตัวอย่าง คิดเป็น 56.9 % ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (65 ตัวอย่าง)

การปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในนมพร้อมดื่มรสชอคโกแลตนั้นมาจากน้ำนมที่ใช้ในการผลิต โดยมีสาเหตุจากโคกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซิน บี1 ซึ่งถูกเมตะโบไลซ์ได้เมตะโบไลท์ (metabolites) ต่าง ๆรวมทั้งอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนม ปริมาณการขับออกของอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับตัวโคเช่น ระยะเวลาของการให้นม ปริมาณของการให้น้ำนม (สุเทพและเบญจมาศ, 2539; Frobish *et al.*, 1986; van Egmond, 1989; Veldman *et al.*, 1992) โคในระยะแรกของการให้นม (early lactation) จะขับอะฟลา-ทอกซิน เอ็ม1 ออกมามากว่าระยะหลังของการให้นม (late lactation) และโคที่ให้น้ำนมมาก (high milk-yielding cows) จะขับอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ออกมาในน้ำนมมากกว่าโคที่ให้น้ำนมน้อย (low milk-yielding cows)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีที่ดีที่สุดในการลดปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนมคือการลดปริมาณอะฟลาทอกซิน บี1 ที่โคกินเข้าไป ซึ่งหมายความว่าฟาร์มโคนมต้องมีการจัดการอาหารที่ดีเพื่อลดการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน บี1

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข (2529) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 28 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ราชกิจจานุเบกษาเล่ม 103 ร.จ.16 ตอนที่ 23 (ฉบับพิเศษ) ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529

ปราจีน วีรกุล (2537) การตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ในนมพร้อมดื่มโดยใช้ ELISA kit (Personal communications)

สุเทพ เรืองวิเศษ และเบญจมาศ มโหสถนันทน์ (2539) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลา-ทอกซิน บี1 ในอาหารโคนมและปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำนม รายงานผลการวิจัยทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุมา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุประเสริญ (2537) การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 และเอ็ม2 ในนมและผลิตภัณฑ์นม นวัตกรรมสาธารณสุข **13**, 108-114

AOAC (1990a) AOAC Official Method 968.22 Aflatoxin in Peanuts and Peanut Products. CB Method. Association of Official Analytical Analysts. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC (1990b) AOAC Official Method 986.22 Aflatoxin M1 and M2 in Fluid Milk. Liquid Chromatographic Methods. Association of Official Analytical Analysis. Official Methods of Analysts, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Cullen J.M., Ruebner B.H., Hsieh L.S., Hyde D.M., and Hsieh D.P. (1987) Carcinogenicity of dictary aflatoxin M1 in male Fisher rats compared to aflatoxin B1. *Cancer Res* **47,** 1913-1917.

EHC (1970) World Health Organization. Aflatoxins. In : Mycotoxins. Environmental Health Criteria 11. Geneva. pp 21-85.

Frobish R.A., Bradley B.D., Long-Bardley P.E., and Hairston H. (1986) Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J Food Prot* **49**, 781-785.

Hsieh D.P., Cullen J.M., and Ruebner B.H. (1984) Comparative hepatocellular carcinogenicity of aflatoxin B1 and M1 in the rat. *Fd Chem Toxicol* **22,** 1027-1028.

van Egmond H.P. (1989) Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In: *Mycotoxins in Dairy Products*. Ed. van Egmond H.P. Elsevier Applied Science, Great Britain. pp 11-55.

Veldman A., Meijs J.A.C., Borggreve G.J., and Heeres-van der Tol J.J. (1992) Carry-over of aflatoxin from cows'food to milk. *Anim Prod* **55**, 163-168.

World Health Organization. Aflatoxins. In : IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Supplements 7. International Agency for Research on Cancer. pp 83-87.

Yousef A.E. and Marth E.H. (1989) Stability and degration of aflatoxin M1. In: *Mycotoxins in Dairy Products*. Ed. van Egmond H.P. Elsevier Applied Science, Great Britain. pp 127 - 161.