

การวัดปริมาณอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำมันดิบ โดยใช้  
ไฮเดรทเต็ทโซเดียมแคลเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต  
ในการแยก



นายโอฬาร ต้นวีรพงษ์ศิริ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1411-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 IN RAW MILK BY USING  
HYDRATED SODIUM CALCIUM ALUMINOSILICATE (HSCAS)  
FOR ISOLATION**

**Mr. Olarn Tonverapongsiri**

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Veterinary Public Health**

**Department of Veterinary Public Health**

**Faculty of Veterinary Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2002**

**ISBN 974-17-1411-4**



โอฬาร ต้นวีรพงษ์ศิริ : การวัดปริมาณอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบโดยใช้ไฮเดรทเท็ดโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกตในการแยก. (DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 IN RAW MILK BY USING HYDRATED SODIUM CALCIUM ALUMINOSILICATE (HSCAS) FOR ISOLATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.สพ.ญ. ดร. เบญจมาศ มโหสถนันท์; 57 หน้า. ISBN 974-17-1411-4.

ไฮเดรทเท็ดโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกต (HSCAS) เป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการดูดซับสารพิษเชื้อราอะฟลาท็อกซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอะฟลาท็อกซินบี1 (AFB1) จึงนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อป้องกันการดูดซึม AFB1 เข้าสู่ร่างกาย และยังมี การนำ HSCAS มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AFB1 อีกด้วย อะฟลาท็อกซินเอ็ม1 (AFM1) เป็นสารเมทาโบไลต์ที่มีพิษของ AFB1 พบมากในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่สำคัญคือน้ำนมโคเพราะเป็นอาหารสำหรับมนุษย์ จึงต้องมีการเฝ้าระวังตรวจสอบการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมโคอย่างสม่ำเสมอ ปัจจุบันวิธีการตรวจสอบ AFM1 ยังต้องใช้ชุดตรวจสอบที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง การพัฒนาชุดตรวจสอบขึ้นใช้เองภายในประเทศจะเป็นประโยชน์ทั้งในการเฝ้าระวังและลดค่าใช้จ่าย วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือต้องการศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับ AFM1 ของ HSCAS และศึกษาการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสำหรับการสกัดแยก AFM1 ขึ้นใช้ในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็นสองระยะ โดยผลการศึกษาระยะที่ 1 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีบี (ppb) ของ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาณของ HSCAS ที่ 0.5 กรัม สามารถดูดซับ AFM1 ได้ประมาณ 90%, ปริมาณ HSCAS ที่ 1.0 – 2.8 กรัม ดูดซับ AFM1 ได้มากกว่า 96% และที่ปริมาตร 3.0 – 3.4 กรัม สามารถดูดซับได้ถึง 100% และความสามารถของ HSCAS ในการดูดซับ AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.5 ppb ในน้ำนมดิบพบว่าปริมาตรของ HSCAS ที่ 0.5 – 0.75 กรัม สามารถดูดซับ AFM1 ได้ประมาณ 95%, ปริมาณ HSCAS ที่ 1.0 – 2.0 กรัม ดูดซับได้ 98% และปริมาณของ HSCAS ที่ 3.0 – 4.0 กรัม สามารถดูดซับ 100% และที่ระดับปริมาณของ HSCAS ที่ 2.8 และ 3.0 กรัมในน้ำกลั่นปราศจากไอออน และที่ปริมาณ 2.0 และ 3.0 กรัมในน้ำนมดิบ พบว่ามีความแตกต่างกันในการดูดซับ AFM1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อการดูดซับ AFM1 เกิดขึ้น 100% พบว่าอัตราส่วนการดูดซับ AFM1 ต่อน้ำหนักของ HSCAS ในน้ำกลั่นปราศจากไอออนเท่ากับ 33.33 ng/g และในน้ำนมดิบเท่ากับ 8.33 ng/g ส่วนผลการศึกษาในระยะที่ 2 พบว่ามีเพียงตัวทำละลายผสมที่มีส่วนผสมของ  $H_2O:Methanol:Acetonitrile$  ในอัตราส่วน 57:23:20 เพียงชนิดเดียวที่มีความสามารถในการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}C$  ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแยกนาน 15 นาที เป็นสภาวะที่ให้ %recovery ที่ดีที่สุด อัตราส่วนของตัวทำละลายผสม : HSCAS ที่ 5:1 จะให้ %recovery ที่สูงที่สุดสำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ 32.00% รองลงมาคือ 21.73% และ 14.80% ซึ่งเป็น %recovery ของตัวทำละลายผสม : HSCAS ที่ 4:1 และ 3:1 ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า HSCAS มีความสามารถในการดูดซับ AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบได้ และตัวทำละลายผสมซึ่งประกอบด้วย  $H_2O:Methanol:Acetonitrile$  ในอัตราส่วน 57:23:20 มีความสามารถในการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ได้

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข  
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข  
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

##4375574731 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD : AFLATOXIN M1 / HSCAS / RAW MILK

OLARN TONVERAPONGSIRI : DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 IN RAW MILK BY USING HYDRATED SODIUM CALCIUM ALUMINOSILICATE (HSCAS) FOR ISOLATION. THESIS ADVISOR : DR. BENJAMAS MHOSATANUN , D.V.M., Ph.D.  
57 PP. ISBN 974-17-1411-4.

Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate (HSCAS) is a mycotoxin adsorbent, that has high affinity and specificity for aflatoxin B1 (AFB1). HSCAS has been added to animal feed for adsorption of AFB1 and prevention of aflatoxicosis in livestock. Recently, HSCAS has also been modified for using in an analysis of AFB1 in feed. Aflatoxin M1 (AFM1) is a toxic metabolite of AFB1 and found in milk of mammals. The surveillance of AFM1 concentration in cow's milk is necessary for public health. At present, we still import test kits used for AFM1 analysis which are costly. A domestically-developed test kit will be more economical. Therefore, the purposes of our experiments were to determine the adsorption of AFM1 by HSCAS and to find out the suitable solvent to extract AFM1 adsorbed to HSCAS. The results from this experiment are preliminary data to develop test kit for extraction of AFM1 in raw milk and milk products in the future. The study was divided into two parts. For the first part, it was found that concentration 10 ppb of AFM1 in deionized water were adsorbed by HSCAS. HSCAS 0.5 gram (g), 1.0-2.0 g, and 3.0-4.0 g could adsorb AFM1 about 90%, more than 96% and 100%, respectively. Furthermore, artificially-contaminated AFM1 at the concentration of 0.5 ppb in raw milk was mixed with various amounts of HSCAS. HSCAS 0.5-0.75 g, 1.0-2.0 g, and 3.0-4.0 g could adsorb AFM1 about 95%, 98%, and 100%, respectively. The amounts of HSCAS 2.8 and 3.0 g in deionized water including these of HSCAS 2.0 and 3.0 g in raw milk are significantly different in the AFM1 adsorbent capacity ( $P < 0.05$ ). Ratios of AFM1 to the amount of HSCAS in deionized water and raw milk are 33.33 ng/g and 8.33 ng/g, respectively. For the second part, the result showed that only the mixed solvent of  $H_2O$ :Methanol:Acetonitrile (57:23:20) had the highest efficiency to extract AFM1 from HSCAS. At  $40^\circ C$  and extraction to 15 min, this is proved to be the best condition for extraction. Ratio of the mixed solvent to HSCAS at 5:1 has the highest % recovery (32.00%). Additionally, 21.73% and 14.80% which are % recovery of the mixed solvent to HSCAS at 4:1 and 3:1, respectively. The present study can conclude that HSCAS was efficient in adsorption of AFM1 in raw milk and the mixed solvent of  $H_2O$ :Methanol:Acetonitrile (57:23:20) was able to extract AFM1 from the adsorption to HSCAS.

Department Veterinary Public Health

Student's signature.....

Field of study Veterinary Public Health

Advisor's signature.....

Academic year. 2002

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ สพ.ญ.ดร. เบญจมาศ มโหสถนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ. น.สพ.ดร. คมกริช พิมพภักดิ์ อาจารย์ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รศ. สพ.ญ.ดร. ดวงนฤมล ประชัญคดี รศ. ดร. จันทร์จรัส เรียวเดชะ ผศ. ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ และ ผศ. น.สพ.ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโกคิน อาจารย์ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณกองทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

ขอขอบคุณ อ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ และ น.สพ. ปิยวัฒน์ สายพันธุ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ คุณเบ็ญจรัตน์ วงศาวิภาส ผู้จัดการบริษัท เจนเทค อินเทอร์เน็ตเนชั่นแนล จำกัด ให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง HPLC คุณไฉไล คุ้มพานุกูล ช่วยเหลือในการเตรียมเครื่องมือ และเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โอฬาร ต้นวีรพงษ์ศิริ

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
<b>บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 อะฟลาที่อกซินปี 1 และอะฟลาที่อกซินเอ็ม 1.....	5
2.2 การออกฤทธิ์และการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาที่อกซินในร่างกายสัตว์.....	7
2.3 การกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาที่อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม.....	9
2.4 รายงานการปนเปื้อนอะฟลาที่อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและ ผลิตภัณฑ์นม ในประเทศไทย.....	10
2.5 วิธีการในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาที่อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม.....	11
2.6 ไฮเดรทเต็ทโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกต.....	15
2.7 รายงานการใช้ไฮเดรทเต็ทโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกต เพื่อลดความเป็นพิษของอะฟลาที่อกซิน.....	18
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย</b>	
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	29

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

<b>บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล</b>	
4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการดูดซับ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน.....	30
4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณ HSCAS ที่เหมาะสม ต่อการดูดซับ AFM1 ในน้ำนมดิบ.....	32
4.3 การทดลองที่ 3 วิเคราะห์หาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS .....	35
4.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาวิเคราะห์หาสภาพที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS .....	41
 <b>บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ</b>	
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	43
5.2 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	46
 รายการอ้างอิง.....	48
 ภาคผนวก.....	53
ภาคผนวก ก .....	54
ภาคผนวก ข .....	56
 ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	57

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมให้มีได้ของ AFM1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมของประเทศต่าง ๆ..	9
2. วิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม.....	14
3. แสดงชนิด คุณภาพ สูตรทางเคมี และบริษัทผู้ผลิตสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	22
4. แสดงตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบ เรียงตามลำดับความแรง (Polarity) จากน้อยไปมาก.....	27
5. แสดงปริมาตรของตัวทำละลาย: ปริมาตรตะกอนของ HSCAS และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด AFM1 ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และที่ 40 °C .....	28
6. แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS ในการดูดซับ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 5 นาที.....	30
7. แสดงสัดส่วนของน้ำหนัก AFM1 (ng) : ปริมาณของ HSCAS (g) ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 ml มี AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb คิดเป็นน้ำหนักของ AFM1 เท่ากับ 100 ng.....	31
8. แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS ในการดูดซับ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb ในน้ำนมดิบ โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 5 นาที.....	32
9. แสดงสัดส่วนของน้ำหนัก AFM1 (ng) : ปริมาณของ HSCAS (g) ในน้ำนมดิบปริมาตร 10 ml มี AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb คิดเป็นน้ำหนักของ AFM1 เท่ากับ 25 ng.....	33
10. แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS 0.5 กรัม ในการดูดซับ AFM1 0.5 ppb ในน้ำนมดิบ โดยใช้เวลาในการทดสอบ 5, 10 และ 20 นาที.....	34
11. แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS 0.5 กรัม ในการดูดซับ AFM1 1.0 ppb ในน้ำนมดิบ โดยใช้เวลาในการทดสอบ 5, 10 และ 20 นาที.....	34
12. แสดง % recovery ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS.....	36
13. แสดง % recovery ของการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS โดยใช้ตัวทำละลายผสมที่มีส่วนผสมของ H <sub>2</sub> O:Methanol:Acetonitrile ในอัตราส่วน 57:23:20 ที่สภาวะต่างๆ.....	42

## สารบัญภาพ

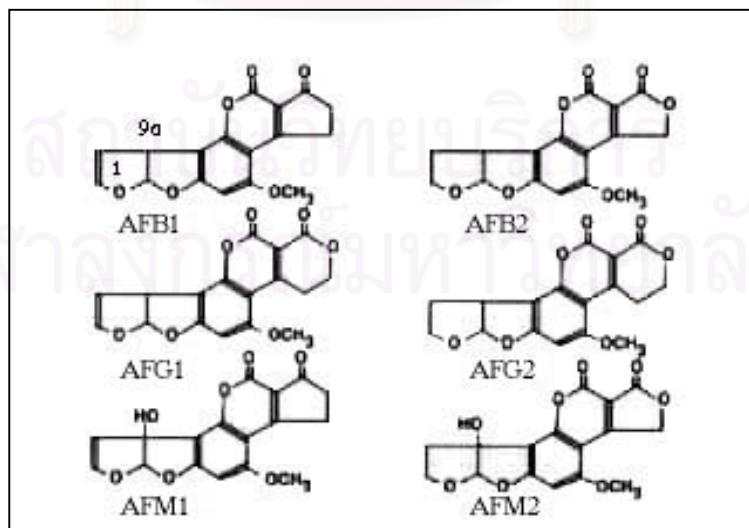
รูปที่	หน้า
1. สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาท็อกซินชนิดต่าง ๆ.....	1
2. เมแทโบไลต์ชนิดต่าง ๆ ของ AFB1.....	7
3. แสดงการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซินในเซลล์ตับ.....	8
4. แสดง Immunoaffinity column สำหรับการตรวจปริมาณ AFM1.....	13
5. รูปร่างของหน่วยพื้นฐานของแรชลิเกทที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในกลุ่มดินเหนียว.....	16
6. แสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถของสารดูดซับชนิดต่าง ๆ ในการดูดซับ AFB1 ในห้องปฏิบัติการ.....	18
7. แสดง HPLC Chromatogram จากการศึกษาของ Phillips et al. (1995).....	21
8. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % การดูดซับ AFM1 ของ HSCAS และปริมาณของ HSCAS (g).....	31
9. แสดงความสามารถในการกระจายตัวของ HSCAS ในสารละลาย.....	37
10. แสดงการไม่กระจายตัว จับตัวเป็นก้อน คล้ายดินน้ำมัน ของ HSCAS ในสารละลาย.....	37
11. Chromatogram ของตัวทำละลายผสม จากผลการทดลองที่ 3 peak ที่มี Retention time เท่ากับ 6.8 นาที คือ AFM1.....	37
12. Chromatogram ของ Methanol จากผลการทดลองที่ 3.....	37
13. Chromatogram ของ Acetonitrile จากผลการทดลองที่ 3.....	38
14. Chromatogram ของ Benzene จากผลการทดลองที่ 3.....	38
15. Chromatogram ของ n-Hexane จากผลการทดลองที่ 3.....	38
16. Chromatogram ของ Cyclohexane จากผลการทดลองที่ 3.....	39
17. Chromatogram ของ Toluene จากผลการทดลองที่ 3.....	39
18. Chromatogram ของ Diethyl ether จากผลการทดลองที่ 3.....	39
19. Chromatogram ของ Chloroform จากผลการทดลองที่ 3.....	40
20. Chromatogram ของ Methylene chloride จากผลการทดลองที่ 3.....	40
21. Chromatogram ของ Isopropanol จากผลการทดลองที่ 3.....	40

# บทที่ 1

## บทนำ

สารพิษกลุ่มอะฟลาท็อกซินเท่าที่มีรายงานในปัจจุบันมีอยู่ 18 ชนิด อะฟลาท็อกซินที่พบในธรรมชาติที่สำคัญได้แก่ อะฟลาท็อกซินบี 1 (Aflatoxin B1, AFB1), อะฟลาท็อกซินบี 2 (Aflatoxin B2, AFB2), อะฟลาท็อกซินจี 1 (Aflatoxin G1, AFG1), และอะฟลาท็อกซินจี 2 (Aflatoxin G2, AFG2) ชนิดของอะฟลาท็อกซินที่พบได้มากที่สุดและมีความเป็นพิษรุนแรงมากที่สุดคือ AFB1 ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะเป็นพิษรุนแรงต่อตับและไตโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง (International Agency for Research on Cancer; IARC, 1993)

อะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 (Aflatoxin M1, AFM1) เป็นเมทาโบไลต์ที่สำคัญของ AFB1 เกิดขึ้นเนื่องจาก AFB1 เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ตรงบริเวณตำแหน่ง 9a ดังแสดงในรูปที่ 1 AFM1 จะถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินอาหารซึ่งปนเปื้อนด้วย AFB1 (Applebaum et al., 1982) จากการศึกษาในโคนมโดย Rodricks และ Stoloff (1977) พบว่าปริมาณ AFB1 ในอาหารโคนมเปลี่ยนไปเป็น AFM1 ในน้ำนมในอัตราส่วน 300 : 1 หรือมีค่าระหว่าง 0.2 – 3.2 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Seiber และ Blanc (1978) ได้ทำการสรุปผลการศึกษาจากหลายๆการทดลอง แล้วรายงานว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงของ AFB1 ไปเป็น AFM1 มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อไม่นานมานี้ ในปี ค.ศ. 2001 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ได้สรุปผลการศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงของ AFB1 จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น AFM1 ไว้ที่ 0.3 – 6.2 เปอร์เซ็นต์ (JECFA, 2001)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาท็อกซินชนิดต่าง ๆ

การศึกษาทางพิษวิทยาแสดงให้เห็นว่า AFM1 ทำให้เกิดมะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ในหนู rat สายพันธุ์ Fisher (Wogan and Paglialunga, 1974; Hsieh et al., 1984; Cullen et al., 1987) สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติได้จัดลำดับ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B คือ สารที่อาจทำให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ (Group 2B : Possibly carcinogenic to human) ทั้งนี้เนื่องจากยังขาดข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชัดเจนในมนุษย์ และมีข้อมูลจำกัดในสัตว์ทดลอง (IARC, 1993) นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxic) อีกด้วย (Codex Alimentarius Commission, 2001) ด้วยเหตุนี้เองทำให้หลายประเทศมีการกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Maximum Residual Limit; MRL) ของ AFM1 ในน้ำมันขึ้น ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดค่า MRL ของ AFM1 ในน้ำมันให้มีได้ไม่เกิน 0.5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (Part per billion; ppb) ในขณะที่ประเทศในสหภาพยุโรปกำหนดไว้ที่ระดับต่ำมากคือ 0.01 – 0.05 ppb ในปี ค.ศ. 2001 คณะกรรมการโคเด็กซ์สรุปให้ร่างค่ามาตรฐาน MRL ของ AFM1 ไว้ที่ระดับ 0.5 ppb อย่างไรก็ดีคณะผู้แทนจากประเทศในสหภาพยุโรปคัดค้านโดยอ้างเหตุผลว่า AFM1 เป็นสารก่อมะเร็งที่มีพิษต่อสารพันธุกรรมซึ่งการได้รับสารนี้ในระดับใด ๆ ก็อาจเกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ จึงควรควบคุมระดับของสารพิษจำพวกนี้ให้อยู่ในระดับต่ำที่สุดเท่าที่จะทำได้ (As Low As Reasonably Achievable; ALARA) คณะกรรมการโคเด็กซ์จึงกำหนดให้มีการพิจารณารายละเอียดเกี่ยวกับสารที่มีพิษต่อสารพันธุกรรมและวิธีการจัดการความเสี่ยงประกอบด้วยในการพิจารณาครั้งต่อไป ถึงแม้ว่าระดับความเป็นพิษและการก่อมะเร็งของ AFM1 ในมนุษย์ยังไม่มีรายงานและยังเป็นที่ถกเถียงกัน แต่ก็เป็นที่ที่จะต้องให้ความสนใจและเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนเกิดขึ้นหรือควบคุมให้น้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันเป็นอาหารสำคัญของมนุษย์หากมี AFM1 ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูงและบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานานก็อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะเด็กและทารก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพื่อเตรียมข้อมูล ทำการวิจัยเพื่อควบคุมป้องกัน และแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำมัน

จากการสำรวจหาปริมาณ AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทย มีรายงานดังนี้คือ ในช่วงปี พ.ศ. 2533–2536 อูมาและดวงจันทร์ (2537) เก็บตัวอย่างน้ำมันดิบจากฟาร์มโคนมจำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่ามี 12 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ AFM1 โดยปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบคือ 0.15 – 0.80 ppb ต่อมา Saitanu (1997) ได้ทำการสำรวจการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำมันดิบจำนวน 67 ตัวอย่าง ตรวจพบ AFM1 จำนวน 66 ตัวอย่าง ปริมาณ AFM1 ที่พบอยู่ในระดับ มากกว่า 0 – 0.5 ppb มี 49 ตัวอย่าง และอีก 17 ตัวอย่างพบว่ามีปริมาณ AFM1 มากกว่า 0.5 ppb เบญจมาศ (2540) ได้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AFM1 ในน้ำมันดิบที่เก็บรายตัวในปี พ.ศ. 2539 จากแม่โคในช่วงแรกของการให้นมเขตอำเภอเขาหลวง จังหวัดราชบุรี จำนวน 696 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัด AFM1 ด้วย Immunoaffinity column (AflaM1™, Vicam USA) แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง HPLC พบที่มีการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำมันดิบจำนวน 681 ตัวอย่าง คิดเป็น 97.84% ปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 0–1.80 ppb จากรายงานดังกล่าวข้างต้นแสดงว่าการปนเปื้อนของ AFM1 ในก่อนปี พ.ศ. 2540 จะมีค่าสูงกว่า 0.5 ppb (ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่ Codex จะกำหนด) รัฐบาลได้เล็งเห็นถึงปัญหาและอันตรายที่อาจเกิดขึ้นต่อประชาชนจากการบริโภคอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน จึงได้ให้มีการดำเนินการแก้ไขปัญหาและควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบ

อาหารสัตว์และน้ำนมอย่างครบวงจรโดยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 กรมปศุสัตว์ได้นำระบบ HACCP มาใช้กับโรงงานผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคนม (กรมปศุสัตว์, 2544) และในขณะเดียวกันโรงงานแปรรูปนมหลายโรงงานก็มีการนำระบบ HACCP มาใช้เช่นกัน การตรวจการปนเปื้อนในน้ำนมดิบในระยะต่อมาจึงพบว่ามีการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบมีค่าเฉลี่ยลดลง และต่ำกว่า 0.5 ppb (เบญจมาศ, 2544)

ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษคือ การเฝ้าระวัง ซึ่งได้แก่การตรวจปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบอาหารและในน้ำนมอย่างสม่ำเสมอ ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจอะฟลาท็อกซินอยู่หลายวิธี ได้แก่ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Thin-Layer Chromatography (TLC), Fluorometer และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งทุกวิธี ยกเว้น ELISA จะต้องมีการแยก (Isolation) อะฟลาท็อกซินออกจากสารอื่น ๆ ที่อาจสกัดได้จากวัตถุดิบอาหาร และน้ำนมก่อนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ เพื่อให้ตัวอย่างสกัดมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะวิเคราะห์ต่อไปและผลที่ได้ถูกต้องแม่นยำ สำหรับการตรวจปริมาณ AFM1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมนั้น วิธีการตรวจที่นิยมใช้เป็นมาตรฐานคือ HPLC (AOAC, 1996) และวิธีการที่ใช้แยก AFM1 ออกจากน้ำนมคือ Solid phase extraction column หรือ Immunoaffinity column ซึ่งคอลัมน์ทั้งสองประเภทนี้เป็นคอลัมน์สำเร็จรูปนำเข้าจากต่างประเทศและมีข้อดีข้อเสียต่างกันคือ Immunoaffinity column มีความจำเพาะต่อ AFM1 สูง เพราะใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ AFM1 เป็นตัวยึดจับบรรจุไว้ในคอลัมน์ ทำให้สามารถแยก AFM1 ออกจากสารอื่น ๆ ได้ง่าย (Tuinstra et al., 1993) แต่มีข้อเสียคือ คอลัมน์ประเภทนี้มีกำหนดอายุการใช้งานหลังจากการผลิตเพียง 1 ปี ต้องเก็บรักษาในตู้เย็นเสมอ การใช้คอลัมน์นี้ซ้ำอาจทำได้แต่ความแม่นยำลดลง รวมทั้งคอลัมน์มีราคาแพงมาก (ประมาณ 500 บาทต่อคอลัมน์) ซึ่งเป็นอุปสรรคของการใช้ Immunoaffinity column เพื่อตรวจ AFM1 ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของน้ำนมดิบในประเทศไทย ในขณะที่ Solid phase extraction column มีราคาถูกกว่าเล็กน้อย มีความจำเพาะต่อ AFM1 ในระดับปานกลางเนื่องจากดูดซับสารอื่น ๆ ในน้ำนมได้เช่นกัน อีกทั้งมีขั้นตอนในการสกัดแยกมากกว่า Immunoaffinity column และต้องใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีอันตราย เช่น Diethyl ether และ Dichloromethane (AOAC, 1996) ปัจจัยที่กล่าวมานี้ทำให้มีข้อจำกัดในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบอย่างต่อเนื่องของประเทศไทย อีกทั้งการมีค่าใช้จ่ายสูงสำหรับค่าคอลัมน์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้เกิดแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการสกัดแยก AFM1 โดยใช้วัสดุที่มีประสิทธิภาพดี และมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อ AFM1 และสามารถผลิตเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับใช้สกัดแยก AFM1 ขึ้นใช้ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

ไฮเดรตเต็ทโซเดียมแคลเซียมอลูมิเนียมซิลิเกต (Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate; HSCAS) จัดอยู่ในกลุ่ม phyllosilicate clays ประกอบด้วย cation ที่เป็น divalent และ trivalent cations เช่น Aluminum ยึดจับกับออกซิเจนและหมู่ไฮดรอกซิลเป็น octahedral และยังมี silicate ยึดจับกับออกซิเจนและหมู่ไฮดรอกซิลเป็น tetrahedral ทั้ง octahedral และ tetrahedral ถ้ามาประกอบเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 จะได้สารประกอบ dimorphic phyllosilicate clays ซึ่งมีสูตรทั่วไปคือ  $M_{2-3}Si_2O_5(OH)_4$  แต่ถ้ามารวมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 2:1 จะได้สารประกอบ trimorphic phyllosilicate clays มีสูตรทั่วไปคือ  $M_{2-3}Si_4O_{10}(OH)_2$  (Phillips,

1995) มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์แสดงให้เห็นว่า HSCAS สามารถเข้าจับกับ AFB1 ในอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ HSCAS เพื่อลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในสัตว์ทดลอง อีกทั้งยังมีศึกษาถึงประสิทธิภาพและกลไกของการดูดซับอะฟลาท็อกซินของ HSCAS พบว่า HSCAS มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับ AFB1 ออกจากอาหารสัตว์ จึงทำให้ความเป็นพิษในสัตว์ลดลง (Harvey et al., 1988; Harvey et al., 1989; Beaver et al., 1990; Kubena et al., 1990a; Kubena et al., 1990b; Kubena et al., 1991; Harvey et al., 1991; Phillips et al., 1995; Grant and Phillips, 1998; Phillips, 1999) Phillips et al. (1995) ได้นำ HSCAS มาประยุกต์ใช้ในการแยก AFB1 ออกจากข้าวโพด โดยนำ HSCAS มาเคลือบไว้บนผิวของเม็ดทรายเพื่อเพิ่ม Hydraulic conductivity และทำให้การกรองผ่านของสารละลายดีขึ้น แล้วนำทรายที่เคลือบไว้ด้วย HSCAS มาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเล็ก เพื่อใช้สำหรับสกัดแยก AFB1 พบว่าการแยก AFB1 ออกจากสารอื่นๆ โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ HSCAS ให้ผลดี เมื่อเปรียบเทียบกับ การแยกโดยใช้ Immunoaffinity column และในปัจจุบันการนำเอา HSCAS มาบรรจุลงในคอลัมน์เพื่อใช้ สำหรับการแยก AFB1 กำลังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาเพื่อทำเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปในการวิเคราะห์หา ปริมาณ AFB1 (Phillips, 1999)

สำหรับการนำ HSCAS มาประยุกต์ใช้ในการแยก AFM1 ในน้ำนมดิบนั้น ในปัจจุบันยังไม่มี การศึกษา และข้อมูลที่แสดงถึงประสิทธิภาพการดูดซับ AFM1 ของ HSCAS ยังมีจำกัด เนื่องจาก AFM1 เป็นสาร เมทาบอไลต์ของ AFB1 มีสูตรโครงสร้างเคมีคล้ายคลึงกันมาก แตกต่างกันเพียงที่ AFM1 มีหมู่ไฮดรอกซิลตรง ตำแหน่ง 9a ในขณะที่ AFB1 ไม่มี จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจศึกษา วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ คือ เพื่อ ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ HSCAS ในการดูดซับ AFM1 และเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำเอา HSCAS มาพัฒนาทำเป็นชุดตรวจสอบสำหรับสกัดแยก AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมต่อไปใน อนาคต

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 อะฟลาท็อกซินบี 1 และอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1

(Aflatoxin B1, AFB1 and Aflatoxin M1, AFM1)

อะฟลาท็อกซินเป็นสารพิษจากเชื้อรา มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง และมีพิษรุนแรงต่อทั้งตับและไต ในคนและสัตว์ สารพิษชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อราในตระกูล “แอสเปอร์จิลลัส” (*Aspergillus spp.*) เชื้อราที่ผลิตอะฟลาท็อกซินในปริมาณมาก ได้แก่ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในผลิตภัณฑ์เกษตรหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง และถั่วเหลืองแห้งต่างๆ เป็นต้น เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเชื้อราจะเจริญและผลิตอะฟลาท็อกซินได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง (Yoshizawa, 1991) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินนั้นจะต้องประกอบด้วย ความชื้นมากกว่า 13% ความชื้นสัมพัทธ์อากาศมากกว่า 70% อุณหภูมิมากกว่า 13 °C ความเป็นกรด-ด่างของอาหารประมาณ 4-5 มีปริมาณออกซิเจน และอาหารอย่างเพียงพอ (Mahanna, 1999) ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอากาศร้อนชื้น และมีสภาวะต่างๆเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิด

สารพิษกลุ่มอะฟลาท็อกซินเท่าที่มีรายงานในปัจจุบัน มีอยู่ถึง 18 ชนิด (Bhatnagar et al., 1994) แต่ที่มีความสำคัญและถูกกล่าวถึงมากที่สุดในอุตสาหกรรมนม คือ AFB1 ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ และ AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์นม

การตั้งชื่อชนิดของอะฟลาท็อกซิน จะตั้งตามคุณสมบัติการเรืองแสงบนแผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC) ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet light) ที่ความยาวคลื่นแสง 365-366 นาโนเมตร โดย AFB1 และ AFB2 จะเรืองแสงสีน้ำเงิน (Blue fluorescence) ส่วน AFG1 และ AFG2 จะเรืองแสงสีเขียวปนเหลือง (Yellowish green fluorescence) (Sargeant et al., 1961; Wogan, 1966) สูตรโครงสร้างของ AFB1, AFG1 และ AFM1 มีความแตกต่างจาก AFB2, AFG2 และ AFM2 ตรงที่ AFB1, AFG1 และ AFM1 มีพันธะคู่ (Double bond) ตรงตำแหน่งที่ 1 ในวงฟิวราน (Furan ring) แต่ AFB2, AFG2 และ AFM2 ไม่มี (รูปที่ 1) ส่วนความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง AFB1, AFB2, AFM1 และ AFM2 กับ AFG1 และ AFG2 คือวงแหวนตรงตำแหน่งที่ 5 ของ AFB1, AFB2, AFM1 และ AFM2 มีลักษณะเป็น Cyclopentanone ring แต่ของ AFG1 และ AFG2 จะมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม และมีกลุ่มแลคโตน (Lactone group) เป็นองค์ประกอบ สำหรับ AFM1 และ AFM2 เป็นสารเมทาโบไลต์ของ AFB1 และ AFB2 ตามลำดับ จึงมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันมาก แตกต่างกันเพียง AFM1 และ AFM2 มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ตรงตำแหน่ง 9a แต่ AFB1 และ AFB2 ไม่มี การที่อะฟลาท็อกซินมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันเช่นนี้ มีผลทำให้ความรุนแรงในการก่อให้เกิดความเป็นพิษแตกต่างกันออกไป (Wogan, 1966) อะฟลาท็อกซินที่มีพันธะคู่ใน

วงแหวนที่ 1 และมี Cyclopentanone ring ในตำแหน่งที่ 5 จะสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษรุนแรงที่ตับและไต โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง (IARC, 1993) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า AFB1 และ AFM1 มีความเป็นพิษสูงกว่าสารพิษอะฟลาท็อกซินตัวอื่น ๆ ในกลุ่ม

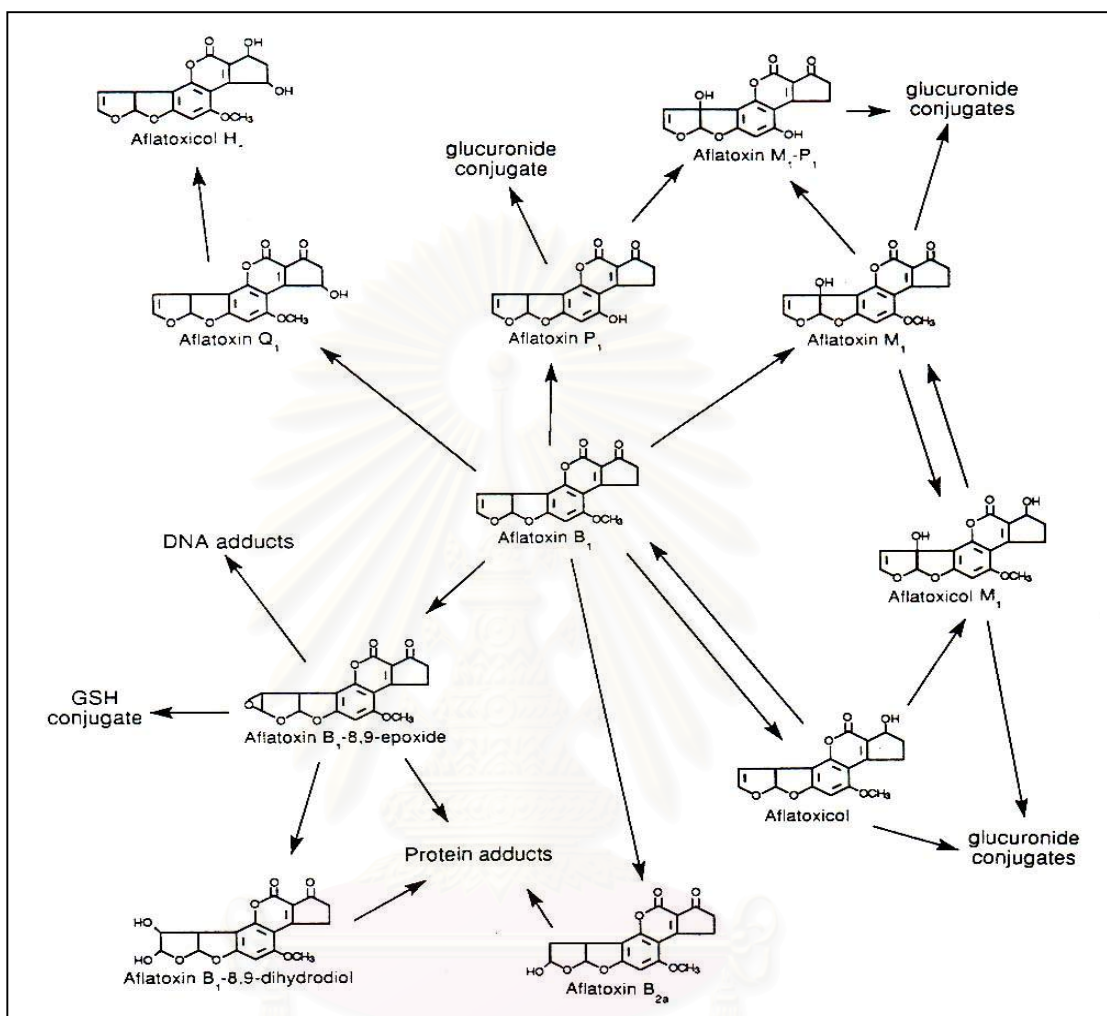
AFB1 มีสูตรทางเคมีคือ  $C_{17}H_{12}O_6$  มีน้ำหนักโมเลกุล 312 เป็นสารพิษที่มีความคงทนและมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ  $269^{\circ}C$  กระบวนการแปรรูปอาหารไม่สามารถทำลาย AFB1 ได้ทั้งหมด (Applebaum et al., 1982) เมื่อมนุษย์หรือสัตว์ได้รับ AFB1 เข้าไปในร่างกาย ส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก ผ่านเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตไปยังที่ตับ ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้เป็นเมทาโบไลต์หลายชนิด (รูปที่ 2) ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายในหลายระบบ เช่น มีความเป็นพิษรุนแรงต่อตับ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ มีฤทธิ์ก่อให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม ความผิดปกติของตัวอ่อน กดภูมิคุ้มกัน และเป็นสารก่อมะเร็งโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ที่ตับ ในปี ค.ศ. 1993 สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer, IARC) จัดให้ AFB1 เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 1 คือเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Group 1 : Carcinogenic to human)

AFM1 มีสูตรทางเคมีคือ  $C_{17}H_{12}O_7$  มีน้ำหนักโมเลกุล 328 และมีจุดหลอมเหลวสูงถึง  $299^{\circ}C$  AFM1 เป็นเมทาโบไลต์ที่สำคัญของ AFB1 เกิดขึ้นเนื่องจาก AFB1 เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ตรงบริเวณตำแหน่ง 9a (รูปที่ 2) AFM1 จะถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินอาหารซึ่งปนเปื้อนด้วย AFB1 (Applebaum et al., 1982) จากการศึกษาในโคโคนมโดย Rodricks และ Stoloff (1977) พบว่าปริมาณ AFB1 ในอาหารโคโคนมเปลี่ยนไปเป็น AFM1 ในน้ำนม ในอัตราส่วน 300 : 1 หรือมีค่าระหว่าง 0.2 – 3.2 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Seiber และ Blanc (1978) ได้ทำการสรุปผลการศึกษาจากหลายๆการทดลอง แล้วรายงานไว้ว่า อัตราการเปลี่ยนแปลงของ AFB1 ไปเป็น AFM1 มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อไม่นานมานี้ JECFA(2001) ได้ทำการทบทวนผลงานวิจัยต่างๆเกี่ยวกับอะฟลาท็อกซินเพื่อการประเมินความเสี่ยง และได้สรุปว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงของ AFB1 ไปเป็น AFM1 มีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 6.2 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาทางพิษวิทยาแสดงให้เห็นว่า AFM1 ทำให้เกิดมะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ในสัตว์ทดลอง (Wogan and Paglialunga, 1974; Hsieh et al., 1984; Cullen et al., 1987) Hendrick (1994) รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งของ AFB1 ในลูกเป็ดที่ได้รับ AFB1 ผสมในอาหารที่ความเข้มข้น 3 ppm โดยให้กินเป็นเวลานาน 14 เดือน พบว่าลูกเป็ด 8 ใน 10 ตัวมีเนื้องอกที่ตับ และการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งของ AFM1 ในหนู rat สายพันธุ์ Fisher พบว่า AFM1 มีฤทธิ์ก่อมะเร็งรุนแรงน้อยกว่า AFB1 ประมาณ 10 เท่า สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติได้จัดลำดับ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B คือ สารที่อาจจะทำให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ (Group 2B : Possibly carcinogenic to human) ทั้งนี้เนื่องจากยังขาดข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชัดเจนในมนุษย์และมีข้อมูลจำกัดในสัตว์ทดลอง (IARC, 1993) นอกจากนี้ยังมีการรายงานความเป็นพิษของ



AFM1 เพิ่มเติม พบว่า AFM1 มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxic) อีกด้วย (Codex Alimentarius Commission, 2001)



รูปที่ 2 เมทาโบไลต์ชนิดต่างๆ ของ AFB<sub>1</sub> (Hendrick, 1994)

## 2.2 การออกฤทธิ์และการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซินในร่างกายสัตว์

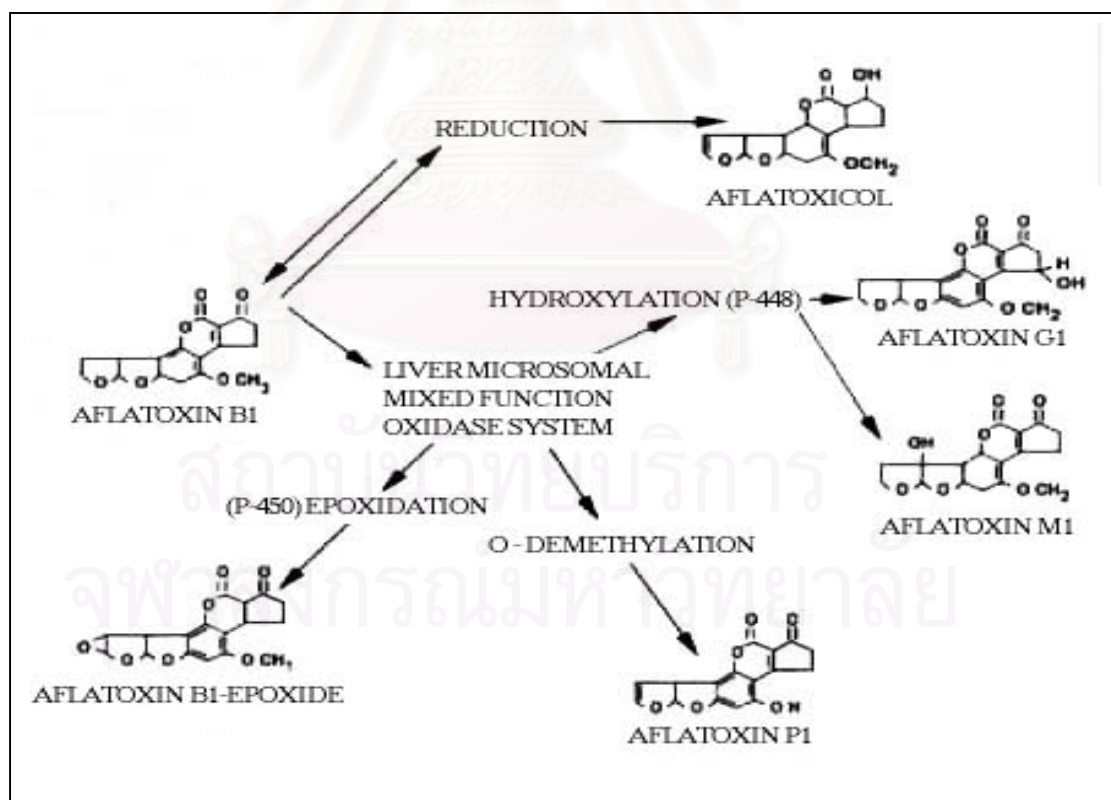
อะฟลาท็อกซินเมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์แล้วจะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก และบางส่วนจะถูกขับออกจากร่างกายสัตว์ โดยถูกกำจัดออกมากที่สุดทางอุจจาระ และรองลงมาคือทางปัสสาวะ (Shank and Wogan, 1965) หลังจากที่ AFB<sub>1</sub> ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะรวมตัวกับอัลบูมิน (Albumin) ในซีรัมแพร่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย พบว่ามีการสะสมมากที่สุดที่ตับและไต การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ AFB<sub>1</sub> เกิดขึ้นที่ตับเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถแบ่งออกตามการตอบสนองทางชีวเคมีของเซลล์ตับต่อสารเมทาโบไลต์ที่เกิดขึ้น ได้เป็น 2 ทางคือ

### 1. การเปลี่ยนแปลงเพื่อการกำจัดออกจากร่างกาย (Metabolic route)

เมื่อ AFB1 เข้าสู่ร่างกายแล้ว บางส่วนจะถูกกำจัดออกจากร่างกายได้โดยตรง โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใดๆ แต่ส่วนใหญ่แล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีโดยกลุ่มเอนไซม์ใน Endoplasmic reticulum ของเซลล์ตับที่เรียกว่า Drug metabolizing enzyme ได้เป็นสารเมทาโบไลต์ชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่จะเป็นพวก AFM1, AFP1 และ AFQ1 และส่วนน้อยจะเป็นพวก AFB2a และ RO (Aflatoxicol)

### 2. การเปลี่ยนแปลงเพื่อทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ตับ (Activation route)

นอกจาก AFB1 จะถูกเปลี่ยนแปลงได้เป็นสารเมทาโบไลต์ต่างๆ ดังกล่าวแล้ว ในเซลล์ตับยังสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงของ AFB1 โดยอาศัยการกระตุ้นของเอนไซม์และโคเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโครโซม (Microsome) ของเซลล์ ได้เป็นสารเมทาโบไลต์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ Aflatoxin B1-8,9-epoxide ซึ่งสามารถรวมตัวได้กับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DNA และ RNA เป็นผลทำให้ DNA เกิดความเสียหายหรือถูกทำลาย การสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดลดลง เป็นการกระตุ้นกระบวนการการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดพิษอย่างเรื้อรัง และการเกิดมะเร็งในเซลล์ตับ (Swenson et al., 1977, Ueno, 1983)



รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซินในเซลล์ตับ

### 2.3 การกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินเป็นปัญหาที่พบได้ทั่วโลก แต่ความรุนแรงของปัญหาจะแตกต่างกันตามลักษณะสภาพภูมิอากาศของแต่ละประเทศ ขณะนี้มีหลาย ๆ ประเทศได้คำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคต่อปัญหาการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม อีกทั้งข้อมูลทางพิษวิทยาของสารพิษอะฟลาท็อกซินก็มีเพิ่มมากขึ้น ๆ ทำให้หลาย ๆ ประเทศพยายามที่จะกำหนดระดับปริมาณของ AFM1 สูงสุดที่ยอมให้มีได้ในน้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นมขึ้นมา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมให้มีได้ของ AFM1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม ของประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ชนิดของผลิตภัณฑ์	ระดับสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (ppb)
เยอรมัน	Milk	0.01
สวีตเซอร์แลนด์	Milk, milk powder, cream	0.05
เบลเยียม	Milk	0.05
อียิปต์	Milk, milk product	0.05
สหภาพยุโรป	Milk, milk powder, infant food on milk basis	0.05
สหรัฐอเมริกา	Wholemilk, skimmilk, low fat milk	0.5
รัสเซีย	Milk, milk product	0.5
ไทย	Milk, milk product	ยังไม่ได้กำหนด

ที่มา : ดัดแปลงจาก FAO (1995) และ Boutrif and Canet (1998)

องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา กำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Maximum Residual Limit; MRL) ของ AFM1 ในน้ำนมดิบให้มีได้ไม่เกิน 0.5 ppb ในขณะที่ประเทศในสหภาพยุโรป กำหนดไว้ที่ระดับต่ำมากคือ 0.01–0.05 ppb และเมื่อปี ค.ศ.2001 JECFA ได้จัดทำการศึกษาประเมินความเสี่ยงเปรียบเทียบระหว่างการเกิดมะเร็งในคนจากการบริโภคน้ำนมที่มี AFM1 ปนเปื้อนในระดับ 0.05 ppb และ 0.5 ppb ซึ่งพบว่าความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งจากทั้งสองระดับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทำให้คณะกรรมการโคเด็กซ์ด้านวัตถุเจือปนและสารปนเปื้อนในอาหารในการประสานงานระหว่างองค์การอาหารและเกษตรนานาชาติและองค์การอนามัยโลก (Codex Committee on Food Additive and Contaminants, Joint FAO/WHO Food standard Programme; Codex) มีแนวโน้มที่จะกำหนดค่ามาตรฐาน MRL ของ AFM1 ในน้ำนมดิบไว้ที่ระดับ 0.5 ppb เพราะเป็นระดับที่ประเทศสมาชิกสามารถปฏิบัติได้ อย่างไรก็ตามได้มีการคัดค้านจากคณะผู้แทนในกลุ่มสหภาพยุโรปโดยอ้างเหตุผลว่า AFM1 เป็นสารก่อมะเร็งที่มีพิษต่อสารพันธุกรรม (Genotoxic agent) ซึ่งการได้รับสารชนิดนี้ในระดับใดๆ ก็อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภคได้ จึงควรควบคุมระดับของสารพิษจำพวกนี้ให้อยู่ในระดับต่ำที่สุดเท่าที่จะทำได้ (As Low As Reasonably Achievable; ALARA) ดังนั้นคณะกรรมการ Codex จึงให้กรรมการที่เกี่ยวข้องไปศึกษาในรายละเอียดเกี่ยวกับ AFM1 ใน

ด้านของ Genotoxic agent และวิธีจัดการความเสี่ยงของสารประเภทนี้ให้มากขึ้น เพื่อนำมาประกอบในการพิจารณาครั้งต่อไป ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศสมาชิกของ Codex และ WTO ซึ่งต้องนำข้อกำหนดและมาตรฐานสากลของ Codex มาใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรฐานอาหารภายในประเทศ

#### 2.4 รายงานการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์นม ในประเทศไทย

ในช่วงปี พ.ศ. 2533-2536 อูมาและดวงจันทร์ (2537) เก็บตัวอย่างน้ำมันดิบจากฟาร์มโคนมองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี จำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่ามี 12 ตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อน AFM1 โดยปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.15-0.80 ppb ทำการเก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ จากสหกรณ์โคนมหนองโพ จ.ราชบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง ตรวจพบมีการปนเปื้อน 9 ตัวอย่าง ปริมาณการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.22-6.56 ppb และเก็บผลิตภัณฑ์นมผงดัดแปลงสำหรับทารก จำนวน 12 ตัวอย่าง นมผงธรรมดาจำนวน 11 ตัวอย่าง นมผงขาดมันเนย จำนวน 8 ตัวอย่าง และอาหารเสริมครบถ้วนสำหรับเด็ก จำนวน 4 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 35 ตัวอย่าง จากซูเปอร์มาเก็ตและร้านค้าทั่วไป พบว่าการปนเปื้อนในนมผงธรรมดา จำนวน 1 ตัวอย่าง ปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบคือ 1.42 ppb

สุเทพและเบญจมาศ (2539) เก็บตัวอย่างน้ำมันดิบจากแม่โครายตัวจำนวนทั้งสิ้น 308 ตัวอย่าง นำมาสกัดด้วย C18 Sep-Pak Silicagel minicolumn อ่านผลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าการปนเปื้อนของ AFM1 ในทุก ๆ ตัวอย่าง ปริมาณการปนเปื้อน AFM1 มีค่าตั้งแต่ 0.01-1.44 ppb โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาการให้นม และปริมาณน้ำมัน

Saitanu (1997) ศึกษาการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำมันดิบและผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน 2538 ถึงเดือนมกราคม 2539 โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Radioimmunoassay พบว่าในน้ำมันดิบที่เก็บจากศูนย์รวมน้ำมันนั้นตรวจพบ AFM1 เป็นจำนวน 66 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 67 ตัวอย่าง โดยมีจำนวน 45 ตัวอย่างที่มีปริมาณ AFM1 อยู่ในช่วง >0-0.5 ppb และอีก 17 ตัวอย่าง มีปริมาณ AFM1 มากกว่า 0.5 ppb สำหรับผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรซ์ จำนวน 63 ตัวอย่าง นมยูเอชทีและนมสเตอริไรส์ ชนิดละ 60 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 183 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวน 153 ตัวอย่าง ตรวจพบปริมาณ AFM1 อยู่ในช่วง >0-0.5 ppb ส่วนที่เหลืออีกจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณ AFM1 มากกว่า 0.5 ppb ขึ้นไป

เบญจมาศ (2540) ได้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AFM1 ในน้ำมันดิบที่เก็บรายตัวจากแม่โคในช่วงแรกของการให้นม เขตอำเภอเขาชะลุ จังหวัดราชบุรี จำนวน 696 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัด AFM1 ด้วย Immunoaffinity column (AflaM1™, Vicam USA) แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง HPLC พบว่าการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำมันดิบจำนวน 681 ตัวอย่าง คิดเป็น 97.84% ปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 0-1.80 ppb และในปี พ.ศ. 2544 รายงานการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ AFM1 ในน้ำมันดิบที่เก็บราย

ตัว จากแม่โคในช่วงแรกของการให้นม จากสหกรณ์โคนมที่ตั้งอยู่ในเขต 2 จังหวัดสระแก้ว จำนวน 105 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของ AFM1 ในทุกๆตัวอย่าง ปริมาณการปนเปื้อนของ AFM1 ที่ตรวจพบมีค่าตั้งแต่ 0.04–0.39 ppb (เฉลี่ย  $0.15 \pm 0.07$  ppb) (เบญจมาศ, 2544)

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าสถานการณ์การปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบของประเทศไทยก่อนปี พ.ศ. 2540 มีระดับการปนเปื้อนสูง แต่เมื่อรัฐบาลมีการดำเนินการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินอย่างครบวงจร โดยเริ่มปฏิบัติการในภาคสนามเมื่อปี พ.ศ. 2539 (กรมปศุสัตว์, 2544) จะเห็นได้จากรายงานการสำรวจหลัง พ.ศ. 2540 ไปแล้วสถานการณ์การปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมดิบมีระดับลดลง ซึ่งในการดำเนินการแก้ไขการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในน้ำมนั้น ต้องอาศัยกลยุทธ์หลายอย่าง ได้แก่ การควบคุมระดับการปนเปื้อนของ AFB1 ในอาหารสัตว์ การนำระบบ HACCP มาใช้กับโรงงานผลิตอาหารสำหรับโคนม เพื่อควบคุมการปนเปื้อนในอาหาร และการตรวจสอบการปนเปื้อน AFM1 ในน้ำนมดิบก่อนนำเข้าสู่โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์นม ในทุกขั้นตอนของการควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินจะต้องมีการตรวจหาระดับการปนเปื้อนในอาหารอยู่เสมอ ซึ่งในปัจจุบันการตรวจหา AFB1 ในอาหารสัตว์และ AFM1 ในน้ำนมดิบนั้น ยังต้องอาศัยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากต่างประเทศซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปขึ้นใช้เองภายในประเทศจะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย และช่วยให้งานเฝ้าระวังการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินเป็นไปได้อย่างต่อเนื่องและทั่วถึง

## 2.5 วิธีการในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

วิธีการที่เชื่อถือได้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและหาปริมาณของ AFM1 เป็นสิ่งที่สำคัญในการควบคุมการปนเปื้อน AFM1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม ได้มีการรวบรวมวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 2) ซึ่งวิธีการต่างๆ ที่จะนำมาใช้นั้นจะต้องเป็นวิธีการที่เหมาะสมและเชื่อถือได้ เพราะปริมาณ AFM1 ที่ปนเปื้อนนั้นจะอยู่ในระดับต่ำมากเป็นส่วนต่อพันล้านส่วน (Part per billion, ppb) นอกจากนี้ยังควรเป็นวิธีที่สะดวก และรวดเร็วต่อการตรวจวิเคราะห์

วิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 ที่เป็นที่ยอมรับและเป็นที่ยอมรับของสากล สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ (Mary and Garnett, 1994) คือ

### 1. Thin-Layer Chromatography (TLC)

Association of Official Analytical Chemists; AOAC (1990) ได้กำหนดวิธีนี้ให้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาปริมาณอะฟลาท็อกซินชนิดต่างๆ เช่น AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 เป็นต้น แต่วิธี TLC มี Detection limit ต่ำจึงไม่เหมาะกับการตรวจอะฟลาท็อกซินในระดับต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง AFM1 ในน้ำนม เพราะการปนเปื้อนของ AFM1 โดยทั่วไปมีค่าอยู่ในช่วง 0–1 ppb และค่า MRL ที่ Codex จะกำหนดก็มีค่าเพียง 0.5 ppb

## 2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 โดยนำเอาวิธี HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ที่ดูดกลืนคลื่นแสงในช่วง 365-455 นาโนเมตร เป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานของการวิเคราะห์ เพราะมีความเที่ยงตรงและแม่นยำสูง

ทั้งวิธี TLC และ HPLC ต้องมีขั้นตอนในการสกัดและแยกอะฟลาท็อกซินที่ต้องการตรวจให้มีความบริสุทธิ์เพียงพอก่อนที่จะดำเนินการตรวจหาปริมาณ ซึ่งขั้นตอนการแยกอาจใช้ Solid phase extraction column และ Immunoaffinity column ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดในหัวข้อต่อไป

## 3. Immunochemical method

ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างไม่หยุดยั้ง ได้มีการนำเอาหลักการทางวิทยามุมคุ้มกันมาประยุกต์ใช้ร่วมกับทางเคมี โดยอาศัยหลักการจับของ Monoclonal หรือ Polyclonal แอนติบอดีกับแอนติเจนมาใช้ โดยเลือกใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับ AFM1 เป็นตัวจับบรรจุลงในคอลัมน์ ทำให้สามารถแยก AFM1 ออกจากสารอื่นๆได้ง่าย เพื่อนำมาใช้ตรวจหาปริมาณ AFM1 ได้อย่างสะดวก ภายในเวลาอันรวดเร็ว สำหรับวิธีการนี้ที่นำมาใช้ในการตรวจ AFM1 Chu (1990) ได้แบ่งออกเป็น 3 วิธีด้วยกันคือ

### 3.1 Radioimmunoassay (RIA)

เป็นวิธีที่ใช้หลักการเข้าแข่งจับกับแอนติบอดีระหว่าง AFM1 ที่ label ไว้ด้วยสารกัมมันตรังสี (Labelled AFM1) และ AFM1 ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ (Unlabeled AFM1) โดยปริมาณ AFM1 ในสารตัวอย่างจะวัดจากปริมาณของ Labelled AFM1 ที่ถูกจับไว้ในคอลัมน์ วิธีนี้มีความยุ่งยากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ต้องการเครื่อง Scintillation Counter ในการตรวจวัด และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้บอกได้เพียงเป็นช่วงของระดับการปนเปื้อน แต่ไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าปริมาณการปนเปื้อนมีอยู่เท่าใด

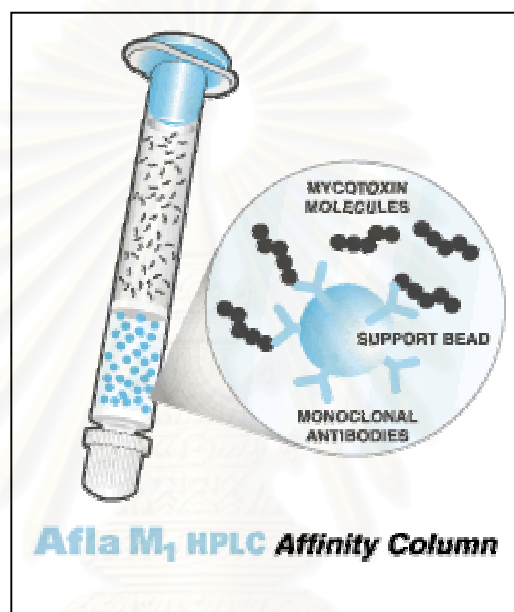
### 3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

วิธีการนี้ใช้ Polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ AFM1 เคลือบอยู่บนจานหลุม โดยหยดสารตัวอย่างที่ผ่านการสกัด AFM1 มาแล้วลงในจานหลุมทดสอบ เติม Substrate ตามลงไป โดย Substrate นี้จะเป็นตัวแข่งจับ Polyclonal antibody กับ AFM1 ใส่เอนไซม์ลงไปอีกครั้งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับ Substrate จะได้สารประกอบที่มีสี ซึ่งการอ่านผลนั้นจะดูที่ความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับสีมาตรฐาน ถ้าสีที่เกิดขึ้นเข้มขึ้นมาก แสดงว่ามี AFM1 ในปริมาณน้อย แต่ถ้าสีที่เกิดขึ้นเจือจางกว่าสีมาตรฐาน แสดงว่ามีปริมาณ AFM1 สูง จากนั้นนำเข้าเครื่องสเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometer) เพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนของ AFM1 ออกมาเป็นตัวเลข ข้อดีของวิธีนี้คือ ถ้าตัวอย่างที่จะนำมาตรวจสอบมีจำนวนมากค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์จะต่ำ และขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างทำได้ง่าย และสะดวก แต่ก็มีข้อเสียคือค่าที่อ่านได้จะบอกเป็นช่วง ไม่สามารถระบุระดับการปนเปื้อนได้ชัดเจน

### 3.3 Immunoaffinity Column (IAC)-HPLC

หลักการคือการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับ AFM1 บรรจุลงในคอลัมน์สำหรับสกัด AFM1 ออกจากน้ำนม เมื่อผ่านตัวอย่างน้ำนมที่ได้ทำการสกัด AFM1 ลงในคอลัมน์ ก็จะเกิดการ

จับกันระหว่างแอนติบอดีกับ AFM1 อย่างจำเพาะเจาะจง สิ่งเจือปนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ AFM1 ก็จะถูกล้างออกจากคอลัมน์ จากนั้น AFM1 ก็จะถูกชะออกจากแอนติบอดีด้วยสารละลายที่เหมาะสม ทำให้ได้สารละลาย AFM1 ที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 ด้วย HPLC ประโยชน์ของวิธีนี้คือ สะดวก รวดเร็ว ปลอดภัย สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของปริมาณ AFM1 ตั้งแต่ระดับ 10 ppt ถึง 3 ppb มี % Recovery สูงถึง 75-90% (Vicam, 1997) แต่ก็มีข้อเสียคือ คอลัมน์ชนิดนี้มีอายุการใช้งานจำกัดเพียง 1 ปีหลังจากวันผลิต การเก็บรักษาต้องเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสมคือประมาณ 4-5°C คอลัมน์ที่ใช้แล้วอาจนำมาใช้ได้อีกครั้งหนึ่งแต่ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะลดลง และที่สำคัญคือคอลัมน์มีราคาแพง ประมาณ 500 บาทต่อหนึ่งคอลัมน์



รูปที่ 4 แสดง Immunoaffinity Column สำหรับการตรวจปริมาณ AFM1

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 วิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

Product type	Clean-up	Detection Method	Detection limit (ng/g)	Reference อ้างโดย Mary and Garnett (1994)
Milk	Liquid partition	TLC, 1D	0.5	Serralheiro and Quinta (1985)
Milk, Yogurt	Alkaline extraction	TLC, 1D	0.2	Dominguez et al.(1987)
Cheese	C18 cartridge	TLC, 2D	0.1	Bijl et al. (1987)
Milk	C18, silica, Bond-Eult cartridge	TLC, BiD	0.005	Kubicek et al. (1988)
Milk	C18 cartridge	LC, RP PCD-TFA	0.002	Carisano and Torre (1986)
Powdered milk	IAC	LC, RP	$5 \times 10^{-5}$	Mortimer et al. (1987a)
Cheese	IAC	LC, RP	0.005	Sharman et al (1989)
Milk	IAC	LC, RP	0.05	Hansen (1990)
Milk	IAC	Bromination Fluorometer	0.05	Hansen (1990)
Milk	C18, Bond-Elut	ELISA	0.1	Jackman (1985)
Milk	IAC	ELISA	0.1	Kaveri et al. (1987)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Mary and Garnett (1994)

TLC, Thin Layer Chromatography; LC, Liquid Chromatography;

IAC, Immunoaffinity column; 1D, One dimension; 2D, Two dimension, BiD, Bidirectional;

RP, Reversed phase; PCD, Postcolumn derivatization; TFA, Trifluoroacetic acid



## 2.6 ไฮเดรตเตทโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกต

( Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate ; HSCAS)

คณะกรรมการจัดทำพจนานุกรมธรณีวิทยา (2530) ให้ความหมายของคำว่า “ซีโอไลท์” ไว้ว่าหมายถึง

1. กลุ่มแร่ไฮดรอสอลูมิโนซิลิเกต (Hydrous aluminosilicates) ซึ่งมีโซเดียม แคลเซียม หรือโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบ มีอัตราส่วน  $Al + Si:O$  (ในโครงสร้างซิลิเกต) เท่ากับ 1:2 แร่ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการรับหรือปล่อยน้ำออกจากโครงสร้างได้อย่างง่ายดาย ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแร่ชนิดนี้คือ เป็นแร่ที่เกิดกับที่ (Authigenic mineral) อยู่ในหินตะกอนที่เกิดในทะเลสาบน้ำเค็ม ทะเลลึก และโดยเฉพาะในชั้นหินทัฟฟ์ ผลึกที่สมบูรณ์ของแร่ชนิดนี้จะพบได้ในโพรงหินบะซอลท์

2. สารซิลิเกตในธรรมชาติ เช่น กลอโคไนต์หรือสารสังเคราะห์จำพวกโซเดียมอลูมิโนซิลิเกตสามารถนำไปใช้ในการปรับน้ำกระด้างให้เป็นน้ำอ่อน และใช้ดูดซึมก๊าซหรือทำให้สารแห้งตัวเร็วขึ้น นอกจากนี้คำว่า ซิลิเกต ยังมีความหมายรวมไปถึงกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ (Organic compound) ต่างๆ เช่น สารประกอบซัลโฟเรต (Sulfurate) หรือพวกยางสนด้วย

Mumpton and Fishman (1977) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติของซีโอไลท์ที่สำคัญ แบ่งออกเป็น 2 ประการ คือ

1. คุณสมบัติในการดูดซึม (Absorption properties) สารซีโอไลท์มีช่องว่างขนาดเล็กอยู่ภายในเป็นจำนวนมาก โดยจะมีโมเลกุลของน้ำและประจุบวกชนิดต่างๆ อยู่ภายใน พร้อมทั้งจะเกิดการแลกเปลี่ยนในการจับกับประจุหรือโมเลกุลของสารที่มีขนาดเหมาะสมกับช่องว่างดังกล่าว จึงเรียกสารซีโอไลท์ว่าเป็นตะแกรงโมเลกุล (Molecular sieve)

2. คุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange properties) สารซีโอไลท์จะมีโครงสร้างเป็นลักษณะผลึกสามมิติ ซึ่งเป็นโครงข่ายแบบ Tetrahedron ของอลูมิเนียม และซิลิกาที่มีประจุบวก ซึ่งจะทำให้เกิดประจุลบบนโครงสร้างขึ้น จึงต้องการประจุบวกเพื่อให้เกิดสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า โดยประจุบวกส่วนใหญ่มักจะเป็นธาตุในหมู่ที่ 1 และหมู่ที่ 2 ในตารางธาตุ (Alkali and Alkali earth cation) เช่น  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  และ  $Ba^{2+}$  เป็นต้น ความจุในการแลกเปลี่ยนประจุยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการเช่น ชนิดของประจุบวก ความสามารถของประจุในการเข้าจับในตำแหน่งที่เหมาะสม นอกจากนี้สารซีโอไลท์จะมีความชอบในการจับสารต่างๆ ตามลำดับไม่เท่ากัน เช่น  $Cs > Rb > NH_4 > Ba > Fe > Mg$  เป็นต้น

Cronstedt (1975) ได้รายงานไว้ว่า “Zeolite” มาจากภาษากรีก 2 คำคือ “Zeo” = to boil และ “Lithos” = stone เมื่อนำมารวมกันจะแปลว่า “Boiling stone” หรือหินที่สามารถเดือดได้ โดยคุณสมบัติชนิดนี้ จะพบได้เมื่อนำไปต้มให้ความร้อน จะเกิดฟองเดือดผุดขึ้นมาให้เห็น โดยทั่วไปแล้วสารซีโอไลท์ในธรรมชาติจะมีประมาณ 48 ชนิด และมีอีกหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ในห้องปฏิบัติการ สารซีโอไลท์แต่ละชนิดก็จะมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ และทางเคมีแตกต่างกัน การนำมาประยุกต์ใช้งานจะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติเฉพาะตัว

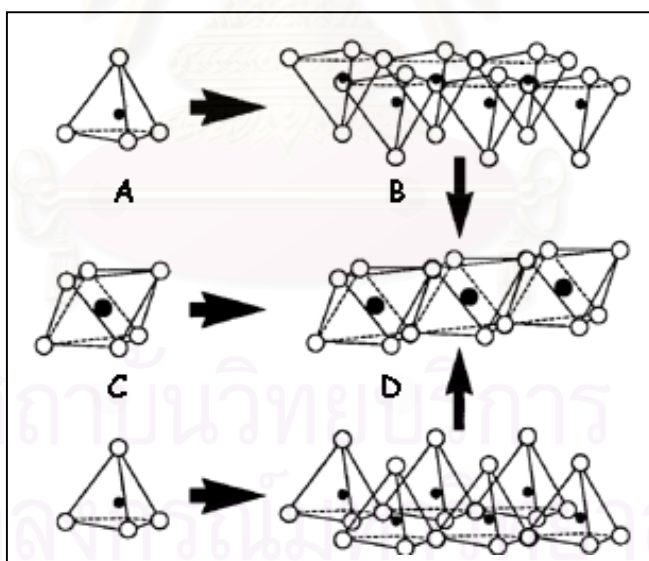
ของสารซีโอไลต์แต่ละชนิด ตามแหล่งกำเนิด ดังนั้นควรจะมีการทดสอบคุณสมบัติของสารซีโอไลต์ชนิดนั้น ๆ ก่อนนำมาประยุกต์ใช้

มอนท์โมริลโลไนท์ (Montmorillonite) เป็นสารซีโอไลต์ชนิดหนึ่ง เพิ่มพูน (2538) อธิบายถึงแร่ชนิดนี้ไว้ว่า เป็นผลึกของแร่ทุติยภูมิ ในกลุ่มของแร่ซิลิเกต ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในกลุ่มดินเหนียว (Silicate clay mineral) มักมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 2 ไมครอน ซึ่งแร่ซิลิเกตในกลุ่มดินเหนียวนี้สามารถแบ่งออกเป็นแร่ชนิดต่างๆ มากมายตามองค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างที่แตกต่างกัน แต่หน่วยพื้นฐานที่สำคัญของแร่ดินเหนียวซิลิเกต มี 2 หน่วยคือ

1. หน่วย Tetrahedron ซึ่งเกิดจากการเกาะตัวของออกซิเจน 4 อะตอม เกิดเป็นรูปที่มี 4 ด้าน ภายในมีช่องว่าง ซึ่งประจุบวกจะเข้าไปเกาะอยู่ (รูปที่ 5A)

2. หน่วย Octahedron เกิดจากการเกาะตัวของออกซิเจน 6 อะตอม เกิดเป็นรูปที่มี 8 ด้าน ภายในมีช่องว่าง ซึ่งประจุบวกจะเข้าไปเกาะอยู่ ประจุบวกที่มักพบในหน่วยโครงสร้างของแร่ดินเหนียวนี้มักได้แก่  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  และ  $Fe^{2+}$  เป็นต้น (รูปที่ 5C)

หน่วยโครงสร้างพื้นฐานแต่ละชนิดจะต่อเรียงเข้าด้วยกันได้เป็นแผ่น (Sheet) เกิดขึ้น หน่วย Tetrahedron มักจะมี  $Si^{4+}$  เป็นประจุบวกอยู่ในช่องว่างของหน่วย เมื่อต่อเข้าด้วยกันเป็นแผ่นจึงมีชื่อเรียกว่า Silica tetrahedrol sheet ส่วนหน่วย Octahedron เมื่อมาต่อกันเป็นแผ่นเรียกว่า Octahedrol sheet ซึ่งจะมีโครงสร้างต่างกันออกไปตามประจุบวกที่อยู่ภายใน (รูปที่ 5 )



รูปที่ 5 รูปร่างของหน่วยพื้นฐานของแร่ซิลิเกตที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในกลุ่มดินเหนียว

- A : หน่วย Tetrahedron รูปเดี่ยว
- B : หน่วย Tetrahedrol sheet
- C : หน่วย Octahedron รูปเดี่ยว
- D : หน่วย Octahedrol sheet

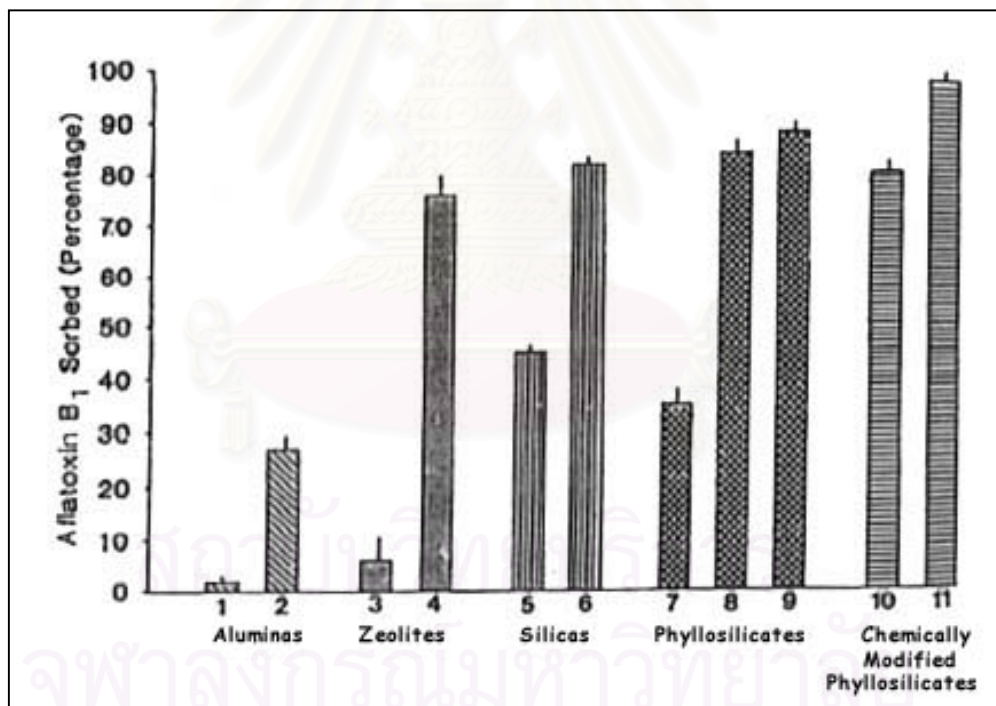
สำหรับแร่มอนโทโมริลโลไนท์ มีโครงสร้างประกอบด้วย Silica tetrahedrol sheet 2 แผ่น และมี Octahedrol sheet 1 แผ่นอยู่ตรงกลางระหว่าง Silica tetrahedrol sheet ทั้งสอง จึงเรียกรวมแร่ดินเหนียวซิลิเกตที่มีโครงสร้างลักษณะนี้ว่า แร่ประเภท 2:1 (รูปที่ 5) ด้านนอกสุดของชั้นโครงสร้างประกอบด้วยออกซิเจนทั้งหมด เมื่อชั้นแร่วางซ้อนกันจะมีแรงยึดน้อยมาก โมเลกุลของน้ำและประจุต่างๆ สามารถเข้าไปอยู่ในระหว่างชั้นของโครงสร้างได้ ทำให้โครงสร้างเกิดการขยายตัวออกทางด้านตั้งเมื่ออยู่ในสภาพเปียก และหดตัวเมื่ออยู่ในสภาพแห้ง ซึ่งคุณสมบัติประการนี้เอง ทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางอาหารสัตว์ได้ โดยเสริมแร่ประเภทนี้ลงในอาหารสัตว์ในระดับที่เหมาะสม เมื่อสัตว์กินเข้าไปแร่มอนโทโมริลโลไนท์ ก็จะเกิดการขยายตัวในทางเดินอาหารของสัตว์ เนื่องจากเกิดการดูดซึมน้ำ (Osmotic swelling) เป็นเหตุให้การไหลผ่านของอาหารในลำไส้ช้าลง โอกาสที่อาหารจะถูกย่อยและถูกดูดซึมจึงเพิ่มมากขึ้น (Van Olphen, 1963)

สารประเภทอลูมิเนียมซิลิเกต (Aluminosilicates) เป็นแร่ในกลุ่มทุติยภูมิ (Secondary mineral) เกิดขึ้นเนื่องจากการสลายตัวของแร่ปฐมภูมิ (Primary mineral) ซึ่งเกิดจากการเย็นตัวของของเหลวจากภายในใจกลางของโลก หรืออาจเป็นแร่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จากส่วนประกอบที่ได้จากการสลายตัวของแร่ต่างๆ โดยเกิดขบวนการทางเคมี ทำให้องค์ประกอบเดิมของแร่เปลี่ยนไปกลายเป็นแร่ชนิดใหม่ที่มีความคงทนต่อการสลายตัวมากขึ้น แร่จำพวกซิลิเกตในธรรมชาติพบว่ามีโครงสร้างแบบต่างๆ กัน ซึ่งจะก่อให้เกิดการสลายตัวได้ไม่เท่ากัน การยึดกันของหน่วย Tetrahedron นี้ จะก่อให้เกิดพันธะ (Bond) ระหว่าง -Si-O-Si- ขึ้น ยิ่งพันธะแบบนี้มากขึ้นเท่าใด โครงสร้างก็จะยิ่งแข็งแรงและสลายตัวได้ยากมากขึ้นเท่านั้น หากจะจำแนกชนิดของโครงสร้างของแร่ซิลิเกตออกตามลักษณะการจับตัวของ Tetrahedron เรียงลำดับความทนทานต่อการสลายตัวจากน้อยไปมาก จะจำแนกได้ตามนี้คือ

1. Neosilicates ประกอบด้วย Tetrahedron 1 หน่วยต่อกัน โดยรวมใช้ออกซิเจน 1 ตัว
2. Solosilicates ประกอบด้วย Tetrahedron 2 หน่วยต่อกัน โดยรวมใช้ออกซิเจน 1 ตัว
3. Inosilicates ประกอบด้วย Tetrahedron ต่อกันเป็นแถวเดี่ยว โดยรวมใช้ออกซิเจน 2 ตัว หรือประกอบด้วย Tetrahedron ต่อกันเป็นแถวคู่ โดยรวมใช้ออกซิเจน 2 ตัว และ 3 ตัวสลับกันไป
4. Cyclosilicates ประกอบด้วย Tetrahedron หลายหน่วยต่อกันเป็นวง โดยรวมใช้ออกซิเจน 2 ตัว
5. Phyllosilicates ประกอบด้วย Tetrahedron ต่อกันเป็นผืน โดยรวมใช้ออกซิเจน 3 ตัว
6. Tectosilicates ประกอบด้วย Tetrahedron หลายหน่วยต่อกัน โดยรวมใช้ออกซิเจนทั้ง 4 ตัว

## 2.7 รายงานการใช้ไฮเดรทเต็ทโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกต (HSCAS) เพื่อลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน

Phillips et al. (1988) ทำการทดลองศึกษาความสามารถในการดูดซับอะฟลาท็อกซินในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สารดูดซับ (Sorbent material) ชนิดต่างๆ แยกตามองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้คือ Aluminas, Zeolites, Silicas, Phyllosilicates และ Chemically modified phyllosilicates นำมาทดลองดูดซับสารละลายอะฟลาท็อกซิน ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการดูดซับอะฟลาท็อกซินของสารดูดซับชนิดต่างๆ ในแต่ละกลุ่มเป็นค่าสูงสุดและต่ำสุด (รูปที่ 6) ผลการทดลองพบว่าความสามารถในการดูดซับอะฟลาท็อกซินของสารดูดซับชนิดต่างๆ ที่ใช้ทดสอบ มีค่าระหว่าง 1.2 ถึง 98.1 % โดยพบว่า HSCAS (Novasil) มีความสามารถในการดูดซับอะฟลาท็อกซินมากกว่า 80 % และเมื่อนำมาทำการสกัดอะฟลาท็อกซินที่ถูกดูดซับออกจากโมเลกุลของ HSCAS พบว่าสามารถสกัดออกได้น้อยกว่า 10% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพันธะที่เกิดจากการจับกันระหว่างอะฟลาท็อกซินและ HSCAS มีความแข็งแรง และสารประกอบที่เกิดขึ้นนี้จะมีความคงตัวในน้ำกลั่นที่มี pH เท่ากับ 2, 7 และ 10 และที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถของสารดูดซับชนิดต่างๆ ในการดูดซับ AFB<sub>1</sub> ในห้องปฏิบัติการ โดย 1 = Boehmite, 2 = Versal 250, 3 = Synthetic zeolite, 4 = Natural zeolite, 5 = Sipernat 50S, 6 = Synthetic silica, 7 = Water ground muscovite mica 8 = Novasil (HSCAS), 9 = Pyran RG 140, 10 = Manganese-exchanged phyllosilicate 11 = Filtrol grade 105 (Acid-activated bleaching earth) ที่มา : Phillips et al. (1988)

รายงานการใช้ HSCAS ในสุกร : Harvey et al. (1989) ทำการทดลองโดยแบ่งสุกรเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ให้กินอาหารสุกรที่ปราศจากอะฟลาท็อกซินและเติมด้วย HSCAS ที่ระดับ 0, 0.5 และ 2.0 % และกลุ่มที่ 2 ให้อาหารสุกรที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในขนาด 3 ppm และเติม HSCAS ในระดับเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 3 ให้กินอาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน แต่ไม่เติม HSCAS และกลุ่มที่ 4 ให้กินอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินแต่ไม่เติม HSCAS ผลการทดลองพบว่าสุกรที่ได้รับอะฟลาท็อกซินเพียงอย่างเดียวจะมีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของสุกรในกลุ่มที่ 1, 2 ไม่มีความแตกต่างกับสุกรในกลุ่มที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่า การทำงานของ Alkaline phosphatase และ Gamma-glutamyl transferase ในซีรัม รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นในสุกรที่ได้รับอะฟลาท็อกซิน แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในสุกรกลุ่มที่ 1 และ 2 ส่วนในสุกรกลุ่มที่ 4 ยังพบว่า ค่าความเข้มข้นของยูเรียไนโตรเจน อัลบูมิน โปรตีนทั้งหมด แคลเซียม ฟอสฟอรัส คอลเลสเตอรอล กลูโคส และความสามารถในการจับธาตุเหล็กในซีรัมมีค่าลดลง น้ำหนักของตับจะลดลง และพบรอยโรคที่ตับเมื่อเปรียบเทียบกับสุกรปกติซึ่งจะไม่พบลักษณะดังกล่าวนี้ในสุกรที่ได้รับอะฟลาท็อกซินและเสริมด้วย HSCAS ทั้งระดับ 0.5 และ 2.0 % ในสูตรอาหาร Beaver et al. (1990) ทำการศึกษาโดยเติม HSCAS ระดับ 0.5 % ลงในอาหารสุกรที่มีการปนเปื้อน AFB1 และ AFB2 ที่ระดับ 500-600 ppb ผลการศึกษาพบว่า HSCAS สามารถช่วยลดปริมาณ AFM1 ในตับ ไต และกล้ามเนื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับปริมาณ AFB1 ในตับและไต จะมีค่าเท่าเดิม แต่จะลดลงเฉพาะในกล้ามเนื้อเท่านั้น

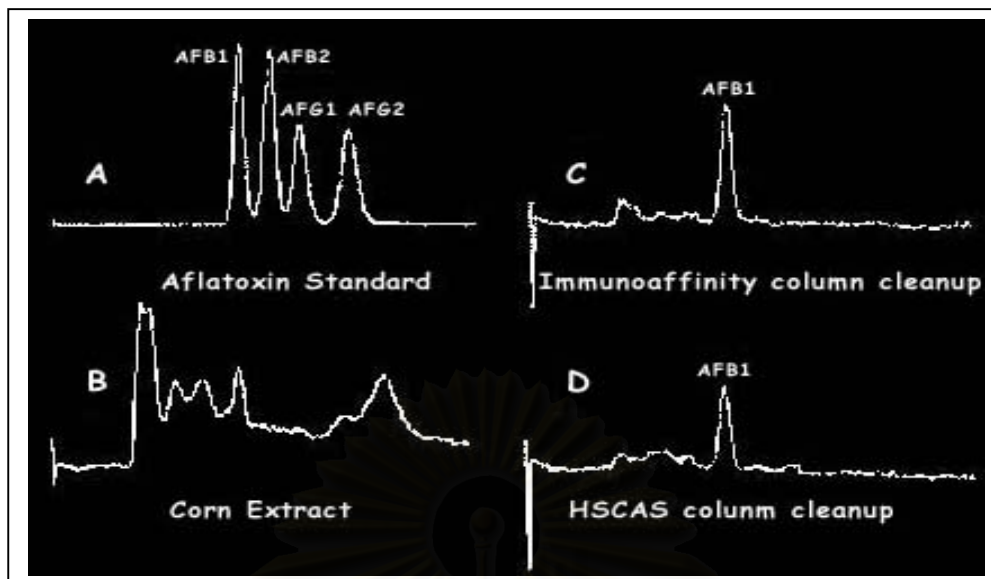
รายงานการใช้สาร HSCAS ในสัตว์ปีก : Kubena et al. (1990a) ทดลองใช้ HSCAS และ Activated charcoal เพื่อลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่กระทง โดยเติม HSCAS หรือ Activated charcoal ลงในสูตรอาหารที่ปราศจากการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน และสูตรอาหารที่มีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินระดับ 7.5 ppm พบว่า AFB1 มีผลทำให้ไก่กระทงในช่วงอายุ 0-3 สัปดาห์ มีน้ำหนักตัวลดลงประมาณ 21-38 % และไก่พันธุ์ Leghorn ในช่วงอายุ 0-4 สัปดาห์ มีน้ำหนักตัวลดลง 20 % เมื่อเพิ่ม HSCAS ในสูตรอาหารที่มีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซิน จะช่วยให้ไก่เจริญเติบโตได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเสริม Activated charcoal พบว่าไม่สามารถลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินได้ ต่อมา Kubena et al. (1990b) ได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยเติมสารประเภทอลูมิเนียมซิลิเกตหลายชนิดในระดับ 0.5 % ลงในสูตรอาหารไก่กระทงที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินที่ระดับ 3.5 และ 5 ppm พบว่าไก่กระทงที่ได้รับสารพิษและไม่มีการเติมสารประเภทอลูมิเนียมซิลิเกตลงในสูตรอาหาร จะมีน้ำหนักตัวลดลง 15-30 % และพบว่าในสูตรอาหารที่มีการเติม HSCAS และ Mordenite จะช่วยลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินที่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวได้ประมาณ 40-70% โดยสรุปว่า HSCAS สามารถลดความเป็นพิษได้ดีกว่า Mordenite และในปีถัดมาได้ทำการทดลองในไก่วง ตั้งแต่อายุ 1 วันถึง 3 สัปดาห์ โดยเติม HSCAS ในสูตรอาหารไก่วงระดับ 0.5 % ลงในอาหารมีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินที่ระดับ 0.5 หรือ 1 ppm ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวของไก่วงจะลดลงประมาณ 19 % และ 51 % เมื่อได้รับสารพิษที่ระดับ 0.5 และ 1 ppm ตามลำดับ และไก่วงที่ได้รับสารพิษที่ระดับ 1 ppm จะมีอัตราการตายสูงถึง 88 % การเสริม HSCAS ในระดับ 0.5 % จะช่วยลดอัตราการตายลง

68 % และช่วยลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในระดับ 0.5 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kubena et al., 1991)

**รายงานการใช้ HSCAS ในสัตว์กระเพาะรวม :** Harvey et al. (1991) ได้ทำการทดลองโดยเติม HSCAS 2 % ลงในสูตรอาหารชั้นของแกะเพศผู้ตอนแล้ว น้ำหนักประมาณ 34 กิโลกรัม ที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนอยู่ 2.6 ppm ให้กินอาหารเป็นระยะเวลา 42 วัน ผลการทดลองพบว่าแกะที่กินสูตรอาหารชั้นที่ไม่มีการเติม HSCAS จะมีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่แกะกลุ่มที่กินสูตรอาหารที่มีสารพิษและเติม HSCAS จะมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มเปรียบเทียบที่กินอาหารปราศจากสารพิษ แสดงให้เห็นว่า HSCAS ในระดับ 2 % สามารถลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในระดับ 2.6 ppm ในแกะได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในโคนมพบว่า การเติม HSCAS ระดับ 1% ลงในสูตรอาหารชั้นที่มีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินระดับ 100 ppb จะช่วยลดปริมาณ AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมได้ถึง 42% (Harvey et al., 1988)

**รายงานการใช้ HSCAS ในการดูดซับ AFM1 :** Ellis และคณะ รายงานผลการศึกษาในปี ค.ศ. 1991 (อ้างโดย Phillips et al., 1995) พบว่า HSCAS ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 % สามารถดูดซับ AFM1 ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมดิบตามธรรมชาติได้ โดยไม่มีผลทำให้คุณค่าทางสารอาหารในน้ำนมดิบเปลี่ยนแปลงไป และนอกจากนี้ผลการศึกษาของ Phillips และคณะพบว่า HSCAS มีความสามารถในการดูดซับ AFB1 ได้มากกว่า AFM1 ประมาณ 2.5 เท่า โดยสามารถดูดซับ AFB1 ได้ 420 nmol/mg of HSCAS และดูดซับ AFM1 ได้ 156 nmol/mg of HSCAS (Phillips et al., 1995)

Phillips et al. (1995) ได้นำ HSCAS มาประยุกต์ใช้ในการแยก AFB1 ออกจากข้าวโพด โดยนำ HSCAS มาเคลือบไว้บนผิวของเม็ดทรายเพื่อเพิ่ม Hydraulic activity และทำให้การกรองผ่านของสารละลายดีขึ้น แล้วนำทรายที่เคลือบไว้ด้วย HSCAS มาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเล็ก เพื่อใช้สำหรับสกัดแยก AFB1 พบว่าการแยก AFB1 ออกจากสารอื่นๆ โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ HSCAS ให้ผลดี เมื่อเปรียบเทียบกับ การแยกโดยใช้ Immunoaffinity column (รูปที่ 7) และในปัจจุบันการนำเอา HSCAS มาบรรจุลงในคอลัมน์เพื่อใช้สำหรับการแยก AFB1 กำลังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาเพื่อทำเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปในการวิเคราะห์หาปริมาณ AFB1 (Phillips, 1999)



รูปที่ 7 แสดง HPLC Chromatogram จากการศึกษาของ Phillips et al. (1995)

- A : แสดง Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2
- B : แสดง Chromatogram ของสารสกัดจากข้าวโพด
- C : แสดง Chromatogram ของสาร AFB1 ที่ผ่านการสกัดโดยใช้ Immunoaffinity column
- D : แสดง Chromatogram ของสาร AFB1 ที่ผ่านการสกัดโดยใช้ HSCAS column

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

###### 3.1.1.1 น้ำนํดิบ

###### 3.1.1.2 สาร Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate (NovaSilplus™)

###### 3.1.1.3 สารมาตรฐาน AFM1 (Sigma Chemical, USA)

##### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3 แสดงชนิด คุณภาพ สูตรทางเคมี และบริษัทผู้ผลิตสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Chemical name	Grade	Chemical formula	บริษัทผู้ผลิต
Benzene	HPLC	$C_6H_6$	CARLO ERBA
n-Hexane	HPLC	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	LAB SCAN
Cyclohexane	HPLC	$C_6H_{10}$	LAB SCAN
Toluene	HPLC	$(C_6H_5)CH_3$	LAB SCAN
Diethylether	HPLC	$(C_2H_5)_2O$	LAB SCAN
Methylene chloride	HPLC	$CH_2Cl_2$	LAB SCAN
Isopropanol	HPLC	$CH_3CH_2(OH)CH_3$	LAB SCAN
Chloroform	HPLC	$CH_3Cl$	LAB SCAN
Methanol	HPLC	$CH_3OH$	LAB SCAN
Acetonitrile	HPLC	$CH_3CN$	LAB SCAN
Water	HPLC	$H_2O$	LAB SCAN
Methanol	Analytical reagent	$CH_3OH$	MERCK
Acetonitrile	Analytical reagent	$CH_3CN$	MERCK



### 3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.1.3.1 กระบอกตวงขนาด 25, 50, 100, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- 3.1.3.2 บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.3.3 หม้อสแตนเลสขนาด 3 ลิตร
- 3.1.3.4 Micropipette ขนาด 20, 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร
- 3.1.3.5 Test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 3.1.3.6 Syringe แก้วขนาด 10 มิลลิลิตร
- 3.1.3.7 Plastic centrifuge tube ขนาด 50cc พร้อมฝาเกลียวปิด
- 3.1.3.8 AflaM1™ Immunoaffinity column (Vicom, USA)
- 3.1.3.9 HPLC Column Inertsil 4.6 x 150 mm. 5um (C18) (Waters, USA)
- 3.1.3.10 RC-membrance, Syringe filter, PP-housing 13 mm. 0.45 um  
(Sartorius, Germany)
- 3.1.3.11 RC-Vliesverstarkt 47mm. 0.45um (Sartorius, Germany)
- 3.1.3.12 HPLC-vial พร้อมฝาเกลียว ขนาด 2 cc สำหรับใส่สารตัวอย่าง

### 3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.1.4.1 High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence detector  
ซึ่งประกอบด้วย Shimadzu LC-10AC pump, Shimadzu Sil-10A autoinjector  
และ Shimadzu RF-10A spectrofluorometric detector (Shimadzu, Japan)
- 3.1.4.2 Centrifuge (International Equipment Company, IECCR-6000)
- 3.1.4.3 Vacuum pump (Gelmansciences, Model 13156)
- 3.1.4.4 Vortex Mixer
- 3.1.4.5 Sonicator
- 3.1.4.6 Water bath
- 3.1.4.7 เครื่องชั่งตวง 4 ตำแหน่ง

### 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยประกอบด้วย 2 ระยะคือ

ระยะที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของ HSCAS ในการดูดซับ AFM1

ระยะที่ 2 ศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

#### ระยะที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของ HSCAS ในการดูดซับ AFM1

ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการดูดซับ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน

การทดลองที่ 2 ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณ HSCAS ที่เหมาะสมต่อการดูดซับ AFM1 ในน้ำนมดิบ

#### การทดลองที่ 1 ศึกษาการดูดซับ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลองทั้งหมด 13 หลอด ในแต่ละหลอดบรรจุสารละลาย AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร (10 ppb)

2. ชั่งสาร HSCAS ตัวอย่างละ 0.5, 1.0, 1.5, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.2 และ 3.4 กรัมตามลำดับ เติมลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย AFM1 ตัวอย่างละ 1 หลอด และหลอดที่เหลือไม่ต้องเติมสารใดๆ (0 กรัม) เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม

3. นำหลอดทดลองที่ใส่สารตัวอย่างแล้วไปเขย่าผสมด้วยเครื่องเขย่าหลอด (Mixer) ประมาณ 5 นาที

4. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

5. แยกเก็บสารละลายส่วนใส (Supernatant) นำไปกรองด้วย Membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน

6. ทำการตรวจหาปริมาณ AFM1 ในสารละลายที่กรองได้ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส Mobile phase ที่ใช้มีสัดส่วนดังนี้คือ  $H_2O: Methanol: Acetonitrile = 57:23:20$  อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที

7. ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 ที่สาร HSCAS ดูดซับไว้ได้จากสมการ

ปริมาณ AFM1 ที่ถูกดูดซับไว้โดย HSCAS = ปริมาณ AFM1 เริ่มต้น - ปริมาณ AFM1 ที่เหลืออยู่ในสารละลาย

#### การทดลองที่ 2 ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณ HSCAS ที่เหมาะสมต่อการดูดซับ AFM1 ในน้ำนมดิบ

วิธีดำเนินการทดลอง

1. นำน้ำนมดิบที่จะใช้ทดสอบ มาตรวจวัดหาปริมาณ AFM1 ที่มีการปนเปื้อนอยู่ตามธรรมชาติ โดยใช้ AflaM1<sup>TM</sup> Immunoaffinity column (Vicam, USA) ในการสกัด แล้ววัดปริมาณ AFM1 ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) ทำการตรวจตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย บันทึกความเข้มข้นตั้งต้นของ AFM1 ในน้ำนมดิบ

(หมายเหตุ จะเลือกใช้น้ำนมดิบที่มีการปนเปื้อนของ AFM1 อยู่ตามธรรมชาติ โดยเลือกตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ppb ขึ้นไป ทั้งนี้เพื่อความชัดเจนของผลการทดลองในระดับเบื้องต้น ในกรณีที่หาตัวอย่างน้ำนมดิบที่มีการปนเปื้อนของ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ppb ขึ้นไปไม่ได้ จะทำการใส่สารมาตรฐาน AFM1 ลงในน้ำนมดิบให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 0.5 ppb )

2. ใช้น้ำนมดิบปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของ AFM1 เท่ากับ 0.5 ppb สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ HSCAS ในแต่ละหลอดการทดลอง โดยใส่สาร HSCAS ตามสัดส่วนจากการทดลองที่ 1 ดังนี้คือ 0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 กรัม ตามลำดับ
3. นำหลอดทดลองที่ใส่สารตัวอย่างแล้วไปเขย่าผสมด้วยเครื่องเขย่าหลอด (Vortex Mixer) ประมาณ 5 นาที
4. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการแยกชั้นไขมันที่อยู่ด้านบนออกจนหมด
5. ปิเปตสารละลายส่วนล่าง 20 มิลลิลิตร ผ่านลงสู่ AflaM1<sup>TM</sup> Immunoaffinity column (Vicam, USA)
6. ปลอຍให้สารละลายไหลผ่านลงสู่คอลัมน์ โดยควบคุมอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที
7. ชะล้างสิ่งเจือปนออกจากคอลัมน์ ด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง โดยมีอัตราการไหล 1 – 2 หยดต่อวินาที
8. ชะสาร AFM1 จากคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมของ Acetonitrile : Methanol (3:2) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการไหล 2 – 3 หยดต่อวินาที
9. ชะ AFM1 ออกจากคอลัมน์อีกครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการไหล 2 – 3 หยดต่อวินาที
10. ผสมสารละลายที่ได้ให้เข้ากัน นำไปกรองผ่าน Membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน
11. ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) เปรียบเทียบ AFM1 ที่ตรวจพบโดยใช้สมการ

ปริมาณ AFM1 ที่ถูกดูดซับไว้โดย HSCAS = ปริมาณ AFM1 เริ่มต้น - ปริมาณ AFM1 ที่เหลืออยู่

12. ทำการทดสอบเพิ่มเติม เพื่อให้ผลการศึกษชัดเจนยิ่งขึ้น โดยใช้สาร HSCAS ปริมาณ 0.5 และ 1.0 กรัม เพิ่มเวลาในการเขย่าผสมเป็น 10 และ 20 นาที

## ระยะที่ 2 ศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

ประกอบด้วย 2 การทดลองคือ

การทดลองที่ 3 วิเคราะห์หาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

การทดลองที่ 4 วิเคราะห์หาสภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

### การทดลองที่ 3 วิเคราะห์หาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

วิธีดำเนินการทดลอง

1. นำน้ำนมดิบปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของ AFM1 เท่ากับ 0.65 ppb ดังนั้นในน้ำนมดิบจะมีน้ำหนักของ AFM1 ตั้งต้น เท่ากับ 32.5 นาโนกรัม (ng) ใส่สาร HSCAS ปริมาณ 3 กรัม (ได้จากผลการทดลองที่ 2) ผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที

2. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

3. จากนั้นทำการแยกชั้นไขมันที่อยู่ด้านบนออกจนหมด และดูดสารละลายออก ให้เหลือแต่ตะกอนของ HSCAS

4. ล้างตะกอน HSCAS ด้วยน้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วนคือ

ปริมาตรของน้ำปราศจากไอออน : ปริมาตรตะกอนของ HSCAS = 8:1

5. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เขย่าผสมกันให้ทั่ว ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้น ดูดน้ำปราศจากไอออนออกให้หมด จนเหลือแต่ตะกอนของ HSCAS

6. ทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยเติมตัวทำละลายในอัตราส่วนดังนี้

ปริมาตรของตัวทำละลาย : ปริมาตรตะกอนของ HSCAS = 2:1

7. ทดสอบอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดของตัวทำละลายแต่ละชนิดที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

8. นำหลอดตัวอย่างไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

9. นำสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดปริมาณ AFM1 โดยใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงตัวทำละลายที่จะใช้ทดสอบ เรียงตามลำดับความแรง (Polarity) จากน้อยไปมาก

ตัวทำละลาย	Polarity Index
Benzene	0
n-Hexane	0.1
Cyclohexane	0.2
Toluene	2.4
Diethylether	2.8
Methylene chloride	3.1
Isopropanol	3.9
Chloroform	4.1
Methanol	5.1
Acetonitrile	5.8
Water	9.0
ตัวทำละลายผสม ที่มีส่วนผสมของ H <sub>2</sub> O:Methanol:Acetonitrile = 57:23:20	

เปรียบเทียบ % recovery ของ AFM1 ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อหาสารละลายที่ให้ % recovery ที่ดีที่สุด การคำนวณหา % recovery ของการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS จะใช้สูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบในสารละลาย} \times 100}{\text{ปริมาณ AFM1 ที่ถูกดูดซับโดย HSCAS}}$$

**การทดลองที่ 4** ศึกษาวิเคราะห์หาสภาพที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

จากผลการทดลองที่ 3 ทำให้ทราบว่าตัวทำละลายแต่ละชนิด มี % recovery มากน้อยแตกต่างกัน ดังนั้นทำการเลือกตัวทำละลายที่มี % recovery มากที่สุด เพื่อนำมาทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมที่สุด ในการชะล้าง AFM1 ออกจาก HSCAS โดยเปลี่ยนแปลงปริมาตรของตัวทำละลาย และระยะเวลาการสกัดจะใช้ที่ 5, 15 และ 30 นาที

วิธีดำเนินการทดลอง

1. นำน้ำนมดิบปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของ AFM1 เท่ากับ 0.15 ppb ดังนั้นในน้ำนมดิบจะมีน้ำหนักตั้งต้นของ AFM1 เท่ากับ 7.5 ng ใส่สาร HSCAS ปริมาณ 3 กรัม (ได้จากผลการทดลองที่ 2) ผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที

2. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
3. จากนั้นทำการแยกชั้นไขมันที่อยู่ด้านบนออกจนหมด และดูตุสารละลายออก ให้เหลือแต่ตะกอนของ HSCAS
4. ล้างตะกอน HSCAS โดยใช้น้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วนคือ  
 ปริมาตรของน้ำปราศจากไอออน : ปริมาตรตะกอนของ HSCAS = 8:1
5. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เซย่าผสมกันให้ทั่ว ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นดูต้นน้ำปราศจากไอออนออกให้หมด จนเหลือแต่ตะกอนของ HSCAS
6. เลือกตัวทำละลายที่ให้ % recovery มากที่สุด ที่ได้จากการทดลองที่ 3 นำตัวทำละลายมาผสมให้เข้ากับตะกอนของ HSCAS ในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5, 15 และ 30 นาที
7. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
8. นำสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวัดหาปริมาณ AFM1 โดยใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ คำนวณหาน้ำหนักของ AFM1 โดยใช้สมการดังนี้  
 น้ำหนัก AFM1 ที่ถูกชะล้างได้ด้วยตัวทำละลาย (นาโนกรัม) = น้ำหนัก AFM1 ตั้งต้น - น้ำหนัก AFM1 ที่ตรวจพบ

เปรียบเทียบ % recovery ของ AFM1 ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายในปริมาตรและระยะเวลาต่างๆ เพื่อหาสภาพที่ให้ % recovery ที่ดีที่สุด การคำนวณหา % recovery ของการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS จะใช้สูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบในสารละลาย}}{\text{ปริมาณ AFM1 ที่ถูกดูดซับโดย HSCAS}} \times 100$$

ตารางที่ 5 แสดงปริมาตรของตัวทำละลาย : ปริมาตรตะกอนของ HSCAS และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด AFM1 ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และที่ 40 °C

ชนิดของตัวทำละลาย	ปริมาตรของตัวทำละลาย : ปริมาตรตะกอนของ HSCAS	ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS
ตัวทำละลาย	3:1	5 นาที
		15 นาที
		30 นาที
ตัวทำละลาย	4:1	5 นาที
		15 นาที
		30 นาที
ตัวทำละลาย	5:1	5 นาที
		15 นาที
		30 นาที

### 3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

#### 3.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณของ AFM1 โดยใช้สมการ

ปริมาณ AFM1 ที่ถูกดูดซับไว้โดย HSCAS = ปริมาณ AFM1 เริ่มต้น - ปริมาณ AFM1 ที่เหลืออยู่

#### 3.3.2 วิเคราะห์หาน้ำหนักของ AFM1 โดยใช้สมการ

น้ำหนัก AFM1 ที่ถูกชะล้างได้ด้วยตัวทำละลาย (นาโนกรัม) = น้ำหนัก AFM1 ตั้งต้น - น้ำหนัก AFM1 ที่ตรวจพบ

#### 3.3.3 วิเคราะห์หา % recovery ของ AFM1 โดยใช้สูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณ AFM1 ที่ตรวจพบในสารละลาย (นาโนกรัม)}}{\text{ปริมาณ AFM1 ที่ถูกดูดซับโดย HSCAS (นาโนกรัม)}} \times 100$$

3.3.4 ทดสอบความแตกต่างของปริมาณ HSCAS ที่ใช้ในการดูดซับ AFM1 ด้วย Oneway ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณระหว่างกลุ่มด้วย LSD (Least significant difference) โดยกำหนดความเชื่อมั่น  $P < 0.05$  ใช้โปรแกรม SPSS (Statistical package for the social sciences) ในการทดสอบทางสถิติ

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการดูดซับ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน

พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ของ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาณของ HSCAS ที่ 0.5, 1.0 – 2.8 และ 3.0 – 3.4 กรัม สามารถดูดซับ AFM1 ได้ประมาณ 90%, มากกว่า 96% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 5 นาที แสดงให้เห็นว่า HSCAS มีประสิทธิภาพในการดูดซับ AFM1 ได้ และสามารถดูดซับได้มากขึ้นตามปริมาณของ HSCAS ที่เติมลงไปแต่ไม่ได้เป็นไปในสัดส่วน 1:1 ในการทดลองนี้ได้เลือกปริมาณของ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่สูงมากหากมีการปนเปื้อนในน้ำนมดิบ และที่ระดับปริมาณของสาร HSCAS ที่ 2.8 และ 3.0 กรัม พบว่ามีความแตกต่างกันในการดูดซับ AFM1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของสาร HSCAS ที่ 3.0 กรัม มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะดูดซับ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ออกได้ทั้งหมด

ตารางที่ 6 แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS ในการดูดซับ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 5 นาที

ปริมาณ HSCAS (g)	[AFM1] ที่เหลือในสารละลาย (ppb)			เฉลี่ย [AFM1] (ppb) ที่เหลือในสารละลาย	%การดูดซับ AFM1 ของ HSCAS
	การทดสอบครั้งที่				
	I	II	III		
0	9.98	9.99	10.00	9.99	0%
0.5	1.03	1.04	1.02	1.03	89.7%
1.0	0.41	0.45	0.39	0.42	95.8%
1.5	0.26	0.26	0.25	0.26	97.4%
1.8	0.24	0.24	0.24	0.24	97.6%
2.0	0.23	0.21	0.23	0.22	97.8%
2.2	0.17	0.19	0.18	0.18	98.2%
2.4	0.16	0.17	0.16	0.16	98.4%
2.6	0.14	0.15	0.15	0.15	98.5%
2.8	0.14	0.15	0.14	0.14 <sup>a</sup>	98.6%
3.0	0.00	0.00	0.00	0.00 <sup>b</sup>	100.0%
3.2	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0%
3.4	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0%

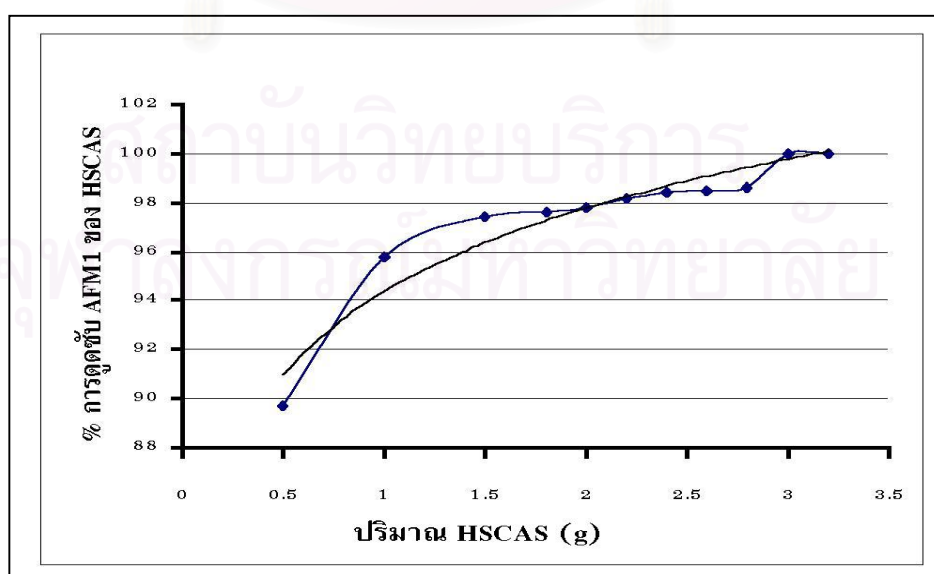
<sup>a</sup> และ <sup>b</sup> มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )



ตารางที่ 7 แสดงสัดส่วนของน้ำหนักร AFM1 (ng) : ปริมาณของ HSCAS (g) ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 ml มี AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb คิดเป็นน้ำหนักร AFM1 เท่ากับ 100 ng

ปริมาณ HSCAS (g)	น้ำหนักร AFM1 ที่ถูกดูดซับ (ng)	สัดส่วนของน้ำหนักร AFM1 ที่ถูกดูดซับ ต่อปริมาณ HSCAS (ng/g)
0	0	0
0.5	89.7	179.4:1
1.0	95.8	95.8:1
1.5	97.4	64.9:1
1.8	97.6	54.2:1
2.0	97.8	48.9:1
2.2	98.2	44.6:1
2.4	98.4	41.0:1
2.6	98.5	37.9:1
2.8	98.6	35.2:1
3.0	100	33.3:1
3.2	100	31.3:1
3.4	100	29.4:1

จากตารางที่ 7 ปริมาณของ HSCAS 0.5 g สามารถดูดซับ AFM1 ได้ 89.7% คิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนักร AFM1 (ng) : ปริมาณของ HSCAS (g) ได้ประมาณ 180:1 ng/g เมื่อเพิ่มปริมาณของ HSCAS มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับ 3.0 g พบว่าสามารถดูดซับ AFM1 ได้ 100% คิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนักร AFM1 (ng) : ปริมาณของ HSCAS (g) ได้เท่ากับ 33.33 ng/g จากการวิเคราะห์พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง % การดูดซับที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เป็นสัดส่วนกับปริมาณของ HSCAS ที่เพิ่มขึ้นในสัดส่วน 1:1 ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % การดูดซับ AFM1 ของ HSCAS และปริมาณของ HSCAS

#### 4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณ HSCAS ที่เหมาะสมต่อการดูดซับ AFM1 ในน้ำมันดิบ

เมื่อตรวจปริมาณการปนเปื้อนของ AFM1 ที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติ ของน้ำมันดิบ พบว่ามีค่าการปนเปื้อนอยู่ที่ระดับ 0.15 ppb จึงเพิ่มสารละลายมาตรฐานของ AFM1 ลงไปในน้ำมันดิบ จนได้ระดับความเข้มข้นที่ 0.5 ppb ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ผลการทดสอบมีความชัดเจน และเชื่อมั่นได้มากขึ้น อีกทั้งที่ระดับการปนเปื้อนที่ 0.5 ppb เป็นค่าที่คณะกรรมการ Codex ได้เสนอที่จะกำหนดให้เป็นระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ของ AFM1 (Maximum tolerated levels) ในน้ำมันดิบ เพราะฉะนั้นปริมาณตั้งต้นของ AFM1 ที่จะใช้คำนวณในการทดลองที่ 2 นี้จะมีค่าเท่ากับ 0.5 ppb

ผลการทดลองที่ 2 พบว่าในระยะเวลาการทดสอบนาน 5 นาที HSCAS ที่ระดับ 0.5 – 0.75, 1.0 – 2.0 และ 3.0 – 4.0 กรัม สามารถดูดซับ AFM1 ในน้ำมันดิบที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb ได้ประมาณ 95%, 98% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 8) และพบว่าการดูดซับ AFM1 ในน้ำมันดิบของ HSCAS ที่ระดับ 2.0 และ 3.0 กรัม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นในการทดลองที่ 3 จะใช้สาร HSCAS ปริมาณ 3 กรัม เพราะเป็นปริมาณที่น้อยที่สุด ที่สามารถดูดซับ AFM1 ที่มีปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันดิบในระดับ 0.5 ppb ได้ทั้งหมด

#### ตารางที่ 8 แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS ในการดูดซับ AFM1

ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb ในน้ำมันดิบ โดยใช้เวลาในการทดสอบ 5 นาที

ปริมาณ HSCAS (g)	[AFM1] ที่เหลือในสารละลาย (ppb)			เฉลี่ย [AFM1] (ppb) ที่เหลือในสารละลาย	% การดูดซับ AFM1 ของ HSCAS
	การทดสอบครั้งที่				
	I	II	III		
0	0.500	0.500	0.500	0.500	0%
0.5	0.022	0.025	0.028	0.025	95.0%
0.75	0.023	0.024	0.021	0.022	95.6%
1.0	0.009	0.013	0.010	0.010	98.0%
1.5	0.008	0.010	0.010	0.009	98.2%
2.0	0.007	0.009	0.008	0.008 <sup>a</sup>	98.4%
3.0	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>b</sup>	100.0%
4.0	0.000	0.000	0.000	0.000	100.0%

<sup>a</sup> และ <sup>b</sup> มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 9 แสดงสัดส่วนของน้ำหนัก AFM1 (ng) : ปริมาณของ HSCAS (g) ในน้ำมันดิบปริมาตร 50 ml มี AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb คิดเป็นน้ำหนักของ AFM1 เท่ากับ 25 ng

ปริมาณ HSCAS (g)	น้ำหนักของ AFM1 ที่ถูกดูดซับ (ng)	สัดส่วนของน้ำหนักของ AFM1 ที่ถูกดูดซับ ต่อปริมาณ HSCAS (ng/g)
0	0	0
0.5	24.98	49.9:1
0.75	24.97	33.3:1
1.0	24.99	24.9:1
1.5	24.99	16.6:1
2.0	24.99	12.5:1
3.0	25.00	8.33:1
4.0	25.00	6.25:1

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัก AFM1 (ng) ที่ถูกดูดซับโดย HSCAS ต่อปริมาณของ HSCAS (g) ในน้ำมันดิบ (ตารางที่ 9) พบว่าประสิทธิภาพการดูดซับที่เพิ่มขึ้นจะมีมากเมื่อใช้ HSCAS ในปริมาณที่น้อย แต่ประสิทธิภาพการดูดซับที่เพิ่มขึ้นจะมีค่าลดลงไปเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มปริมาณ HSCAS มากขึ้นตามลำดับ

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับ AFM1 ของ HSCAS ที่ระดับ 0.5 และ 1.0 กรัม ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 10 และ 11 พบว่าในระยะเวลา 5 นาที HSCAS สามารถดูดซับ AFM1 ในน้ำมันดิบ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าที่ระยะเวลา 10 และ 20 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่ HSCAS ที่ระดับ 0.5 และ 1.0 กรัม ไม่สามารถดูดซับ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb ได้อย่าง 100%

ตารางที่ 10 แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS 0.5 กรัม ในการดูดซับ AFM1  
0.5 ppb ในน้ำนมดิบ โดยใช้เวลาในการทดสอบ 5, 10 และ 20 นาที

เวลาที่ใช้ทดสอบ (นาที)	[AFM1] ที่เหลือในสารละลาย (ppb)			เฉลี่ย [AFM1] (ppb)	%การดูดซับ AFM1 ของ HSCAS
	การทดสอบครั้งที่				
	I	II	III		
5	0.022	0.025	0.028	0.025 <sup>a</sup>	95.0%
10	0.039	0.029	0.030	0.033 <sup>b</sup>	93.4%
20	0.036	0.037	0.035	0.036	92.8%

<sup>a</sup> และ <sup>b</sup> มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 11 แสดงประสิทธิภาพของสาร HSCAS 1.0 กรัม ในการดูดซับ AFM1  
0.5 ppb ในน้ำนมดิบ โดยใช้เวลาในการทดสอบ 5, 10 และ 20 นาที

เวลาที่ใช้ทดสอบ (นาที)	[AFM1] ที่เหลือในสารละลาย (ppb)			เฉลี่ย [AFM1] (ppb)	%การดูดซับ AFM1 ของ HSCAS
	การทดสอบครั้งที่				
	I	II	III		
5	0.009	0.013	0.010	0.010 <sup>a</sup>	98.0%
10	0.017	0.017	0.017	0.017 <sup>b</sup>	96.6%
20	0.020	0.018	0.019	0.019	96.2%

<sup>a</sup> และ <sup>b</sup> มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

#### 4.3 การทดลองที่ 3 วิเคราะห์หาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

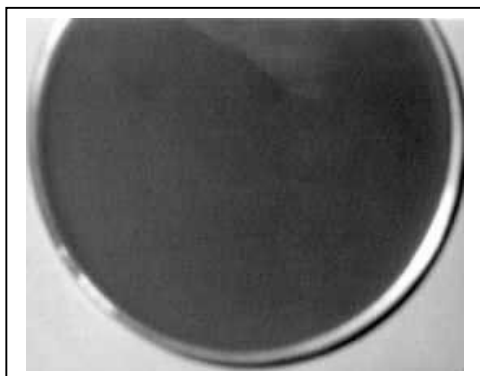
การตรวจปริมาณการปนเปื้อนของ AFM1 ที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติ ในน้ำนมดิบ พบว่าน้ำนมดิบ มีค่าการปนเปื้อนของ AFM1 อยู่ที่ระดับ 0.15 ppb จึงทำการใส่สารละลายมาตรฐานของ AFM1 ลงไปอีก 0.5 ppb เพื่อให้ผลการทดสอบมีความชัดเจนและเชื่อมั่นได้มากขึ้น ดังนั้นน้ำนมดิบที่จะใช้ในการทดสอบนี้จะมีค่าการปนเปื้อนของ AFM1 อยู่ที่ระดับ 0.65 ppb แต่ละหลอดการทดลองใช้น้ำนมดิบปริมาตร 50 มิลลิตร ซึ่งเมื่อนำมาคิดเป็นน้ำหนักของ AFM1 ในแต่ละหลอดการทดลอง จะได้เท่ากับ  $0.65 \text{ ppb (ng/ml)} * 50 \text{ ml} = 32.5 \text{ ng}$  นั่นคือน้ำหนักตั้งต้นของ AFM1 ที่ใช้ในการทดสอบและใช้ในการคำนวณ

จากการทดลองที่ 3 พบว่าเมื่อผสมสาร HSCAS เข้ากับสารละลายชนิดต่างๆ แล้ว จะสามารถแบ่งสารละลายได้ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 สาร HSCAS สามารถกระจายตัวในสารละลายได้เป็นอย่างดี (ดังแสดงในรูปที่ 9) ได้แก่ ตัวทำละลายผสม ( $\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20), Methanol, Acetonitrile และ  $\text{H}_2\text{O}$  ส่วนในกลุ่มที่ 2 สาร HSCAS ไม่กระจายตัวในสารละลาย จะจับตัวเป็นก้อนนิ่มๆ คล้ายดินน้ำมัน (ดังแสดงในรูปที่ 10) เมื่อผสมเข้ากับตัวทำละลายต่อไปนี้ Benzene, n-Hexane, Cyclohexane, Toluene, Diethyl ether, Chloroform, Methylene chloride และ Isopropanol

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในการสกัดแยก AFM1 ออกจากการจับกับ HSCAS แสดงไว้ในตารางที่ 12 ซึ่งพบว่ามีเพียงตัวทำละลายที่ประกอบด้วย  $\text{H}_2\text{O} : \text{Methanol} : \text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20 เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ได้ โดยในการทดลองนี้ใช้อัตราส่วนของตัวละลาย : HSCAS ในสัดส่วน 2:1 และใช้เวลาในการสกัด 5 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ  $25^\circ\text{C}$  สามารถสกัด AFM1 ได้เพียง 0.31 ng คิดเป็น % recovery เท่ากับ 0.95% ส่วนที่อุณหภูมิ  $40^\circ\text{C}$  สามารถสกัด AFM1 ได้เพียง 0.42 ng คิดเป็น % recovery เท่ากับ 1.29% (ตารางที่ 12) ส่วนสารละลายตัวอื่น ๆ ได้แก่ Methanol, Acetonitril, Benzene, n-Hexane, Cyclohexane, Toluene, Diethyl ether, Chloroform, Methylene chloride และ Isopropanol ไม่มีความสามารถในการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS โดยผลจากการนำเอาตัวทำละลายชนิดต่างๆ มาสกัดแยก AFM1 ออกจากการจับของ HSCAS แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC นั้นแสดงให้เห็นเป็น Chromatogram ในรูปที่ 11 ถึงรูปที่ 21

ตารางที่ 12 แสดง % recovery ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้สกัด AFM1 ออกจาก HSCAS

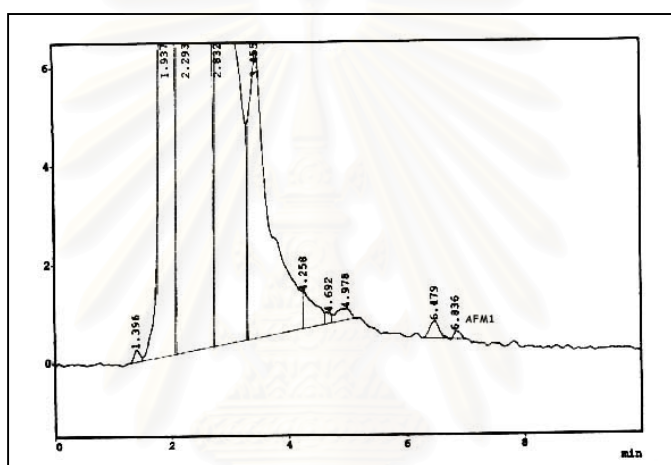
ตัวทำละลาย	อุณหภูมิ (°C)	น้ำหนักของ AFM1 ที่ปรากฏในสารละลาย (ng)			ค่าเฉลี่ย (ng)	%recovery
		การทดสอบครั้งที่				
		I	II	III		
ตัวทำละลายผสม	25	0.25	0.31	0.38	0.31	0.95
	40	0.46	0.39	0.41	0.42	1.29
Methanol	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Acetonitrile	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Benzene	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
n-Hexane	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Cyclohexane	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Toluene	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Diethyl ether	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Chloroform	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Methylene chloride	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0
Isopropanol	25	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0



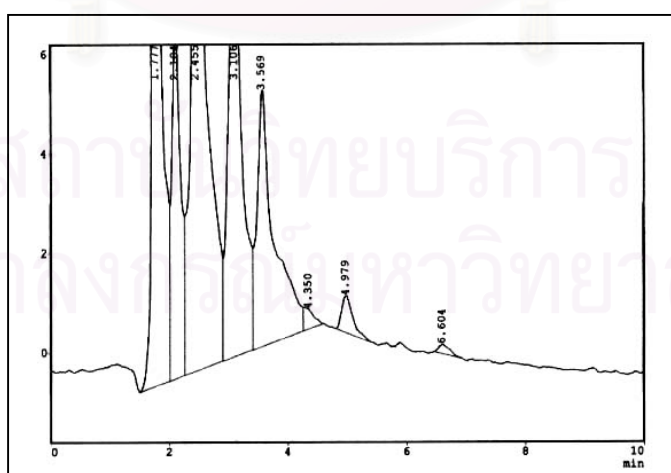
รูปที่ 9 แสดงความสามารถในการกระจายตัวของ HSCAS ในสารละลาย



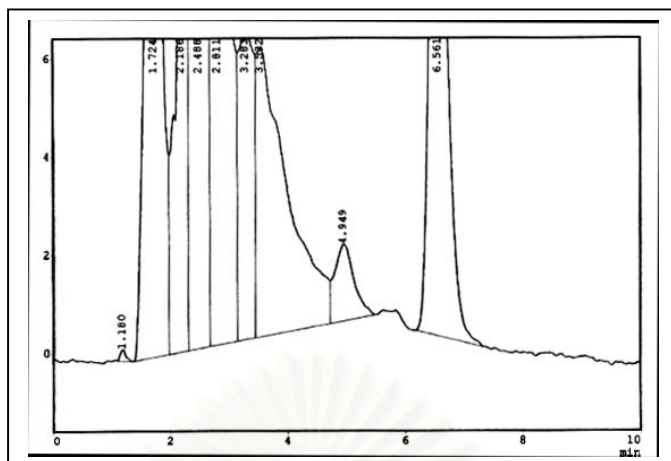
รูปที่ 10 แสดงการไม่กระจายตัวของ HSCAS ในกลุ่มก้อน คล้ายดินน้ำมัน ของ HSCAS ในสารละลาย



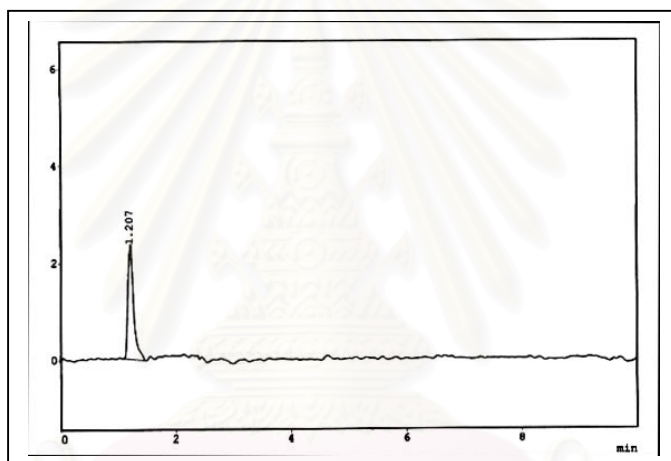
รูปที่ 11 Chromatogram ของตัวทำละลายผสม จากผลการทดลองที่ 3 peak ที่มี Retention time เท่ากับ 6.8 นาที คือ AFM1



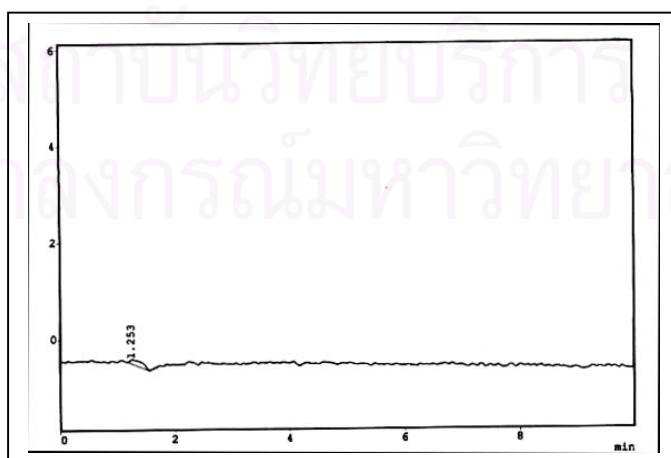
รูปที่ 12 Chromatogram ของ Methanol จากผลการทดลองที่ 3



รูปที่ 13 Chromatogram ของ Acetonitrile จากผลการทดลองที่ 3

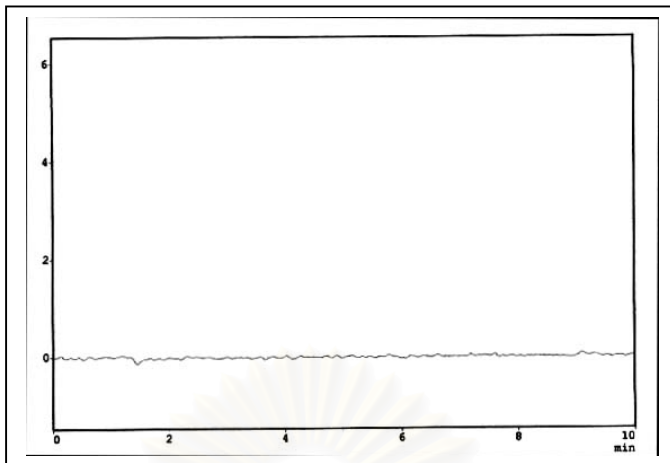


รูปที่ 14 Chromatogram ของ Benzene จากผลการทดลองที่ 3

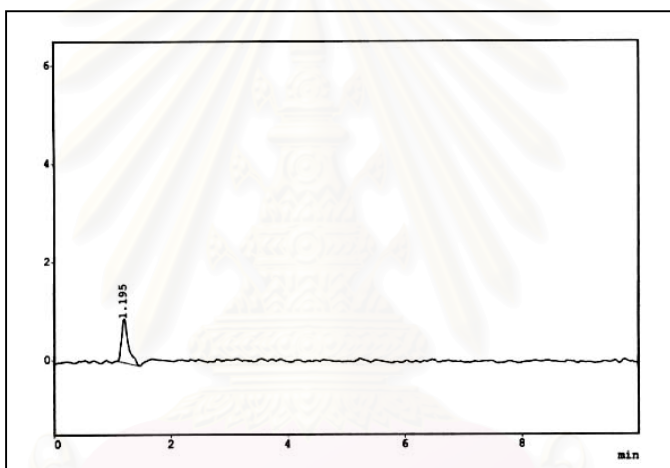


รูปที่ 15 Chromatogram ของ n-Hexane จากผลการทดลองที่ 3

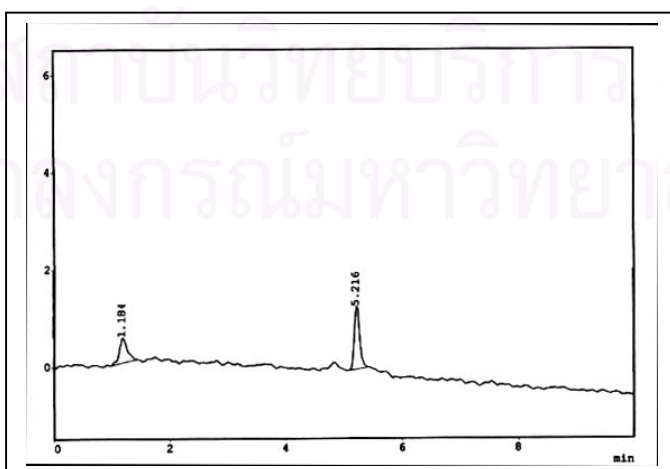




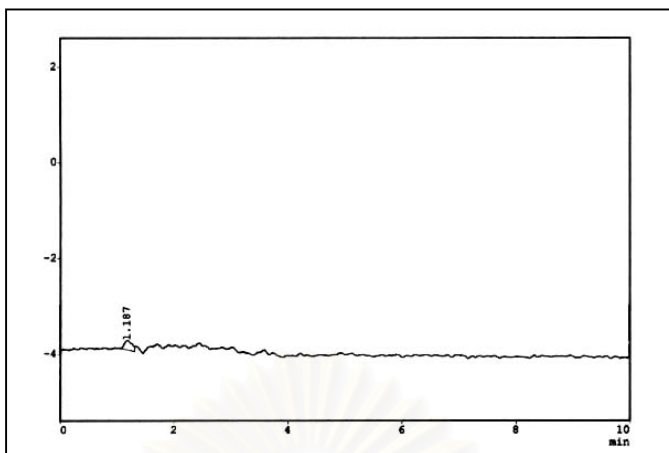
รูปที่ 16 Chromatogram ของ Cyclohexane จากผลการทดลองที่ 3



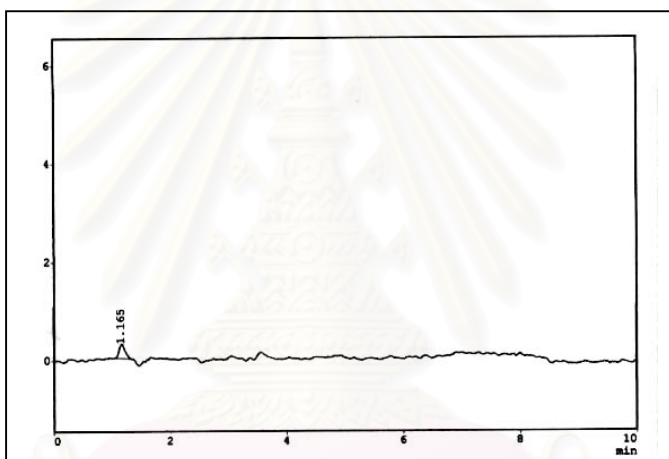
รูปที่ 17 Chromatogram ของ Toluene จากผลการทดลองที่ 3



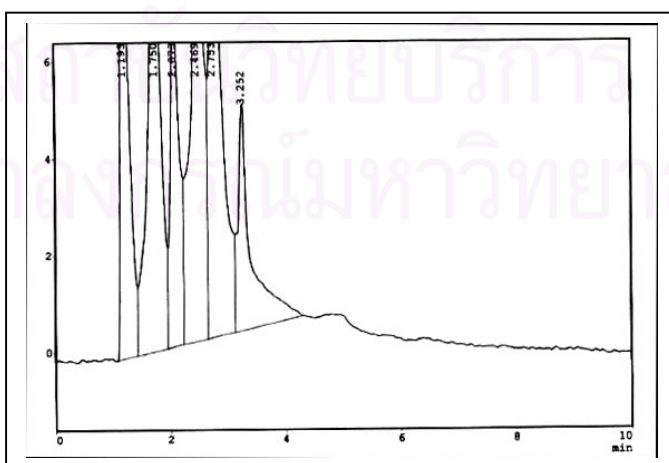
รูปที่ 18 Chromatogram ของ Diethyl ether จากผลการทดลองที่ 3



รูปที่ 19 Chromatogram ของ Chloroform จากผลการทดลองที่ 3



รูปที่ 20 Chromatogram ของ Methylene chloride จากผลการทดลองที่ 3



รูปที่ 21 Chromatogram ของ Isopropanol จากผลการทดลองที่ 3

#### 4.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาวิเคราะห์หาสภาพที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

การตรวจปริมาณการปนเปื้อนของ AFM1 ที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติ ในน้ำนมดิบ พบว่าน้ำนมดิบมีค่าการปนเปื้อนของ AFM1 อยู่ที่ระดับ 0.15 ppb ในการทดลองของแต่ละหลอดการทดลองจะใช้น้ำนมดิบปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นเมื่อนำมาคิดเป็นน้ำหนักของ AFM1 ในแต่ละหลอดการทดลอง จะได้เท่ากับ  $0.15 \text{ ppb (ng/ml)} * 50 \text{ ml} = 7.5 \text{ ng}$  นั่นคือน้ำหนักตั้งต้นของ AFM1 ที่ใช้ในการทดสอบและใช้ในการคำนวณ

ผลการทดลองที่พบว่าที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS เป็นเวลา 15 นาที เป็นสถานะที่ให้ % recovery ที่ดีที่สุด โดยอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม ( $\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20) : HSCAS ที่ 5:1 จะให้ % recovery ที่สูงที่สุดในการทดลองนี้ คือ 32.00% รองลงมาคือ 21.73% และ 14.80% ซึ่งเป็น % recovery ของตัวทำละลายผสม ( $\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20) : HSCAS ที่ 4:1 และ 3:1 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ส่วนการทดสอบการสกัดที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดนาน 30 นาที ตัวทำละลายผสม ( $\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20) : HSCAS ในอัตราส่วนที่ 5:1, 4:1 และ 3:1 พบว่าไม่สามารถที่จะสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ได้เลย มี % recovery เท่ากับ 0.00%

ที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  ใช้เวลาในการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ตัวทำละลายผสม ( $\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20) : HSCAS ในอัตราส่วนที่ 5:1, 4:1 และ 3:1 พบว่าสามารถสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS ได้ในระดับปานกลาง โดยมี % recovery เท่ากับ 15.20%, 10.08% และ 5.73% ตามลำดับ เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด AFM1 ออกจาก HSCAS เป็น 15 และ 30 นาที % recovery กลับมีค่าลดลง อย่างผกผันกับเวลาที่เพิ่มมากขึ้น

การทดลองนี้สรุปได้ว่า การใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายผสม ( $\text{H}_2\text{O}:\text{Methanol}:\text{Acetonitrile}$  ในอัตราส่วน 57:23:20) กับ HSCAS ในอัตราส่วน 5:1 ที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  ระยะเวลาสกัดนาน 15 นาที เป็นสถานะที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับ HSCAS ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 13 แสดง % recovery ของการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS โดยใช้ตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ H<sub>2</sub>O:Methanol: Acetonitrile ในอัตราส่วน 57:23:20 ที่สภาวะต่างๆ

ตัวทำละลาย : HSCAS	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (min)	น้ำหนักของ AFM1 ที่ปรากฏในสารละลาย			ค่าเฉลี่ย (ng)	%recovery	
			การทดสอบครั้งที่					
			I	II	III			
3:1	25	5	0.42	0.48	0.39	0.43	5.73	
		15	0.45	0.26	0.20	0.30	4.00	
		30	0.17	0	0.12	0.14	1.87	
	40	5	0.65	0.40	0	0.52	6.93	
		15	0.85	1.22	1.27	1.11	14.80	
		30	0	0	0	0	0	
	4:1	25	5	0.74	0.76	0.77	0.75	10.08
			15	0.46	0.52	0.52	0.50	6.66
			30	0.29	0.38	0.48	0.38	5.07
40		5	0.79	1.36	1.18	1.11	14.80	
		15	1.57	2.01	1.32	1.63	21.73	
		30	0	0	0	0	0	
5:1		25	5	1.23	0.97	1.22	1.14	15.20
			15	1.01	0.60	1.16	0.92	12.27
			30	0.32	0.69	0.49	0.50	6.66
	40	5	1.12	0.32	1.16	0.86	11.47	
		15	2.22	1.95	3.24	2.47	32.00	
		30	0	0	0	0	0	

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 3 แล้วว่าการวิจัยในครั้งนี้จะประกอบด้วย 2 ระยะคือ ระยะที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของ HSCAS ในการดูดซับ AFM1 และระยะที่ 2 ศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ดังนั้นจะแยกการอภิปรายเป็น 2 ระยะ ดังนี้

#### ระยะที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของ HSCAS ในการดูดซับ AFM1

จากผลการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่า HSCAS สามารถดูดซับ AFM1 ในน้ำกลั่นปราศจากไอออนและในน้ำนมดิบได้ น้ำหนักต่ำที่สุดของ HSCAS ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ 0.5 g สามารถดูดซับ AFM1 ที่ความเข้มข้น 10 ppb ในน้ำปราศจากไอออนได้ประมาณ 90% และสามารถดูดซับ AFM1 ที่ความเข้มข้น 0.5 ppb ในน้ำนมดิบได้ถึง 95% เมื่อนำมาคิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนัก AFM1 (ng) ต่อปริมาณของ HSCAS (g) จะได้ประมาณ 180 ng/g และ 50 ng/g ตามลำดับ แต่การดูดซับ AFM1 ที่มีอยู่ในสารละลายจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ 100% เมื่อใช้ปริมาณ HSCAS มากถึง 3 g ทั้งในน้ำกลั่นปราศจากไอออนและน้ำนมดิบ ซึ่งเมื่อนำมาคิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนัก AFM1 (ng) ต่อปริมาณของ HSCAS (g) จะได้เท่ากับ 33.33 ng/g และ 8.33 ng/g ตามลำดับ แสดงว่าการดูดซับที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เป็นสัดส่วน 1:1 กับน้ำหนักของ HSCAS ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7 และรูปที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับ AFM1 ของ HSCAS ในน้ำกลั่นปราศจากไอออนและในน้ำนมดิบ ไม่ว่าจะที่ 90% และ 100% จะเห็นว่าการดูดซับในน้ำนมเกิดขึ้นน้อยกว่าในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่ว่าในน้ำนมดิบมีสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ เช่น casein, lipids, Ca, Mg, Mn และ Zn เป็นต้น ซึ่งจะไม่พบสารต่างๆ เหล่านี้ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน HSCAS มีความสามารถในการเข้าจับกับสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ ที่กล่าวมานี้ได้เช่นกัน (Chung et al., 1990, Chestnut et al., 1992) จึงเป็นผลทำให้เกิดการแย่งจับกันของสารต่างๆ เหล่านี้กับ AFM1 เป็นเหตุให้ HSCAS เข้าจับกับ AFM1 ในน้ำนมดิบได้ไม่ดีเท่าในน้ำกลั่นปราศจากไอออน

Phillips et al. (1988) ทำการทดสอบการดูดซับสารพิษ AFB1 ที่ระดับความเข้มข้น 1 ppm ในน้ำกลั่น โดยใช้สารดูดซับชนิดต่างๆ มาเปรียบเทียบกัน ผลการศึกษาพบว่า Phyllosilicates (NovaSil<sup>®</sup>) ปริมาณ 100 mg ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกับ HSCAS ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีเปอร์เซ็นต์การดูดซับ AFB1 ประมาณ 85% เมื่อนำมาคิดเป็นอัตราส่วนการดูดซับ AFB1 ต่อน้ำหนักของ HSCAS จะได้เท่ากับ 8,500 ng/g ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า สัดส่วนน้ำหนักของ AFM1 ต่อน้ำหนักของ HSCAS ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน เมื่อมีการดูดซับที่ 89% มีค่าเพียง 180 ng/g แสดงให้เห็นว่า HSCAS มีความจำเพาะต่อการดูดซับกับ AFB1 มาก

กว่า AFM1 หลายเท่า ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Phillips และคณะซึ่งได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ HSCAS ในการดูดซับระหว่าง AFB1 และ AFM1 พบว่า HSCAS สามารถดูดซับ AFB1 ได้มากกว่า AFM1 ประมาณ 2.5 เท่า (Phillips et al., 1995) สาเหตุที่ HSCAS สามารถดูดซับ AFB1 ได้มากกว่า AFM1 อาจอธิบายได้จากความแตกต่างระหว่างโครงสร้างของ AFB1 และ AFM1 ตรงที่ AFM1 มี -OH group อยู่ที่ตรงตำแหน่ง 9a ในขณะที่ AFB1 ไม่มี (รูปที่ 1) การที่ AFM1 มี -OH group อยู่ที่ตรงตำแหน่ง 9a นี้เป็นตัวกีดขวางการแทรกตัวของโมเลกุล AFM1 ในการเข้าไปอยู่ในระหว่างชั้นภายใน (Interlamellar layer) โมเลกุลของ HSCAS ทำให้ HSCAS ดูดซับ AFB1 ได้มากกว่า AFM1 Grant and Phillips (1998) ศึกษาโครงสร้างของ HSCAS พบว่า HSCAS มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในโมเลกุลมีลักษณะเรียงเป็นชั้น ๆ พื้นที่ผิวทั้งหมดของ HSCAS มีขนาด  $848 \text{ m}^2/\text{g}$  ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 Phillips ทำการศึกษาถึงกลไกของการดูดซับระหว่าง AFB1 กับ HSCAS พบว่าบริเวณที่เกิดการจับกับ AFB1 บนโมเลกุลของ HSCAS มีด้วยกัน 2 ส่วน คือ ส่วนผิวนอกของโมเลกุลซึ่งมีการดูดซับ AFB1 เพียงเล็กน้อย และส่วนระหว่างชั้นภายใน (Interlamellar region) โมเลกุลของ HSCAS ซึ่งการดูดซับ AFB1 จะเกิดขึ้นที่ส่วนนี้เป็นส่วนมาก Phillips สันนิษฐานว่า การดูดซับที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นภายในโมเลกุลของ HSCAS นี้ น่าจะเกิดจากการที่ AFB1 มีโมเลกุลอยู่ในลักษณะเป็นแนวระนาบ (Planar) เดียวกับพื้นผิวระหว่างชั้นภายในโมเลกุลของ HSCAS ดังนั้นการที่ AFM1 มี -OH group อยู่ที่ตรงตำแหน่ง 9a เพิ่มขึ้นมาทำให้แนวระนาบผิดรูปไป จึงทำให้การแทรกตัวของ AFM1 ผ่านเข้าไปในระหว่างชั้นภายในโมเลกุลของ HSCAS เป็นไปได้ยากกว่า AFB1 (Phillips et al., 1995)

ศุภรัตน์ (2540) ได้ทำการทดสอบโดยใช้สาร Bentonite และ Zeolite อย่างละ 5 กรัม เติมลงในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ที่มี AFM1 ปนเปื้อนอยู่ 1 ppb ปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่าสาร Bentonite และ Zeolite สามารถดูดซับ AFM1 ได้ 100% และ 89% ตามลำดับ ต่อมาได้ทำการทดลองโดยใช้สาร Bentonite ปริมาณ 0.3 กรัม เติมลงในน้ำกลั่น และน้ำนมดิบที่มี AFM1 ปนเปื้อนอยู่ 10 ppb ผลที่ได้คือสาร Bentonite สามารถดูดซับ AFM1 ทั้งในน้ำกลั่นและในน้ำนมดิบได้ถึง  $666.66 \text{ ng/g}$  (ศุภรัตน์, 2542) ซึ่งแสดงว่า Bentonite มีประสิทธิภาพในการดูดซับ AFM1 ได้ดีกว่า HSCAS ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากกลไกการเข้าจับ AFM1 ของสาร Bentonite และ HSCAS มีความแตกต่างกัน

Scheideler (1993) ทำการการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการจับกับ AFB1 ของ Aluminosilicates ที่ผลิตโดยบริษัทต่างๆ ที่ผลิตและจำหน่ายตามท้องตลาดได้แก่ Ethacal<sup>®</sup>, Novasil<sup>™</sup>, Perlite และ Zeobrite พบว่ามีความสามารถในการดูดซับ AFB1 แตกต่างกันตั้งแต่ 0.06 - 0.80  $\mu\text{g/g}$  แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทางโครงสร้างและคุณภาพของ Aluminosilicates ที่นำมาใช้มีผลให้ประสิทธิภาพในการดูดซับ AFB1 ได้ไม่เท่ากัน ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ NovaSilplus<sup>™</sup> เพียงตัวเดียวเท่านั้น จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่าในการศึกษาครั้งต่อไปในอนาคตควรมีการนำเอา Aluminosilicates ชนิดอื่นๆ มาทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับกับ AFM1 เพื่อจะให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ Aluminosilicates ชนิดต่างๆ

## ระยะที่ 2 ศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

การศึกษาในระยะนี้ เลือกใช้น้ำหนักของ HSCAS 3 g เพราะเป็นระดับที่สามารถดูดซับ AFM1 ในสารละลายได้ 100% เพื่อให้ผลการศึกษามีความชัดเจน และเชื่อมั่นได้มากขึ้น

จากผลการทดลองที่ 3 พบว่าตัวทำละลายผสมที่ใช้ในการสกัด AFM1 ซึ่งมีส่วนผสมของสารละลาย 3 ชนิดได้แก่  $H_2O$  : Methanol : Acetonitrile ในอัตราส่วน 57:23:20 เป็นตัวทำละลายชนิดเดียวที่มีความสามารถในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS สามารถอธิบายสิ่งที่เกิดขึ้นได้ดังนี้คือ เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางเคมีของ AFM1 และ HSCAS แล้วจะเห็นว่า AFM1 นั้นสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วหลายชนิด เช่น Methanol, Acetonitrile, Ethanol, Chloroform และสามารถละลายได้เล็กน้อยใน  $H_2O$  แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วเช่น Petroleum ether และ Hexane จากผลการศึกษาของ Grant and Phillips (1998) พบว่า HSCAS มี trace metals 5 ชนิด คือ Al, Ca, Fe, Mg และ Si อยู่ในโครงสร้างของมัน ดังนั้นเมื่อ HSCAS ดูดซับ AFM1 ไว้แล้วจะทำให้เกิด chemisorption ภายใน interlamellar region โดยมี metal edge site จาก Al, Fe, Mg และ Si ทำหน้าที่ดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน จากบริเวณส่วนนอก (exterior) ของพื้นผิว ทำให้ HSCAS สามารถจับกับสารพิษอะฟลาทอกซินได้อย่างแน่นหนา ซึ่งเหตุผลนี้อาจใช้อธิบายความยากในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS สารละลายอินทรีย์เพียงชนิดเดียวอาจจะไม่มีความสามารถเพียงพอที่จะสกัด AFM1 ออกมาได้ ดังนั้นอาจต้องมีการผสมสารละลายอินทรีย์เคมีหลายๆชนิดเข้าด้วยกัน เพื่อเพิ่มความสามารถที่จะสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติของ HSCAS คือมีความสามารถในการรับหรือปล่อยน้ำออกจากโครงสร้างได้เป็นอย่างดี และมีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุ (Mumpton and Fishman, 1977) แสดงให้เห็นว่า HSCAS เป็นสารที่มีขั้วมากพอสมควร ดังนั้นเมื่อนำ HSCAS มาผสมเข้ากับสารละลายที่มีขั้วน้อย หรือไม่มีขั้ว ดังเช่นสารละลายที่ใช้ในการทดลองที่ 3 นี้ได้แก่ Benzene, n-Hexane, Cyclohexane, Toluene, Diethyl ether, Chloroform, Methylene chloride และ Isopropanol สาร HSCAS จะเกิดการจับตัวเป็นก้อนนึ่มๆ คล้ายดินน้ำมัน อาจเนื่องมาจากเพราะโดยธรรมชาติแล้วสารที่มีขั้ว จะผสมเข้าด้วยกันด้วยดีกับสารที่มีขั้ว และจะแยกชั้นเมื่อผสมลงในสารที่ไม่มีขั้ว เช่น น้ำกับน้ำมัน เป็นต้น ดังนั้นนี่คือเหตุผลที่ว่าทำไมสารละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองที่ 3 จึงไม่มีความสามารถในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS

จากผลการทดลองที่ 4 พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS คือที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}C$  และใช้เวลาในการสกัดนาน 15 นาที ผลที่พบนี้แสดงถึงว่าปฏิกิริยาในการสลายพันธะที่ใช้จับกันระหว่าง AFM1 และ HSCAS นั้นจะต้องใช้อุณหภูมิที่สูงพอสมควรและที่สำคัญจะต้องใช้ระยะเวลาในการสกัดอย่างเหมาะสม เพื่อให้ AFM1 ถูกแยกออกจากการจับของ HSCAS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในกรณีที่ใช้ระยะเวลาในการสกัดแยกนานเกินไปคือ 30 นาที เป็นผลทำให้ % recovery เท่ากับ 0 อาจเนื่องมาจาก

การให้ความร้อนที่ 40 °C นาน 30 นาที มีผลทำให้ตัวทำละลายต่างๆ เช่น Acetonitrile และ Methanol ที่อยู่ในส่วนผสมนั้นมีการระเหยไปบางส่วน ทำให้อัตราส่วนของตัวทำละลายผสม (H<sub>2</sub>O : Methanol : Acetonitrile ในอัตราส่วน 57:23:20) ที่ใช้ในการสกัดแยก AFM1 มีอัตราส่วนเปลี่ยนแปลงไป เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ลดลง ส่วนในกรณีที่ใช้ระยะเวลาในการสกัดแยกน้อยเกินไปคือ 5 นาทีนั้น อาจกล่าวได้ว่าปฏิกิริยาในการสกัดแยกยังเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ดี จึงเป็นผลทำให้ % recovery ที่อุณหภูมิ 40 °C ระยะเวลาในการสกัดนาน 5 นาที มีค่าน้อยกว่า % recovery ที่อุณหภูมิ 40 °C เวลาในการสกัด 15 นาที

ในรายงานของ Phillips et al. (1995) ได้กล่าวไว้อย่างคร่าวๆ ถึงผลการศึกษาที่นำ HSCAS มาประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์ AFB1 ในสารสกัดจากข้าวโพดดังนั้นคือ ทำการศึกษาโดยนำ HSCAS มาเคลือบไว้บนผิวของเม็ดทรายเพื่อเพิ่ม Hydraulic conductivity และทำให้การกรองผ่านของสารละลายดีขึ้น จากนั้นจะนำ HSCAS ไปอบที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาด 125 μm และ 300 μm นำมาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเล็กที่เคลือบไว้ด้วยเซลลูโลส โดยจะเรียกคอลัมน์นี้ว่า HSCAS-packed column เพื่อใช้สำหรับสกัดแยก AFB1 ผลการศึกษาพบว่า การแยก AFB1 ออกจากสารอื่นๆ โดยใช้ HSCAS-packed column ให้ผลดีเมื่อเปรียบเทียบกับ การแยกโดยใช้ Immunoaffinity column ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 7 อย่างไรก็ตามรายงานฉบับนี้ไม่ได้กล่าวถึงชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด AFB1 ออกจาก HSCAS-packed column เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 4 พบว่าการศึกษาในขั้นตอนนี้ HSCAS มีความสามารถในการดูดซับกับ AFM1 ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำนมดิบ และสามารถสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ได้เช่นกัน แต่ผลที่ได้ในขั้นตอนนี้อาจจะยังไม่เป็นที่น่าพอใจนักเพราะการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุดให้ % recovery เพียง 32% แสดงว่าควรต้องมีการดัดแปลง HSCAS ก่อนนำมาใช้ในการสกัดแยก AFM1 ออกจากน้ำนมดิบ ในทำนองเดียวกับการศึกษาของ Phillips และ Sarr เพื่อให้ HSCAS อยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในงานวิเคราะห์

## 5.2 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้นว่า การศึกษาถึงวิธีการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ในปัจจุบันนั้นยังไม่มีรายงาน การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับการนำเอา HSCAS มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ดังนั้นจะขอสรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะในแง่ของการนำเอา HSCAS มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำหรับการสกัดแยกและวิเคราะห์ปริมาณ AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นมต่อไปในอนาคต

1. ปริมาณสาร HSCAS ที่ 3.0 กรัม มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะดูดซับ AFM1 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ในน้ำปราศจากไอออนออกได้ทั้งหมด โดยใช้เวลาในการดูดซับที่ 5 นาที



2. ปริมาณสาร HSCAS ที่ 3.0 กรัม สามารถดูดซับ AFM1 ในน้ำนมดิบที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb ได้อย่างมีประสิทธิภาพ 100% โดยใช้เวลาในการดูดซับ 5 นาที

3. ตัวทำละลายผสมซึ่งประกอบด้วย  $H_2O$  : Methanol : Acetonitrile ในอัตราส่วน 57:23:20 มีความสามารถในการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS ได้

4. ในการสกัด AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS จะต้องใช้สภาวะที่อุณหภูมิ  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  และใช้เวลาในการสกัดนาน 15 นาที จะเป็นสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS โดยอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม ( $H_2O$  : Methanol : Acetonitrile ในอัตราส่วน 57:23:20) : HSCAS ที่ 5:1 จะเป็นอัตราส่วนที่ให้ % recovery ที่สูงที่สุดสำหรับการศึกษาค้างนี้

#### ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

เป็นการสร้างข้อมูลพื้นฐานในการนำ HSCAS มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสำหรับสกัดแยก AFM1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมต่อไปในอนาคต

#### ข้อเสนอแนะสำหรับงานต่อไปในอนาคต

1. ควรทำการทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอื่นๆ ที่นอกเหนือจากที่ใช้ในการทดลองนี้ เพื่อการสกัดแยก AFM1 ออกจากการดูดซับของ HSCAS เช่นทดสอบตัวทำละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ในสัดส่วนต่างๆ การปรับค่า pH ของตัวทำละลาย หรือหาอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม : HSCAS ที่ให้ % recovery ที่มากที่สุด เป็นต้น

2. ควรมีการนำ Aluminosilicate ชนิดต่างๆ นอกเหนือจาก NovaSilplus™ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Aluminosilicate ที่สามารถพบและผลิตได้เองในประเทศไทยมาทำการทดสอบความสามารถในการดูดซับกับ AFM1 เพื่อจะได้ทราบถึงประสิทธิภาพของ Aluminosilicate ที่สามารถผลิตได้เองในประเทศไทยเปรียบเทียบกับ Aluminosilicate ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

3. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงวิธีที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแยก AFM1 ออกจาก HSCAS เช่นการนำ HSCAS มาเคลือบไว้บนผิวของเม็ดทรายเพื่อเพิ่ม Hydraulic conductivity และทำให้การกรองผ่านของสารละลายดีขึ้น หรือการนำ HSCAS ไปอบที่อุณหภูมิ  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, การนำ HSCAS ไปกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาด  $125\text{ }\mu\text{m}$  และ  $300\text{ }\mu\text{m}$  และนำสาร HSCAS มาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเล็กที่เคลือบไว้ด้วยเซลลูโลส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแยก AFM1 เป็นต้น

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

คณะอนุกรรมการจัดทำพจนานุกรมธรณีวิทยา. 2530. พจนานุกรมศัพท์ธรณีวิทยา. กรุงเทพมหานคร : บริษัทตรีดีการพิมพ์จำกัด.

เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2540. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำมัน และปริมาณอะฟลาทอกซิน บี1 ในอาหารเลี้ยงโคนม. การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การประเมินผล และจัดทำแผนการดำเนินงานของโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์อย่าง ครบวงจร. โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. วันที่ 14-16 กันยายน 2542 โรงแรม เมเลีย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์.

เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2544. การศึกษาหาชนิดของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ผสมในอาหารชั้น และชนิด ของอาหารหยาบสำหรับเลี้ยงโคนม ที่มีผลกระทบต่ออัตราการขับออกของสารพิษอะฟลาทอกซิน ทางน้ำมันของแม่โครีดนม. รายงานการสัมมนาเรื่อง การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและ อาหารสัตว์อย่างครบวงจร. โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. วันที่ 17-19 กุมภาพันธ์ 2544 โรงแรมริเจนท์ จ.เพชรบุรี.

ปศุสัตว์, กรม. 2544. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนม. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

เพิ่มพูน กীরติกสิกร. 2528. เคมีของดิน. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล. 2540. ผลของสารซีโอไลท์และสารเบนโทไนท์ต่อแอฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำมัน พาสเจอร์ไรส์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล. 2542. การใช้สารเบนโทไนท์ดูดซับแอฟลาทอกซินเอ็ม 1 ออกจากน้ำมันดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุเทพ เรืองวิเศษ และ เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2539. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซิน บี1 ในอาหารโคนมและปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 ในน้ำมัน รายงานผลการวิจัยทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุมา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุดประเสริฐ. 2537. การวิเคราะห์หาปริมาณอฟลาทอกซินเอ็ม 1 และเอ็ม2 ในนมและผลิตภัณฑ์นม. วารสารกระทรวงสาธารณสุข. ปีที่ 13 ฉบับที่ 7-9 : 108-113.

### ภาษาอังกฤษ

Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W., and Marth, E.H. 1982. Aflatoxin : Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk product A Review. Journal of Food Protection 45 (8) : 752-777.

AOAC. 1990. Association of Official Analytical Analysis Official Method of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

- AOAC. 1990a. AOAC Official Method 986.16 Aflatoxin M1 and M2 in fluid milk. Liquid Chromatographic Method. Association of Official Analytical Analysis Official Method of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- AOAC. 1996. AOAC Official Method 986.16 Aflatoxin M1 and M2 in fluid milk, Liquid Chromatographic Method. Official Methods of Analysis of AOAC International. Sixteenth Edition. Chapter 49 : 34–35. AOAC International. USA.
- Beaver, R.W., Wilson, D.M., James, M.A., Haydon, K.D., Colvin, B.M., Sangter, L.T., Pikul, A.H., and Groopman, J.D. 1990. Distribution of aflatoxins in tissue of growing pigs fed an aflatoxin-contaminated diet amended with a high affinity aluminosilicate sorbent. Nutr. Abstr. Rev. (Series B) 60(7) : 568. (Abstr).
- Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Cotty, P.J. 1994. Mycological aspects of aflatoxin formation. In D.L.Eaton and J.D. Groopman (eds.), The toxicology of aflatoxins human health, veterinary, and agricultural significance. pp. 327–346. New York : Academic Press.
- Boutrif, E., and Canet, C. 1998. Mycotoxin prevention and control : FAO programmes. Revue. Med. Vet. 149(6) : 681–694.
- Chesnut, A.B., Anderson, P.D., Cochran, M.A., Fribourg, H.A., and Gwinn, K.D. 1992. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on Fescue toxicosis and mineral absorption. J. Anim. Sci. 70 : 2838–2846.
- Chu, F.S. 1990. Immunoassays for mycotoxins : Current state of art, commercial and epidemiological application. Vet. Hum. Toxicol. 32 : 42–50. (Suppl.).
- Chung, T.K., Erdman, J.W. and Baker, D.H. 1990. Hydrated sodium calcium aluminosilicates: Effects on zinc, manganese, vitamin A and riboflavin utilization. Poult. Sci. 69 : 1364–1370.
- Codex Alimentarius Commission. 2001. The report of the 33<sup>th</sup> session of the Codex committee on Food Additive and Contaminants. The Hague, The Netherlands 12–16 March 2001. ALINORM 01/12A : 19–20.
- Cronstedt, A.F. 1975. Kongl. Svenska Vetenskaps Acad Handlingar. (Abstr).
- Cullen, J.M., B.H. Reubner, L.S. Hsieh, D.M. Hyde, and D.P. Hsieh. 1987. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fischer rats compared to aflatoxin B1. Cancer Res. 47:1913–1917
- FAO. 1995. Worldwide regulations for mycotoxins 1995–A compendium. FAO Food and Nutrition paper No.64. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nation.
- Grant, P.G., and T.D. Phillips. 1998. Isothermal Absorption of Aflatoxin B1 on HSCAS Clays. J. Agric. Food Chem. 46:599–605.

- Harvey, R.B., Kubena, L.F., and Phillips, T.D. 1988. Possible methods to combat the mycotoxin problem. Cited by Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Elissalde, M.H., and Huff, W.E. 1988. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. American Journal Veterinary Researches 52(11) : 152-156.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., and Phillips, T.D., Huff, W.E., and Corrier, D.E. 1989. Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to the diets of growing barrows. American Journal Veterinary Researches 50(3) : 416-420.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Elissalde, M.H., and Huff, W.E. 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. American Journal Veterinary Researches 52(1) : 152-156.
- Hendricks, J.D. 1994. Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms. In D.L.Eaton and J.D. Groopman (eds.), The toxicology of aflatoxins human health, veterinary, and agricultural significance. pp. 103-136. New York : Academic Press.
- Hsieh, D.P., J.M. Cullen., and B.H. Ruebner. 1984. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 and M1 in the rat. Fd. Chem. Toxicol 22:1027-1028.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. Some naturally occurring substance : food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monograph. 56:245-395.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2001. The summary and conclusions meeting report of the 56<sup>th</sup> session of the Codex committee on Food Additive and Contaminants. The Geneva 6-15 February 2001.: 12
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E., and Huff, W.E. 1990a. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate. Poult. Sci. 69(8) : 727-735.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E., Phillips, T.D., and Rottinghaus, G.E. 1990b. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. Poult. Sci. 69(8) : 1078-1086.
- Kubena, L.F., W.E., Harvey, R.B., Huff, Corrier, Yersin, A.G., Elissalde, M.H., Witzel, D.A., Giroir, L.E., Phillips, T.D., and Perterson, H.D. 1991. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. Poult. Sci. 70(8) : 1823-1830.
- Mahanna, B. 1999. Prevention and (If necessary) management of moldy silage. Moldy Feed. Dissertation Abstracts.

- Mary, W.T., and Garnett, E.W. 1994. Recent method of Analysis for Aflatoxins in Food and Feeds. In D.L.Eaton and J.D. Groopman (eds.), The toxicology of aflatoxins human health, veterinary, and agricultural significance. pp. 409-431. New York : Academic Press.
- Mumpton, F.A., and Fishman, P.H. 1977. The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. J. Anim. Sci. 45 : 118-120.
- Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R., Heidelbaugh, N.D. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate. A high affinity sorbent for aflatoxin. Poult. Sci. 67 : 243-247.
- Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F., Harvey, R.B. 1990. Detection and detoxification of aflatoxins. Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. Vet. Hum. Toxicol. 32 : 15-19. (Suppl.)
- Phillips, T.D., A.B. Sarr., and P.G. Grant. 1995. Selective Chemisorption and Detoxification of Aflatoxins by Phyllosilicate Clay. Natural Toxins 3:204-213.
- Phillips, T.D. 1999. Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease. Toxicological Sciences. 52 (Supplement) : 118-126.
- Rodricks, J.V., and L. Stoloff. 1977. Mycotoxin in Human and Animal Health. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissue of food producing animal. pp.67-79. Illinois. Pathotox. Park Forest South.
- Saitanu, K. 1997. Incidence of Afltoxin M1 in Thai Milk Products. J. Food Prot. 60.(8): 1010-1012.
- Sargent, K., Kelly, J.O., Carnaghan, R.B.A., and Allcrif, R. 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meal. Vet. Rec. 73 : 1219.
- Scheideler, S.E. 1993. Effects of Various Types of Aluminosilicates and Aflatoxin B1 on Aflatoxin Toxicity, Chicken Performance, and Mineral Status. Poult. Sci. 72 : 282-288.
- Shank, R.C., and Wogan, G.N. 1965. Distribution and excretion of C14 labelled aflatoxin B1 in rat. Fed. Pro. 24 : 127.
- Sieber, R., and B. Blanc. 1978. Zur Ausscheidung Von aflatoxin M1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten. Hyg. 69:477-491. (in German)
- Swenson, D.H., Lin, J.K., Miller, E.C., and Miller, J.A. (1997). Aflatoxin B1-2,3-epoxide as a probable intermediated in the covalent binding of AflatoxinB1 and B2. Cancer Res. 37, 172-181.
- Tuinstra, L.G.M., A.H., Roos., and Van Trip. 1993. Liquid Chromatography determination of aflatoxin m1 in milk powder using immunoaffinity column for clean up. Interlaboratory Study. J. of AOAC. International. 76.(6) : 1248-1254.

- Ueno, Y. 1983. Metabolism and mode of action of mycotoxin. Mycotoxins Bangkok, Mahidol University.
- Van Olphen, H. 1963. An Introduction to clay colloid chemistry. Cited by Seller, R.S., Harris, G.C., Waldroup, P.W. The effects to various dietary clays and fillers on the performance of broilers and laying hens. Poult. Sci. 59(8) : 1901-1906.
- Vicam, 1997. Validation Protocol for Vicam's AflaM1™ HPLC procedure for milk. (Mimeographed)
- Wogan, G.N. 1966. Chemical nature and biological effect of aflatoxins. Bacteriol. Rev. 30 : 460.
- Wogan, G.N., and S. Paglialunga. 1974. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M1 in rats. Fd. Cosmet. Toxicol 12:381-384.
- Yoshizawa, T. 1991. Natural occurrence of mycotoxins in small grains (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice). In J.E. Smith and R.S. Henderson (eds.), Mycotoxins and animal foods, pp. 301-324. Florida : CRC Press.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

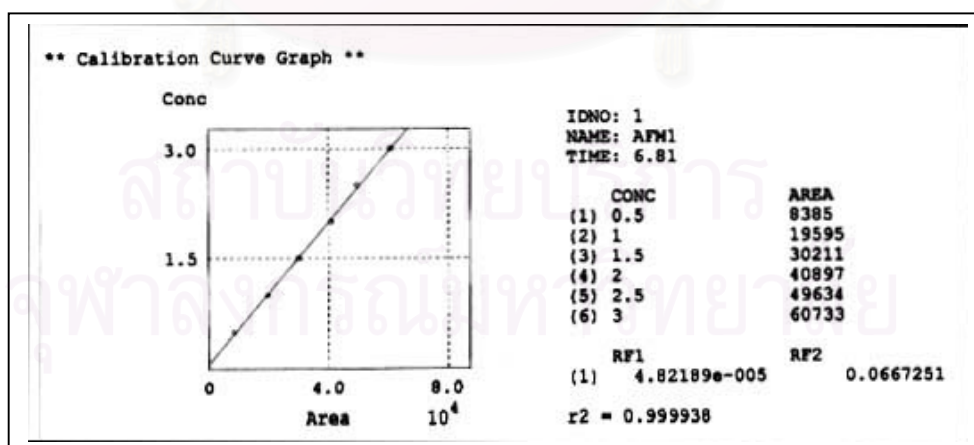
## ภาคผนวก ก

## การวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 โดยเทคนิค HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย

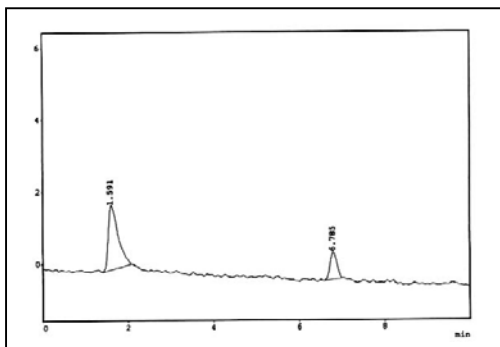
- Mobile Phase : H<sub>2</sub>O+Methanol : Acetonitrile = 80 : 20
  - Analytical column : Reverse phase C18
  - Injection volume : 20 µl
  - Flow rate : 1.0 ml/min
  - Temperature : 40 °C
  - Detector : Fluorescence
- $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}, \lambda_{em} = 440 \text{ nm}$

Peak ของ AFM1 ปรากฏที่ตำแหน่ง Retention time ประมาณ  $6.8 \pm 0.1$  นาที โดยที่ค่า Retention time ที่ได้ในแต่ละครั้งจะมีไม่แน่นอน ขึ้นกับการเตรียมสารละลาย Mobile Phase ในแต่ละครั้ง ดังนั้นในการเตรียม Mobile Phase ควรเตรียมให้เหมาะสมกับการใช้งานในแต่ละครั้ง แต่อย่างไรก็ตามก่อนที่จะเริ่มการทำงานในแต่ละวันนั้น ได้มีการฉีดสารมาตรฐาน AFM1 ในช่วงความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ppb เพื่อสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน โดยจะต้องมีค่า Correlation coefficient ( $r^2$ ) ไม่น้อยกว่า 0.995 ก่อนที่จะฉีดสารตัวอย่าง ถ้าค่า Correlation coefficient ยิ่งสูงจะแสดงถึงวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์มี linearity ที่ดี จะทำให้ผลที่ได้จากการทดลองมีความความถูกต้องและเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์

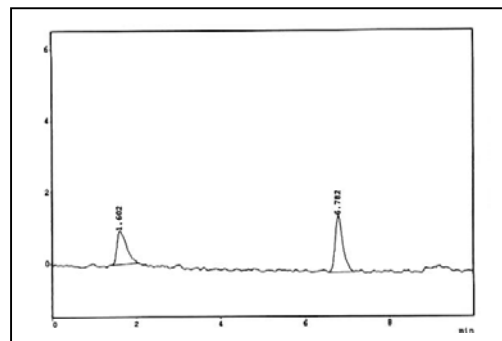


รูปแสดง Calibration Curve Graph โดยเครื่องคอมพิวเตอร์จะคำนวณค่า Correlation coefficient ( $r^2$ ) ที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐาน AFM1

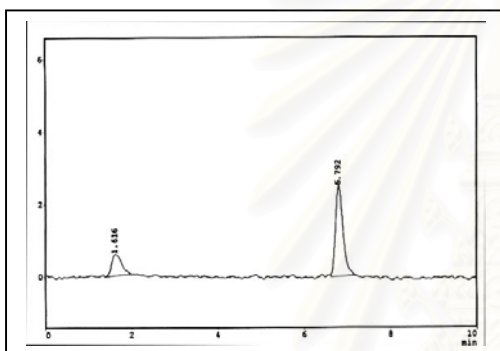




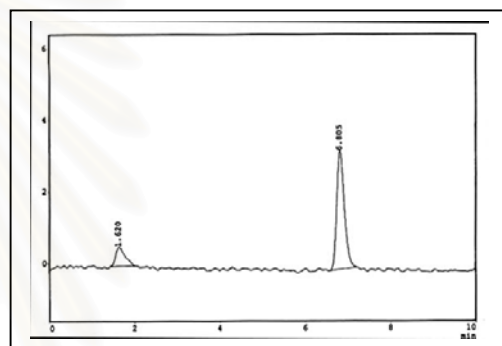
Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFM1  
ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppb



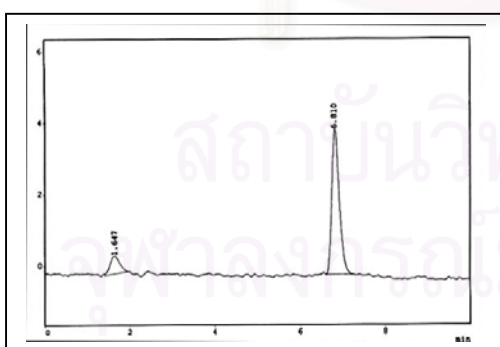
Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFM1  
ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ppb



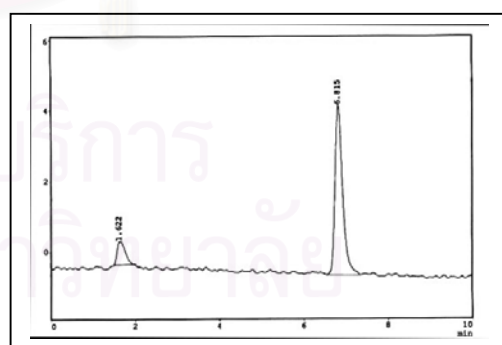
Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFM1  
ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 ppb



Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFM1  
ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ppb



Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFM1  
ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 ppb



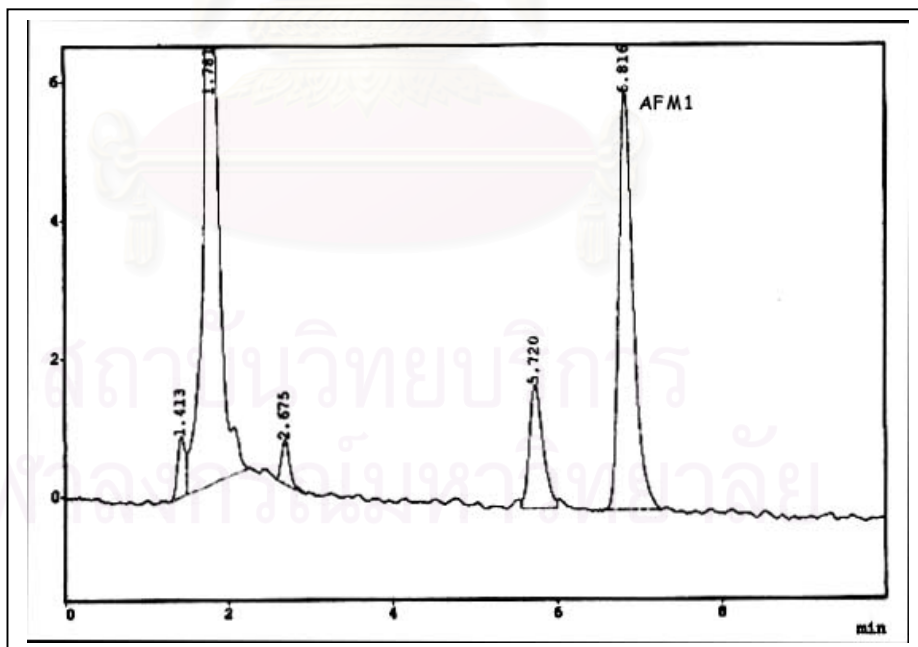
Chromatogram ของสารมาตรฐาน AFM1  
ที่ระดับความเข้มข้น 3.0 ppb

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 โดยใช้ AflaM1™ column

#### ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. นำน้ำมันดิบปริมาตร 50 ml ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวจ์ที่มีฝาปิด
2. นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการแยกชั้นไขมันที่อยู่ด้านบนออกให้หมด
3. เปิดน้ำมันดิบที่ได้ผ่านลงสู่ AflaM1™ column ปล่อยให้ไขมันดิบผ่านลงสู่คอลัมน์ โดยควบคุมให้มีอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที
4. ชะล้างสิ่งเจือปนออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 ml จำนวน 2 ครั้ง โดยมีอัตราการไหล 1-2 หยดต่อวินาที
5. เก็บสารละลาย AFM1 จากคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมของ Acetonitrile : Methanol (3:2) ปริมาตร 1.25 ml โดยมีอัตราการไหล 2-3 หยดต่อวินาที
6. เก็บสารละลาย AFM1 จากคอลัมน์อีกครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1.25 ml โดยมีอัตราการไหล 2-3 หยดต่อวินาที
7. ผสมสารละลายที่ได้ให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFM1 ต่อด้วย HPLC



Chromatogram แสดง Peak ของ AFM1 โดยใช้ AflaM1™ column ในการสกัด โดย Peak ของ AFM1 ปรากฏที่ตำแหน่ง Retention time ประมาณ  $6.8 \pm 0.1$  นาที

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

อาจารย์นายสัตวแพทย์โอฬาร ต้นวีรพงษ์ศิริ เกิดวันที่ 28 เมษายน พ.ศ. 2516 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี การศึกษา 2542 และทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวแพทย สาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการ ศึกษา 2543 โดยได้รับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์ เพื่อศึกษาต่อ ระดับปริญญาโท ในประเทศไทย ประจำปีการศึกษา 2543 จากทบวงมหาวิทยาลัย

### ผลงานทางวิชาการ

โอฬาร ต้นวีรพงษ์ศิริ ชัยวัฒน์ บุญแก้ววรรณ และชาญชัย พัฒนพิชัย. 2542. การศึกษาชนิด และความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของหูกอกเสบส่วนนอกในสุนัข. โครงการเสริม ทักษะการวิจัย ปีการศึกษา 2541 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โอฬาร ต้นวีรพงษ์ศิริ อลงกร อมรศิลป์ กิตติศักดิ์ อัมริยะชจร และชัยเดช อินทร์ชัยศรี. 2544. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนมดิบจากถังนมรวม ณ สหกรณ์โคนมกำแพงแสน. การประชุมวิชาการโคนม และผลิตภัณฑ์นม. โดยกรมปศุสัตว์ ชุมนุมสหกรณ์โคนมแห่งประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการ วิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย. วันที่ 13-14 ธันวาคม 2544 โรงแรมโซลทวินทาวเวอร์ จ.กรุงเทพฯ.

Rodkhum, C., Wongtavatchai, J., Surachetpong, W., Tonverapongsiri, O., Kumlungpeat, S., and Tangtrongpiros, J. 2001. Opportunistic Vibrios in cultured Taiwanese soft-shelled turtles. Thai J. Vet.Med. 31 (3) : 29-35.

ปัจจุบันทำงานเป็นข้าราชการพลเรือน ตำแหน่งอาจารย์ ประจำภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-2189577-9 โทรสาร 02-2189577