



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus*
สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในขมิ้นชันและขิง

DEVELOPMENT OF TEST KIT TO ANALYSE THE CONTAMINATION OF
ASPERGILLUS PRODUCE AFLATOXIN IN CURCUMIN AND GINGER

โดย

อาจารย์ภัทรา พลับเจริญสุข

อาจารย์ปณรตี สุศิริรัตน์

มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต

รายงานการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต

2556

คำสำคัญ : Loop Mediated Isothermal amplification, Aspergillus, อะฟลาทอกซิน, ขมิ้นชัน
ขิง

บทคัดย่อ

จากการพัฒนา การประเมินความเฉพาะเจาะจงและประสิทธิภาพความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรพื้นบ้านและขิง พบว่าเทคนิค LAMP อาศัยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ที่จำเพาะต่อยีนสร้างอะฟลาทอกซิน 6 บริเวณและเพิ่มปริมาณได้ด้วยอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเพียงอุณหภูมิเดียว ภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพความไวที่ความเข้มข้นเชื้อรา 10^{-7} เท่า มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างอะฟลาทอกซิน จำนวน 100 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับเทคนิค ELISA และเมื่อนำเทคนิค LAMP ไปตรวจวิเคราะห์หาเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรพื้นบ้านและขิงพบว่า ผลิตภัณฑ์ขิงจำนวน 20 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนผลิตภัณฑ์ขมิ้นชันจำนวน 6 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อราจำนวน 3 ตัวอย่าง ดังนั้นวิธี Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP) สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ได้โดยมีความเฉพาะเจาะจงและมีความไวสูง รวมทั้งให้ผลที่รวดเร็วและเชื่อถือได้

Title : Development of test kit to analyse the contamination of Aspergillus produce Aflatoxin in Curcumin and Ginger products

Researchers : Mrs. Pattra Plubcharoensook
Miss. Pannarasi Susirirut

Institution : Dhurakij Pundit University

Year of Publication : 2013

Publisher : Dhurakij Pundit University

Sources : Dhurakij Pundit University Research Center.

Number of Pages : Pages

Copyright : Dhurakij Pundit University

Keyword : Loop Mediated Isothermal amplification, Aspergillus, Aflatoxin, Curcumin, Ginger

Abstract

Development of test kit to evaluated the specificity and sensitivity of a Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP) method for analyze the contamination of Aspergillus produce aflatoxin in Curcumin and Ginger products. LAMP technique was designed a pair of outer primers and a pair of inner primers for recognizing six distinct sequences on aflatoxin gene. Amplifications were observed with sixty three Celsius in one hour. Sensitivity of this technique was 10^{-7} fold and specific with Aspergillus produce aflatoxin as same as ELISA technique. Determination of Aspergillus produce aflatoxin in Curcumin and Ginger products using LAMP demonstrated that Aspergillus produve aflatoxin was found in three of six Curcumin products and four of twenty Ginger products. LAMP was proven to be rapid, highly sensitive and specific method for detection of Aspergillus produce aflatoxin.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์วิจัย มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์ และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหารและห้องปฏิบัติการ Transgenic technology ในพืชและไบโอเซนเซอร์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและใช้ห้องปฏิบัติการรวมทั้งแนวทางในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง และอาจารย์มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์ ที่ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และกำลังใจด้วยดีเสมอมา

ท้ายที่สุดประโยชน์อันเนื่องมาจากการวิจัย จะพึงมีเพียงใด คุณความดีนั้นขอมอบแต่ บิดา มารดา และอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนถึงปัจจุบัน

คณะผู้วิจัย
มิถุนายน 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(4)
บทที่ 1	บทนำ
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย
	1.3 สมมติฐานของวิจัย
	1.4 ขอบเขตของการวิจัย
	1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
	2.1 อะฟลาทอกซิน
	2.2 การตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีวิจัย
	3.1 อุปกรณ์
	3.2 วิธีวิจัย
	3.2.1 พัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์
	3.2.2 เก็บตัวอย่างสมุนไพร

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย
4.1	ผลการพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์
4.2	ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างสมุนไพร
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ
5.1	สรุปผลการวิจัย
5.2	ข้อเสนอแนะ
เอกสารอ้างอิง	

(3)

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของปฏิกิริยาตามลำดับการดำเนินการในทางปฏิบัติ	21

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> สายพันธุ์สร้างอะฟลาทอกซิน	5-6
2	บริเวณของดีเอ็นเอแม่แบบที่สัมพันธ์กับไพรเมอร์ 6 บริเวณ	16
3	บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับวงจรของไพรเมอร์ไขว้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้าง loop	17
4	ขั้นตอนเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา LAMP	18
5	ขั้นตอนการจัดสายดีเอ็นเอในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้าน forward ช่วงแรก	19
6	ขั้นตอนการจัดสายดีเอ็นเอในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้าน backward ในช่วงแรกเพื่อสร้างโครงสร้าง dumb-bell	19
7	ขั้นตอนการจัดสายดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณในช่วงที่สองซึ่งเป็นช่วงกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบทวีคูณ	20
8	ตัวอย่างโคโลนีเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> และ <i>Aspergillus paraciticus</i>	27
9	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซ่ ขนาดที่ต้องการจากเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> และ <i>Aspergillus paraciticus</i>	28
10	ผลการสกัดพลาสมิด DNA ที่ได้จากการโคลนยีนสร้างอะฟลาทอกซิน จำนวน 5 โคลน	29
11	แถบ PCR เพื่อตรวจสอบยีนสร้าง aflatoxin ที่โคลนจากพลาสมิด	29
12	ผลการทดสอบสารอะฟลาทอกซินเชิงคุณภาพด้วยชุดตรวจสอบเทคนิค ELISA	30
13	ความไวของการตรวจวิเคราะห์ยีนสร้างอะฟลาทอกซิน ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	31
14	ผลการตรวจสอบตัวอย่างขิงและขมิ้นชันด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification	32

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันสมุนไพรกำลังอยู่ในกระแสมากมายและมีบทบาทในชีวิตประจำวันของประชาชนทั่วไปอย่างกว้างขวางทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากสมุนไพรมีสรรพคุณมากมายในการรักษาโรคและเป็นอาหารบำรุงร่างกาย จึงมีการแปรรูปสมุนไพรเป็นรูปแบบต่าง ๆ เช่น อาหารเสริมสุขภาพ ยาแผนโบราณและเครื่องสำอาง รวมถึงในรูปของสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืช และสมุนไพร นอกจากนี้ยังเข้าไปมีบทบาทในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหารเสริม อุตสาหกรรมยารักษาโรค ซึ่งมีการส่งออกไปยังหลายประเทศเช่น สหรัฐอเมริกา เยอรมัน ออสเตรเลีย ไต้หวัน และเกาหลีใต้ เป็นต้น (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2545) สมุนไพรโดยทั่วไปมีการนำไปใช้ทั้งแบบสดและแบบแห้ง ซึ่งแบบแห้งเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากคุณภาพคงที่ กรรมวิธีการผลิตสะดวก สามารถเก็บรักษาได้นานและง่ายต่อการนำไปใช้มากกว่าแบบสด (อมร, 2550) ปัจจุบันจึงได้มีมาตรฐานกำหนดความปลอดภัยของสมุนไพร เพื่อให้ได้คุณภาพและปลอดภัยอย่างแท้จริงเป็นที่ยอมรับของประชาชนผู้บริโภคและสอดคล้องต่อการส่งออกสมุนไพรของประเทศที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2543) ซึ่งปัญหาหนึ่งที่สำคัญในการส่งออกผลิตผลทางการเกษตรและสมุนไพร ได้แก่ การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2544) ซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* สายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* มีสมบัติเป็นพิษต่อคน สัตว์และพืช ซึ่งในคนนั้น อะฟลาทอกซินสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางตรงและทางอ้อมจากการบริโภค โรคที่ตรวจพบในคนอันเนื่องมาจากสารอะฟลาทอกซิน ได้แก่ โรคมะเร็งตับ โรคตับอักเสบ โรคตับแข็ง โรคสมองอักเสบ (Calvo et al, 2002) สภาวะเหมาะสมที่ทำให้อะฟลาทอกซินเกิดได้ดีคือภูมิอากาศแบบร้อนชื้น โดยสารพิษจะอยู่ภายในวัตถุดิบ และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ประเทศไทยอยู่ในภูมิอากาศดังกล่าว และการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน สามารถเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่การเก็บเกี่ยวผลผลิต การตากแห้ง การบด การบรรจุ ระหว่างการเก็บรักษา และการขนส่ง ดังนั้นผลิตภัณฑ์สมุนไพรจึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน นอกจากอะฟลาทอกซินจะเป็นปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพและอนามัยของประชาชนผู้บริโภคโดยตรงแล้ว ยังเป็นปัญหาทั้งในและต่างประเทศในการนำมาใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้าของ

EU ตาม European Commission Regulation เลขที่ 2174/2003 ดังนั้นจึงควรมีการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อน โดยแนวทางหนึ่งต้องมีการสุ่มตรวจสอบสมุนไพร และผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีปริมาณสารอะฟลาทอกซินไม่เกินมาตรฐานตามกฎหมายกำหนดอย่างสม่ำเสมอจนถึงผู้บริโภค จากข้อมูลการส่งออกพบว่า สมุนไพรที่มีการส่งออกและมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี คือ ขมิ้นชันและขิง ซึ่งปัญหาสำคัญที่พบในการส่งออกคือ ปัญหาด้านข้อกำหนดและมาตรฐานที่สูงของแต่ละประเทศ โดยเฉพาะปัญหาด้านการปนเปื้อนของสารพิษและสิ่งแปลกปลอมในสมุนไพร ดังที่กล่าวมา

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการหาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินกับสมุนไพร และพัฒนาระบบการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน ที่สามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจวิเคราะห์ที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำแม้มีการปนเปื้อนในปริมาณน้อย รวมถึงไม่ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการ ผู้ประกอบการและประชาชนทั่วไปสามารถตรวจวิเคราะห์เองได้ทุกที่ตามหลักการ point of care test ซึ่งจะช่วยให้ปัญหาการปนเปื้อนสารพิษดังกล่าวลดลง

ขณะนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทาง Immunoassay ในรูปแบบการแข่งขันแบบตรง โดยสารอะฟลาทอกซินจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างที่บดละเอียด ด้วยสารละลายเมทานอล อะฟลาทอกซินในสารสกัดที่กรองได้ จะถูกนำไปแข่งขันกับสารอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ซึ่งบอกในการที่จะไปเกาะจับกับแอนติบอดี ที่ถูกเคลือบไว้ที่ก้นหลุมทดสอบ แล้วบ่มไว้ประมาณ 30 นาที จึงเทของเหลวในหลุมทิ้ง แล้วล้างส่วนของสารพิษอิสระ และสารพิษที่ผูกติดกับเอนไซม์ซึ่งบอก ส่วนที่ไม่เกาะจับกับแอนติบอดีทิ้งไป ส่วนของสารพิษที่ผูกติดกับเอนไซม์ซึ่งบอก ที่เกาะจับกับแอนติบอดีในหลุมทดสอบ สามารถประเมินได้โดยการเติม substrate ที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ซึ่งบอก เกิดเป็นสี ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากผลของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate สามารถอ่านได้ด้วยสายตาเปรียบเทียบกับสีที่เกิดขึ้น ในหลุมทดสอบของสารพิษมาตรฐาน ระดับต่าง ๆ หลุมทดสอบใดมีปริมาณสารพิษน้อยจะเกิดสีเข้ม ถ้ามีสารพิษมากจะเกิดสีจางตามลำดับ การอ่านปริมาณสารพิษสามารถทำได้โดยอ่านความเข้มของสีในหลุมทดสอบ ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ซึ่งเป็นเครื่องมือเฉพาะและมีราคาแพง (อมรา และคณะ, 2547) ต่อมาผู้พัฒนาเทคนิค Polymerase chain reaction ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ซึ่งมีขั้นตอน 2 ส่วน คือการสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อแสดงผล พบว่าดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจมีระดับต่ำมาก และอาศัยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน 2-3 ระดับ (Degola *et al.*, 2007) การตรวจวิเคราะห์และการประยุกต์ใช้ยังมีข้อจำกัดต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือที่มีราคาแพง จึงทำภาคสนามไม่ได้ จึงมีการพัฒนาการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP)

LAMP เป็นเทคนิคที่อาศัยการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียว ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาทีด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว ให้ความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิค Polymerase chain reaction และตรวจดูจากความขุ่นของปฏิกิริยา ทำให้การวิเคราะห์ทำได้ง่าย รวดเร็ว (Notomi *et al.*, 2000) เป็นไปตามหลักการ point of care test ช่วยให้การตรวจทำได้ทุกที่

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินในพืชสมุนไพรที่เป็นไปตามหลักการ point of care
2. เพื่อหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสมุนไพรที่เหมาะสมเพื่อการตรวจวิเคราะห์
3. เปรียบเทียบศักยภาพชุดตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค LAMP และชุดตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค ELISA ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการของไทย

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. เทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม LAMP สามารถตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินในขมิ้นชันและขิงบนหลักการ point of care ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. สามารถหาวิธีสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราที่เหมาะสมจากขมิ้นชันและขิงเพื่อการวิเคราะห์
3. สามารถเปรียบเทียบศักยภาพชุดตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค LAMP กับชุดตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค ELISA

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์บนพื้นฐานเทคนิค LAMP ในสมุนไพร 2 ชนิดคือ ขมิ้นชันและขิง ที่วางจำหน่ายทางการค้า เน้นการตรวจวิเคราะห์ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ชุดตรวจวินิจฉัยอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค LAMP ที่เป็นไปตามหลักการ point of care
2. ได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราที่เหมาะสมจากตัวอย่างสมุนไพร
3. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสถานการณ์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในขมิ้นชันและขิง

4. ใช้เป็นหลักในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร
5. ผลงานสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในรูปของบทความวิจัยในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

DRAFT

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

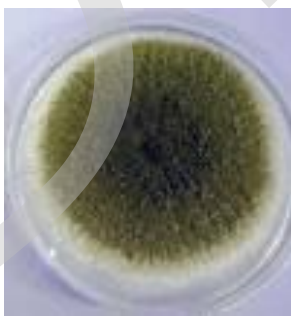
2.1 อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins) เป็นกลุ่มสารพิษชนิดทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่สร้างโดยเชื้อราแอสเพอร์จิลลัสฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) และแอสเพอร์จิลลัสพาราซิติกัส (*Aspergillus parasiticus*) ที่พบในอาหารและผลิตผลทางเกษตรกรรม จัดเป็นสารเคมีอันตรายที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลหรือการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของเชื้อรา มีคุณสมบัติทางชีวภาพเป็นพิษต่อคน สัตว์และพืช

2.1.1. การจำแนกสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน

สารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน จัดแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

2.1.1.1 จำแนกตามสายพันธุ์ของเชื้อรา สารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน เกิดจากเชื้อราสายพันธุ์แอสเพอร์จิลลัส ซึ่งมีรูปร่างคล้ายดอกไม้ ที่ปลายก้านชูโคนิเดีย (conidia) พองออกเปลี่ยนเป็นรูปกระเปาะ สปอร์ไม่มีสิ่งห่อหุ้มเกาะกลุ่มกันจำนวนมากอยู่บนปลายก้านชูโคนิเดีย ซึ่งสปอร์ที่อยู่ส่วนนอกสุดสามารถแพร่กระจายได้ง่าย เชื้อราสายพันธุ์นี้ เจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น โดยส่วนใหญ่อะฟลาทอกซินสร้างจากเชื้อราแอสเพอร์จิลลัสพาราซิติกัส (ภาพที่ 1)



A



B



ภาพที่ 1 A แสดงโคโลนีของเชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้างอะฟลาทอกซิน

B แสดงพืชที่มีการปนเปื้อนเชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้างอะฟลาทอกซิน

2.1.1.2 จำแนกตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารตัวกลาง สารตัวกลางทำหน้าที่เป็นสารที่นำไปสู่การสังเคราะห์สารพิษทางชีวภาพ อะฟลาทอกซินได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารพิษกลุ่มคีไทด์ ซึ่งจัดเป็นสารตัวกลาง สารตั้งต้นคือกลีโคแอลเตต และกลีโคมาโลเนต ถูกกระตุ้นด้วยโคเอนไซม์เอ ได้เป็นแอลซีดีลโอเอและมาโลนิจโคเอ หลังจากนั้นสารทั้งสองจะรวมตัวกันได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ของไดคีไทด์ หรือแลซีโทแอลซีดีลโอเอ พร้อมกับปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยารวมตัวทุกครั้ง หมู่แอลซีดีลจะถูกเติมลงในสารตัวกลางคีไทด์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนได้เป็นเดคีไทด์ และจะมีปฏิกิริยาผ่านตัวกลางอีกหลายชนิด ซึ่งสารตัวกลางเหล่านี้จะถูกดีคาร์บอกซิเลต ถูกออกซิไดส์และด้วยปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ จนเกิดเป็นวงแหวนกลายเป็นสารพิษอะฟลาทอกซินได้

อะฟลาทอกซินเป็นสารพวงบิส-ฟิวราโน-ไอโซคูมาริน เชื่อมกับวงแหวนไซโคลเพนดีโนนได้เป็นอะฟลาทอกซินชนิดบี ซึ่งเรืองแสงให้สีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ในช่วงคลื่นยาว 256 ถึง 365 นาโนเมตร หรือเชื่อมกับวงแหวนแลคโตนได้เป็นอะฟลาทอกซินชนิดจี ซึ่งเรืองแสงให้สีเขียวภายใต้แสงช่วงคลื่นเดียวกัน ความเข้มของแสงที่เรืองนี้ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน ดังนั้นจึงใช้คุณสมบัติการเรืองแสง เป็นวิธีทดสอบและตรวจวัดหาปริมาณอะฟลาทอกซินได้

อะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพหรือการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของเชื้อรา ทำให้เชื้อราสร้างสารพิษได้ 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 ซึ่งเรืองแสงให้สีน้ำเงิน อะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินจี 2 ซึ่งเรืองแสงให้สีเขียว เมื่อคนและสัตว์ได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพของสารพิษอะฟลาทอกซินหรือการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของสารพิษในร่างกาย อะฟลาทอกซินที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลไปจากเดิมเรียกว่าอะฟลาทอกซินเมแทบอลิไลต์ ซึ่งอาจมีคุณสมบัติการเรืองแสงให้สีเหมือนเดิมหรือเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 เรืองแสงให้สีน้ำเงิน อะฟลาทอกซินพี 1 และอะฟลาทอกซินคิว 1 เรืองแสงให้สีเหลือง เป็นต้น

2.1.2 คุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติละลายได้เล็กน้อยในน้ำและสารตัวทำละลายพวกมีขั้วละลายได้ดีในตัวทำละลายเคมีอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซีน แอซีโตน เอทานอล และเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน อีเทอร์ และปิโตรเลียมอีเทอร์ มีความทนทานต่อความร้อนสูงถึง 250 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สารพิษสลายตัวได้ อะฟลาทอกซินจึงไม่ถูกทำลายหรือเสื่อมสลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 250 องศาเซลเซียส ดังนั้นความร้อนจากกระบวนการหุงต้มทั่วไป เช่น ต้ม อบ หรือหนึ่ง จึงไม่สามารถทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้

มีสารเคมีบางชนิดสามารถลดความเป็นพิษหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้บ้าง เช่น แอมโมเนีย ด่างแก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น เพราะวงแหวนแลคตอนของอะฟลาทอกซินจะแยกออกจากกันในสภาวะต่าง และสามารถกลับสู่โครงสร้างเดิมได้ในสภาวะกรดหรือกลาง ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สภาวะทางฟิสิกส์หรือทางเคมีอย่างใดอย่างหนึ่งทำลายพิษของอะฟลาทอกซินให้หมดลงได้ แต่อย่างไรก็ตาม อะฟลาทอกซินเสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมมา ดังนั้นการศึกษาเพื่อลดหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินให้หมดไป จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

2.1.3 การแพร่กระจายของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเกิดขึ้นตามธรรมชาติและแพร่กระจายในผลิตภัณฑ์ทางเกษตรกรรม เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง ปลาป่น กระดุกป่น เป็นต้น การแพร่กระจายได้ดีขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ภายใต้ความชื้นสูง 18-30 เปอร์เซ็นต์และอุณหภูมิสูง 75-95 องศาฟาเรนไฮต์ ประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น จึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของสารพิษนี้ได้ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ทางเกษตรกรรมซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบนำมาประกอบเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินผ่านมาทางอาหารและเข้าสู่ร่างกาย สารพิษสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์หลายชนิด โดยบั่นทอนสุขภาพและผลผลิต ทำลายระบบการทำงานของร่างกายให้เสื่อมโทรมลง ซึ่งในระยะแรกๆ ของการเกิดพิษโดยส่วนใหญ่แสดงอาการเบื่ออาหาร อัตราการเจริญเติบโตลดลง สภาวะทรุดโทรม ความต้านทานโรคลดลง ระยะต่อมาแสดงอาการตัวซีดเหลือง เหงื่อซา โดยเฉพาะในสัตว์มักพบอัตราการเปลี่ยนเนื้อลดลง อัตราการผสมติดลดลง ผลผลิตไข่ลดลง นำนมลดลง ตัวซีดเหลืองและมีจุดเลือดออก ลำไส้อักเสบ มีจุดเลือดออกและตายในที่สุด

2.1.4 การออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินออกฤทธิ์ทำลายตับซึ่งจัดเป็นอวัยวะเป้าหมาย สามารถทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และเรื้อรังได้ ทั้งในคนและสัตว์โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจ ทำให้เกิดโรคตับอักเสบ ตับแข็ง ดีซ่าน และมะเร็งตับ ซึ่งในคนยังพบว่าทำให้เกิดโรคกลุ่มอาการไรย์ (Reye's syndrome) มักพบมีอาการทางสมองในเด็กอายุระหว่าง 1-7 ปี โดยส่วนใหญ่พบเด็กป่วยมากในฤดูฝน

ในปี ค.ศ. 1960 (พ.ศ. 2503) และปี ค.ศ. 1961 (พ.ศ. 2504) ที่ประเทศอังกฤษ ได้เกิดโรคจากสารพิษนี้เป็นครั้งแรกในไก่งวง เป็ด ไก่ ที่กินอาหารจำพวกถั่วซึ่งมีเชื้อราปนเปื้อนอยู่ ทำให้สัตว์ตายเป็นจำนวนมากและพบรอยโรคเนื้อตายที่ตับ หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1978 (พ.ศ. 2521) ได้มีการทดลองศึกษาในหนูแรท พบรอยโรคของมะเร็งตับขั้นรุนแรง

อะฟลาทอกซินบี 1 มีพิษรุนแรงมากกว่าอะฟลาทอกซินชนิดอื่นๆ อาการแสดงในสัตว์ทั่วไปที่พบได้ คือ ตับอักเสบอย่างเฉียบพลัน โดยพบรอยโรคเซลล์เนื้อเยื่อแท้ของตับ (parenchyma cell) ถูกทำลาย นิวเคลียสขยายใหญ่ และเซลล์บุท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งผู้เขียนและคณะได้ทำการวิจัยในเป็ด ไก่ และนกกระทา แสดงผลรอยโรคของตับถูกทำลายอย่างเด่นชัด โดยพบเซลล์ตับตายและมีไขมันเข้าแทรก และพบเซลล์บุท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ ทำให้เกิดรอยโรคมะเร็งตับพบได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น เป็ด ไก่ หนูแรท เป็นต้น รวมทั้งพบได้ในคนด้วย ซึ่งมีการศึกษาทางระบาดวิทยาจากหลายพื้นที่ในประเทศแถบยุโรป สหรัฐอเมริกา แอฟริกาและเอเชีย พบสาเหตุเกิดจากการกินอาหารปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซิน

การเกิดพิษจากอะฟลาทอกซิน ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร และระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ เพศ อายุ และชนิดสัตว์ ซึ่งสัตว์แต่ละชนิดมีความไวต่อการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินแตกต่างกัน สัตว์ปีกมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าในสุกรและโค กระบือ สัตว์อายุน้อยมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัยแล้ว เช่น กระต่ายและลูกเป็ด มีความไวต่อการเกิดพิษแบบเฉียบพลันมากกว่าหนูถีบจักรและแฮมสเตอร์ หนูแรทและเป็ดมีความไวต่อการเกิดมะเร็งมากกว่าหนูถีบจักรและแฮมสเตอร์ หนูแรทและเป็ดมีความไวต่อการเกิดมะเร็งมากกว่าหนูถีบจักรและแฮมสเตอร์

การวิจัยเช่นเดียวกันและพบว่า จากการศึกษาเปรียบเทียบความไวต่อการเกิดพิษในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ ลูกเป็ดมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าเป็ด ไก่ นกกระทา แฮมสเตอร์ และหนูแรท แฮมสเตอร์มีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าหนูแรท ลูกเป็ดมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าหนูแรท 2 เท่า ลูกเป็ดจึงจัดว่ามีความไวต่อการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินมากที่สุด (อมรา, 2546)

มีการศึกษาในสัตว์หลายชนิดว่า การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพ ของสารพิษที่ตับ มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงปฏิกิริยาทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1 โดยใช้

เอนไซม์ไมโครโซมอลพี-450 ในตับ ทำให้อะฟลาทอกซินบี 1 เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเป็นอะฟลาทอกซินบี 1 8,9-อีพอกไซด์ซึ่งไม่คงตัว สามารถมีพันธะโคเวเลนต์จับกับเซลล์โมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ดีเอ็นเอ (กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก) อาร์เอ็นเอ (กรดไรโบนิวคลีอิก) และโปรตีน ได้เป็นอะฟลาทอกซินบี 1 จับกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงจนเกิดพิษรุนแรงมากขึ้นและเป็นเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้อะฟลาทอกซินบี 1-8,9-อีพอกไซด์สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นอะฟลาทอกซินบี 1-8,9-ไดไฮโดรไดออกอลหรือจับกับโปรตีนหรือจับคู่กับกลูตาไทโอน อะฟลาทอกซินบี 1 สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเมแทบอลิท์ชนิดอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์ไมโครโซมอลพี-450 ในตับ และจับกับโปรตีน เช่นอะฟลาทอกซินบี 2 เอ หรือจับคู่กับกลูคิวโรไนด์ เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม 1-พี 1 เป็นต้น และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเป็นอะฟลาทอกซิคอล โดยใช้เอนไซม์โทซอลรีดักเทสในตับ รวมทั้งอะฟลาทอกซินเมแทบอลิท์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทุกยภูมิได้เป็นอะฟลาทอกซินเอ็น 1-พี 1 อะฟลาทอกซิคอล-เอ็ม 1 อะฟลาทอกซิคิล-เอช 1 เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เป็นขั้นตอนลดความรุนแรงของอะฟลาทอกซินบี 1 เพราะการเกิดพิษและการเกิดมะเร็งของอะฟลาทอกซินเมแทบอลิท์เหล่านี้มีความรุนแรงน้อยกว่าอะฟลาทอกซินบี 1

ในทางปศุสัตว์ อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และนำไปเลี้ยง เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียเศรษฐกิจด้านการเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น ผลผลิตเนื้อ นม ไข่ ลดลง คุณภาพไขลดลง ขนาดไขลดลง เปลือกไขบางลง การฟักไขลดลง นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินสามารถผ่านไปตามกระแสโลหิต เกิดการสะสมหรือตกค้างในเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ และผ่านไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น เนื้อ นำนม ไข่ เป็นต้น ทำให้เกิดความเสียงอันตรายต่อผู้บริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์ จากการวิจัยแสดงผลตรวจพบการตกค้างของอะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินเมแทบอลิท์ได้ในกล้ามเนื้อ ตับ และไข่ ของสัตว์ปีกหลายชนิด ซึ่งจัดว่ามีความเสียงอันตรายต่อผู้บริโภคอาหารที่มาจากสัตว์ได้เช่นกัน

2.1.5 ปัญหาและความสำคัญของอะฟลาทอกซิน

เนื่องจากไม่มีวิธีลดพิษหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้หมดสิ้นอย่างสมบูรณ์ ทั้งในวัตถุดิบที่ได้จากผลิตผลทางเกษตรกรรม อาหารสัตว์และอาหารคน ดังนั้นการป้องกันเพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายจากการปนเปื้อนของสารพิษนี้จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง โดยมีมาตรการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินอย่างรัดกุมและเข้มงวด ซึ่งมีมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก ได้กำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีปนเปื้อนสูงสุดในอาหารสัตว์และอาหารคน แต่ยังมีอีกหลายประเทศในทวีปแอฟริกาและทวีปเอเชีย ที่มีปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในปริมาณสูง และไม่มีมาตรการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ซึ่งการกำหนดมาตรการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอก

จีน ต้องพิจารณาร่วมกับความรู้หรืองานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ พื้นฐานสังคมและเศรษฐกิจของแต่ละประเทศ จึงทำให้การกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีปนเปื้อนได้ในอาหารสัตว์และอาหารคนในหลายประเทศ มีปริมาณอยู่ในช่วงกว้างมาก เช่น กำหนดให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารสัตว์ปีก อยู่ในช่วง 20 ถึง 100 พีพีบี (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ส่วนในอาหารคน กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนได้ในช่วง ตรวจไม่พบถึง 30 พีพีบี และอะฟลาทอกซินรวมของชนิดบี 1 จี 1 และจี 2 ปนเปื้อนได้ในช่วง ตรวจไม่พบถึง 50 พีพีบี เป็นต้น

เพื่อการคุ้มครองสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภคและเกิดความเป็นธรรมในทางการค้าระหว่างประเทศภายใต้ความตกลงขององค์การค้าโลก ดับบลิว ที โอ (WTO, World Trade Organization) จึงมีคณะกรรมการการโครงการมาตรฐานอาหารโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Commission, CAC) ขององค์การอาหารและเกษตรกรรมแห่งสหประชาชาติ เอฟ เอ โอ (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) และองค์การอนามัยโลก ดับบลิว เอช โอ (WHO, World Health Organization) ซึ่งคณะกรรมการโครงการมาตรฐานอาหารโคเด็กซ์ ทำหน้าที่กำหนดมาตรฐานอาหารให้เป็นมาตรฐานสากลร่วมกับคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญ เอฟ เอ โอ และดับบลิว เอช โอ สาขาสารเสริมเติมและปนเปื้อนในอาหาร หรือเรียกว่าเจ็กฟา (JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants) ได้ร่วมกันพิจารณากำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีปนเปื้อนได้สูงสุดในอาหารโดยไม่ก่อให้เกิดพิษ ซึ่งสมาชิกโคเด็กซ์เป็นภาครัฐบาลของประเทศต่างๆ และในปัจจุบันโคเด็กซ์มีสมาชิก 165 ประเทศ รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งคณะกรรมการโครงการมาตรฐานอาหารโคเด็กซ์ได้กำหนดระดับอะฟลาทอกซินรวม คือ อะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 จี 1 ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้ 15 พีพีบี (ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ส่วนระดับอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ที่ปนเปื้อนในน้ำมัน ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรปเสนอให้อยู่ในระดับ 0.05 พีพีบี (ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 ลิตร) และองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA, United States Food and Drug Administration) เสนอให้อยู่ในระดับ 0.5 พีพีบี และที่ประชุมมีมติให้ใช้ระดับ 0.5 พีพีบี

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางเกษตรกรรม อาหารสัตว์และอาหารคน มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการสูญเสียเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมด้านการเกษตรและการเลี้ยงสัตว์ และยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงอันตรายต่อผู้บริโภคอาหารที่มาจากสัตว์ และผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากสัตว์ที่กินอาหารสัตว์ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน เนื่องจากสภาพแวดล้อมในประเทศไทย ซึ่งเป็นแบบร้อนชื้นนั้น เหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญเกี่ยวกับมาตรการป้องกัน ควบคุม และกำหนดกฎเกณฑ์ที่จะสัมฤทธิ์ผลต่อการหลีกเลี่ยงการสูญเสียเศรษฐกิจ และลดอัตราความเสี่ยงอันตรายที่เกิดขึ้นต่อผู้บริโภค ข้อมูลเกี่ยวกับอันตรายของอะฟลาทอกซิน การตกค้างของสารพิษในเนื้อเยื่ออวัยวะและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น

เนื้อ นม ไข่ ข้อมูลระบบวิทยาและผลการศึกษาทางพิษวิทยาที่เกิดขึ้นในคนและสัตว์ รวมทั้งความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเพื่อการสร้างและสลายของสารพิษ หรือการเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นที่ตับ การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะฟลาทอกซินในร่างกายหรือ การเกิดพิษและการออกฤทธิ์ของสารพิษ การตรวจวินิจฉัย การทดสอบและการบำบัดรักษา อาการเป็นพิษจากโรคอะฟลาทอกซิโคซิส จึงมีความสำคัญและจำเป็นต้องศึกษาอย่างยิ่ง เพื่อ ประโยชน์ในการแก้ไขและกำจัดปัญหาที่เกิดจากอะฟลาทอกซินให้หมดไปได้ สารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของเชื้อราแอสเพอร์ จิลลัสฟลาวัสและแอสเพอร์จิลลัสพาราซิติกัส ซึ่งมักพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์ทาง เกษตรกรรม ที่นำมาทำเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง ข้าวฟ่าง ปลาป่น กระดุกป่น เป็นต้น อะฟลาทอกซินสามารถแพร่กระจายได้ดี ในสภาวะแวดล้อมและภูมิอากาศ แบบร้อนชื้น มีคุณสมบัติละลายได้ดีในตัวทำละลายเคมีอินทรีย์ มีความทนทานต่อความร้อนสูง ถึง 250 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้สารพิษสลายตัวได้ ความร้อนจากกระบวนการ หุงต้มทั่วไป จึงไม่สามารถทำลายสารพิษได้

คนและสัตว์ที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหาร สารพิษออกฤทธิ์บั่นทอน และทำลายสุขภาพ ทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และเรื้อรัง จนถึง ขั้นก่อเกิดมะเร็งและตายในที่สุด ซึ่งมีอันตรายรุนแรงแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความไวต่อการเกิด พิษของคนและสัตว์ชนิดต่างๆ ไม่เท่ากัน รวมทั้งขึ้นอยู่กับการเมแทบอลิซึมของสารพิษในตับ นอกจากนี้ ปัญหาสุขภาพส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านผลผลิตทางการเกษตร อุตสาหกรรม และการเลี้ยงสัตว์ ดังนั้น สารพิษอะฟลาทอกซินจึงมีความสำคัญและจำเป็นต้อง ช่วยกันแก้ไข

2.1.6 ผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยและความเสี่ยงอันตรายของผู้บริโภค

มีรายงานการศึกษาจากนักวิจัยรวมทั้งผู้เขียนและคณะ พบว่าอะฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และปี 2 และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ปี 2 จี 1 และจี 2 กลุ่มเชื้อราเหล่านี้สร้าง สปอร์ได้มักพบปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง ปลาป่น กระดุกป่น เป็นต้น เชื้อราสามารถทำลายคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร เช่น ไขมัน กรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ รวมทั้งกลิ่น สีและรส ทำให้ลดความน่า รับประทานลงด้วย นอกจากนี้สปอร์ที่สูดดมเข้าไปก่ออันตรายได้เช่นกัน อะฟลาทอกซินปี 1 เป็นชนิดที่มีพิษร้ายแรงมากกว่าชนิดอื่นๆ ซึ่งองค์การอนามัยได้เช่นกัน อะฟลาทอกซินอยู่ใน ระดับก่อเกิดพิษรุนแรงที่สุด และก่อให้เกิดอันตรายต่อคนและสัตว์ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง จนถึงขั้นเป็นมะเร็งตับได้

เมื่อคนและสัตว์ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่ สารพิษจะเข้าทำอันตรายต่อสุขภาพและผลผลิต ทำให้ระบบการทำงานของอวัยวะในร่างกายเสื่อมโทรมลง กดภาวะภูมิคุ้มกันโรค ทำให้ต้านทานโรคได้ลดลง บั่นทอนสุขภาพโดยรวม เช่น เจริญเติบโตได้ช้า น้ำหนักลด เชื่องซึมหงอยเหงา ผสมติดยาก ให้ผลผลิตของเนื้อ นม ไข่ลดลง เป็นต้น ความรุนแรงของอาการและรอยโรคที่พบในคนและสัตว์ชนิดต่างๆ จะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณ ความเข้มข้นของสารพิษที่ได้รับ ระยะเวลา ชนิดของสัตว์ อายุ พันธุ์ เพศ รวมทั้งสภาวะทางโภชนาการในอาหาร เช่น โปรตีน วิตามิน เป็นต้น

ในระยะแรกๆ ของการได้รับสารพิษ โดยส่วนใหญ่แสดงอาการซึม เบื่ออาหาร อัตราการเจริญเติบโตลดลง สูญเสียสภาวะปกติต่างๆ ของร่างกาย รวมทั้งผลผลิตด้านเนื้อ นม ไข่ลดลง ต่อมาแสดงอาการตัวซีดเหลือง ดีซ่าน สุขภาพทรุดโทรมลง และมีจุดเลือดออก ถ้าใส่อีกเสบและมีจุดเลือดออก อันตรายที่พบชนิดเฉียบพลัน เช่น ตับอักเสบร่วมกับเซลล์เนื้อเยื่อแท้ของตับถูกทำลาย และปริมาณเซลล์บุท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนขึ้นมากอย่างรวดเร็วผิดปกติ มีไขมันเข้าแทรกในเซลล์ตับ และทำให้เกิดมะเร็งตับเป็นอันตรายถึงตายในที่สุด

ในระหว่างที่แสดงอาการและรอยโรคอะฟลาทอกซินโคซิส สารพิษที่ผ่านเข้าสู่ร่างกายไปตามกระแสโลหิตทำอันตรายต่ออวัยวะระบบการทำงานของร่างกาย สารพิษบางส่วนสามารถขับออกจากร่างกาย สารพิษบางส่วนสามารถขับออกจากร่างกายในรูปของเสีย เช่น ปัสสาวะ อุจจาระ เหงื่อ น้ำลาย หรือในรูปผลิตภัณฑ์ เช่น นำนม ไข่ เลือด นอกจากนี้ สารพิษบางส่วนสามารถตกค้างหรือสะสมในอวัยวะเนื้อเยื่อซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น ตับ ไต กล้ามเนื้อ เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้ สามารถก่อปัญหาในวงจรห่วงโซ่อาหารของคน สัตว์และพืชได้ ทำให้เกิดความเสียหายต่ออันตรายต่อการบริโภคอาหารที่มาจากสิ่งปนเปื้อนสารพิษ ทั้งผู้บริโภค คน และสัตว์ จึงไม่ปลอดภัยและมีอันตรายถึงขั้นเสียชีวิตได้ในที่สุด

คนและสัตว์ชนิดต่างๆ มีความไวต่อการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินแตกต่างกัน โดยพิจารณาจากค่าแอลดี 50 เช่น สัตว์น้ำและสัตว์ปีกมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าสุกร โค กระบือ แพะ แกะ สัตว์อายุมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัยแล้ว คนจัดว่ามีความไวต่อการเกิดพิษน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลอง จึงมักเกิดเป็นมะเร็งตับในสภาวะโรคเรื้อรัง แต่มีอันตรายถึงตายได้ ในสภาวะโรคเฉียบพลันเช่นเดียวกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสารพิษเป็นสำคัญ นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเพื่อสร้างและสลายของสารพิษ หรือการเมแทบอลิซึม และการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารพิษในร่างกายหรือการจลศาสตร์ มีผลทำให้การเกิดเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ ร่างกายจึงมีการตอบสนองต่อสารพิษรุนแรงแตกต่างกัน ดังนั้น อะฟลาทอกซินจัดเป็นสารพิษจากเชื้อราที่สามารถทำอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภคได้อย่างน่ากลัวยิ่ง จึงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุข ที่ต้องติดตามเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาการใช้สารลดพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งให้ผลดีและสามารถแก้ไขปัญหที่เกิดขึ้นจากโรคอะฟลาทอกซินโคซิสได้พอสมควร

2.1.7 ผลกระทบต่อสถานะเศรษฐกิจและการค้าระหว่างประเทศ

ประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตผลทางเกษตรกรรม ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบนำมาประกอบเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ อะฟลาทอกซินที่ทำอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภคและก่อปัญหาในวงจรห่วงโซ่อาหาร เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียทั้งคุณภาพและปริมาณของผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืชและสัตว์ อาหารที่มีโภชนาการเสื่อมสภาพ ผลผลิตลดต่ำลง มีผลทำให้เศรษฐกิจด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการเลี้ยงสัตว์เสียหาย ส่งผลให้พาณิชยกรรม หรือการค้าขาย ผลิตภัณฑ์ ลดต่ำลงด้วย นอกจากนี้สุขภาพที่เสื่อมโทรม ถดถอยย่อมให้ผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพและเกิดการตายได้ เช่น ไก่ที่เจ็บป่วยจากการกินอาหารปนเปื้อนสารพิษ ให้น้ำนมลดลงและมีอะฟลาทอกซินชนิดเอ็ม 1 ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งมีอันตรายต่อผู้บริโภค น้ำนม ก่อเกิดโรคมะเร็งตับได้ ในทำนองเดียวกัน ไก่ที่เจ็บป่วยให้ไข่ลดลง และมีอะฟลาทอกซินชนิดบี 1 และเมแทบอลิท์อื่นๆ ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งมีอันตรายต่อผู้บริโภคไข่ไก่และเนื้อเยื่ออวัยวะของไก่ ก่อเกิดโรคมะเร็งตับได้ เป็นต้น สัตว์ที่เจ็บป่วยมีอันตรายรุนแรงถึงขั้นตายได้ในคราวเดียวกันด้วยจำนวนสัตว์มาก เพราะกินอาหารปนเปื้อนสารพิษร่วมกันทำให้ต้นทุนการผลิตจึงสูงกว่าปกติ ดังนั้น ความสูญเสียทางเศรษฐกิจจึงมีความเกี่ยวข้องกันอย่างกว้างขวางทั้งทางตรงและทางอ้อม ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาสัตว์ป่วย การสูญเสียสัตว์ตาย ค่าใช้จ่ายในการผลิตสัตว์ด้านอาหาร และการบำรุงอาการเสริมต่างๆ รวมทั้งการทดสอบสุขภาพ เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ยั่งยืนด้านเกษตรกรรมทั้งพืชและสัตว์ไปขายยังต่างประเทศ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ด้านการเกษตร การปศุสัตว์ และสัตว์น้ำ สามารถครองตลาดโลกในอันดับต้นๆ เช่น ข้าว ไข่ กุ้ง เป็นต้น รายได้ส่วนใหญ่ได้จากผลิตภัณฑ์เหล่านี้ จึงเสริมสร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจของชาติได้เป็นอย่างดี แต่ในทางกลับกัน หากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเกษตรกรรมและการเลี้ยงสัตว์ลดลงทั้งคุณภาพและปริมาณ รวมทั้งประเทศผู้ค้าในตลาดโลกปัจจุบันมีการแข่งขันขึ้นเป็นลำดับ โดยมีมาตรการกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีปนเปื้อนสูงสุดในอาหารคนและสัตว์ จากการพิจารณางานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ พื้นฐานสังคมและเศรษฐกิจของแต่ละประเทศ เพื่อการคุ้มครองสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภคในแต่ละประเทศเป็นสำคัญ รวมทั้งเกิดความเป็นธรรมในการค้าระหว่างประเทศ เช่น อะฟลาทอกซินบี 1 ปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 20 พีพีบี อะฟลาทอกซินรวม คือ อะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 จี 1 ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้ไม่เกิน 15 พีพีบี หรืออะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ปนเปื้อนในน้ำนมได้ไม่เกิน 0.5 พีพีบี เป็นต้น ดังนั้น อะฟลาทอกซินจึงมีผลต่อสถานะและความมั่นคงทางเศรษฐกิจและการค้าระหว่างประเทศเป็นอย่างยิ่ง ควรต้องติดตาม ควบคุม

ป้องกัน แก้ไขและปรับปรุงไม่ให้เกิดปัญหาผลผลิตมีคุณภาพเสื่อม ไม่ได้มาตรฐานและผลผลิตไม่เพียงพอต่อการบริโภคในประเทศ และส่งขายไปยังต่างประเทศด้วย

2.1.8 ผลกระทบต่อสภาวะสังคมและคุณภาพชีวิต

อะฟลาทอกซิน ทำอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค มีผลต่อการสาธารณสุขโดยตรงและทำให้สูญเสียเศรษฐกิจด้านเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และพาณิชย์กรรมของผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งส่งผลให้เกิดความสูญเสียต่อสมรรถภาพในการทำงานและการดำเนินชีวิต สูญเสียความสมบูรณ์ในสถาบันครอบครัวที่อยู่ในสภาวะสังคมโดยรวมรวมทั้งบั่นทอนขวัญและกำลังใจในการเสริมสร้างและพัฒนาคุณภาพชีวิตของตนเองและผู้อื่นในภาพรวมด้วย

สุขภาพที่เสื่อมโทรมเจ็บป่วยจากการได้รับอะฟลาทอกซินปนเปื้อน ทำให้ไม่สามารถปฏิบัติงานให้มีคุณภาพดีเหมือนเดิมได้ ถ้าการเจ็บป่วยรุนแรงจนถึงขั้นเกิดเป็นมะเร็งในอวัยวะสำคัญ เช่น ตับ ไต เป็นต้น ยิ่งทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานและดำเนินชีวิตถดถอยลงเป็นลำดับ บั่นทอนขวัญและกำลังใจในการพัฒนากิจการงานให้เจริญก้าวหน้าเพราะไม่สามารถทุ่มเทเวลาทั้งหมดให้กับการดำเนินงานได้เต็มที่ ถ้าการเจ็บป่วยเป็นแบบเฉียบพลัน อาจเกิดอันตรายถึงตายได้ หรือถ้าการเจ็บแบบเรื้อรัง บั่นทอนสุขภาพและผลิตจนวนไม่สามารถดำเนินงานต่อไปได้ ทำให้สูญเสียรายได้แก่สถาบันครอบครัว

การสูญเสียความสมบูรณ์ในสถาบันครอบครัว ส่งผลให้สมาชิกในครอบครัวขาดความมั่นคง ทั้งคุณภาพชีวิตและเศรษฐกิจในสังคม รวมทั้งบั่นทอนสภาวะจิตใจและก่อปัญหาสภาวะสังคมตามมาได้เป็นลำดับ ดังนั้นอันตรายจากอะฟลาทอกซินจึงมีอิทธิพลและมีความสำคัญยิ่งต่อคุณภาพชีวิตและสังคมโดยรวม อันตรายจากอะฟลาทอกซิน มีผลร้ายต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภคทั้งคนและสัตว์ สร้างความไม่มั่นคงของสภาวะเศรษฐกิจและสภาวะสังคม รวมทั้งทำให้คุณภาพชีวิตถดถอย

2.1.9 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร

ปัจจุบันการบริโภคผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสมุนไพร กำลังอยู่ในกระแสดความนิยมของประชาชน ทำให้เกิดการแปรรูปสมุนไพรให้อยู่ในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งได้รับการสนับสนุนและส่งเสริมจากทางภาครัฐและภาคเอกชน จึงมีกลุ่มแม่บ้านสนใจมาทำอาชีพเสริมโดยการนำพืชสมุนไพรมาแปรรูปเป็นรูปแบบต่าง ๆ เพื่อความสะดวกในการบริโภค เช่น แบบผงชงละลายน้ำร้อน ถูชงแบบชา หรือแคปซูล ซึ่งผลิตภัณฑ์สมุนไพรดังกล่าวที่จำหน่ายอยู่ทั่วไปยังด้อยคุณภาพในการผลิตและการแปรรูป ซึ่งโดยทั่วไปในกระบวนการและแปรรูปวัตถุดิบ ไม่ว่าจะเป็นอาหารหรือยาที่มีมาตรฐานกำหนดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เพื่อให้ได้คุณภาพและ

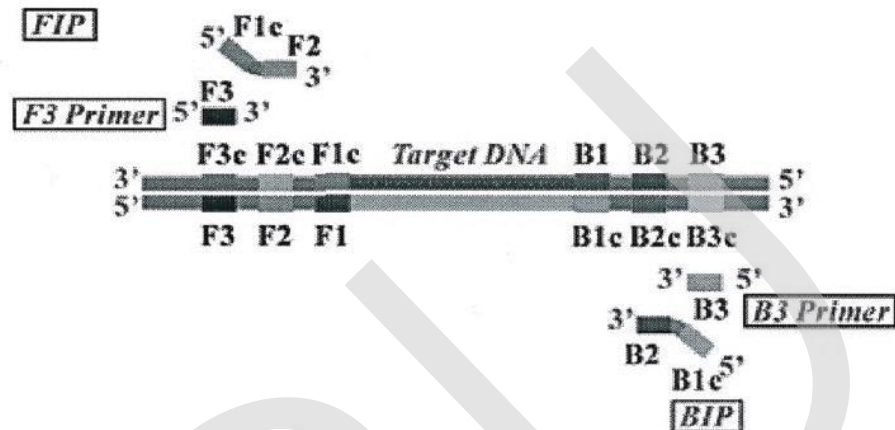
ปลอดภัยอย่างแท้จริง โดยมีหลักเกณฑ์ให้ผู้ผลิตใช้เป็นแนวทางการพัฒนาคุณภาพและมาตรฐานการผลิตโดยเน้นเรื่องการปนเปื้อนในอาหารและยา ซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นหนึ่งในสามของสาเหตุการปนเปื้อนโดยเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ และจุลินทรีย์สำคัญชนิดหนึ่งที่พบการปนเปื้อนบ่อยก็คือ เชื้อราชนิด *Aspergillus* spp. และมีงานวิจัยที่นำผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดมาตรวจสอบพบว่าการปนเปื้อนของรากลุ่ม *Aspergillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น ขิง ขมิ้นชัน ชุมเห็ดเทศ กระเจี๊ยบแดง มะตูม แก้วฮวย ส้มแขก เป็นต้น

2.2 การตรวจวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ปราศจากสี กลิ่น และรส การที่จะทราบว่าผลิตผลทางการเกษตรมีการปนเปื้อนของสารพิษมากน้อยเพียงใดต้องทำการตรวจวิเคราะห์เท่านั้น วิธีการวิเคราะห์ในปัจจุบันที่รวดเร็ว และนิยมใช้กันมาก คือการวิเคราะห์ทางด้าน Immunological Assay โดยการใช้วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยสารอะฟลาทอกซินจะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างที่บดละเอียดด้วยสารละลายเมทานอล แอฟลาทอกซินในสารสกัดที่กรองได้จะถูกเรียกว่า สารพิษอิสระ จะถูกนำไปแข่งขันกับสารอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ซีบอก ในการที่จะไปเกาะจับกับแอนติบอดีที่ถูกเคลือบไว้ที่ก้นหลุมทดสอบหลังจากบ่มไว้ 30 นาที ส่วนสารพิษที่ผูกติดกับเอนไซม์ซีบอกที่เกาะจับกับแอนติบอดีในหลุมทดสอบ สามารถประเมินได้โดยการเติม substrate ที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ซีบอกเกิดเป็นสี ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากผลของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate สามารถอ่านได้ด้วยสายตาเปรียบเทียบกับสีที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบของสารพิษมาตรฐานระดับต่าง ๆ หลุมทดสอบของสารพิษอิสระน้อยจะเกิดสีเข้ม ถ้ามีสารพิษมากจะเกิดสีจางตามลำดับ หากแต่ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมซึ่งมีขั้นตอน 2 ส่วน คือ การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อแสดงผล พบว่าดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจมีระดับต่ำมาก และอาศัยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน 2-3 ระดับ (Degola *et al.*, 2007) การตรวจวิเคราะห์และการประยุกต์ใช้ยังมีข้อจำกัดต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือที่มีราคาแพง จึงทำภาคสนามไม่ได้ จึงมีการพัฒนาการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP)

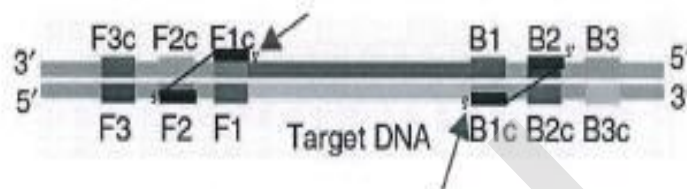
LAMP เป็นเทคนิคที่อาศัยการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียว ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาทีด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว ให้ความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิค Polymerase chain reaction และตรวจดูจากความขุ่นของปฏิกิริยา ทำให้การวิเคราะห์ทำได้ง่าย รวดเร็ว (Notomi *et al.*, 2000) เป็นไปตามหลักการ point of care test ช่วยให้การตรวจทำได้ทุกที่ ปฏิกิริยา LAMP อยู่บนพื้นฐานของหลักการ strand displacement synthesis โดยเอนไซม์ Bst DNA Polymerase และอาศัยไพรเมอร์ 2 คู่จำเพาะต่อ 6 บริเวณ ได้แก่ F3 F2 F1 B3 B2 B1 และบริเวณคู่สม F3c F2c F1c B3c B2c และ B1c ความหมายของ F คือ Forward

มี 3 บริเวณ ความหมายของ F1c-F3c คือสายคู่สม Complementary strand ของบริเวณ F1-3 และความหมายของ B คือ backward มี 3 บริเวณและเช่นเดียวกันก็มีบริเวณ B1c-B3c คือสายคู่สม complementary strand ของบริเวณ B1-3 ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 บริเวณของดีเอ็นเอแม่แบบที่สัมพันธ์กับไพรเมอร์ 6 บริเวณเทคนิค LAMP

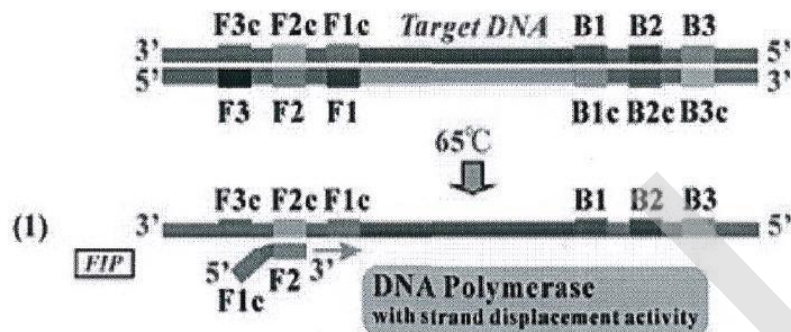
หากเขียนส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายสายบนจาก 3' ไป 5' จะมีบริเวณที่เกี่ยวข้องด้าน 3' F3c F2c และ F1c ซึ่ง complementary กับบริเวณ F3 F2 และ F1 ด้าน forward และที่ปลายด้าน 5' มี B1 B2 และ B3 ซึ่งก็จะมีปริมาณที่เป็น complementary เป็น B1c B2c และ B3c ด้าน backward ตามลำดับ ไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องคู่แรกได้แก่ คู่ไพรเมอร์ F3 และ B3 คู่ไพรเมอร์นี้ทำหน้าที่เสมือนไพรเมอร์ที่พบในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปกติ ส่วนคู่ไพรเมอร์อีกคู่หนึ่ง ได้แก่ FIP และ BIP หรือ forward inner primer และ backward inner primer ตามลำดับ ได้แก่ บริเวณ F1c และ F2 ซึ่งจะเป็นคู่สมกับบริเวณ F1 F2c B1c และ B2 ซึ่งจะเป็นคู่สมกับบริเวณ B1 และ B2c ตามลำดับ หากนำไพรเมอร์ FIP และ BIP มาเขียนร่วมกับ F3 และ B3 จะได้วัฏจักรของไพรเมอร์ในรูปแบบที่ไขว้ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านในจาก 5' ไป 3' และ 3' ไป 5' และมีไพรเมอร์ปกติวางตัวในบริเวณด้านนอกดังภาพที่



ภาพที่ 3 บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องและวงจรของไพรเมอร์ไขว้
ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้าง loop

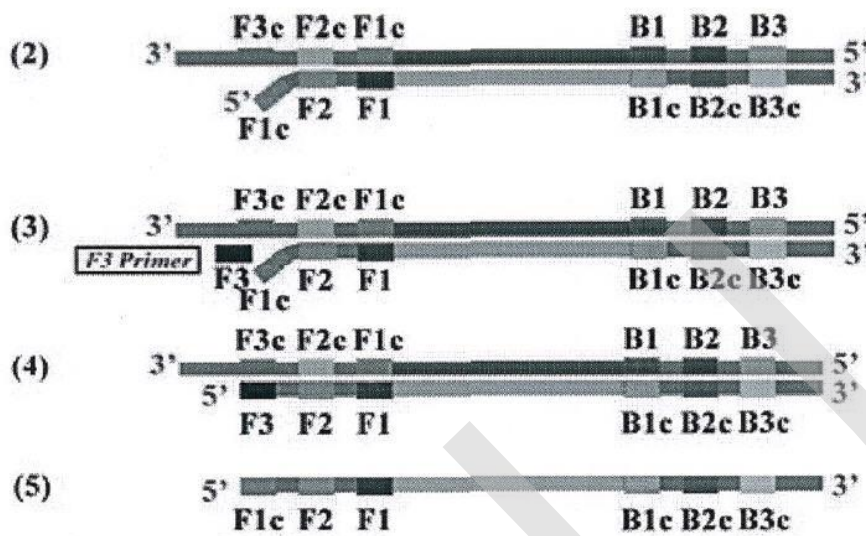
การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขั้นที่ 1 การสร้างโครงสร้างพื้นฐานเพื่อรองรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว ซึ่งกลไกการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาศัยแรงผลักดันในการสังเคราะห์จาก inner primer มากกว่าแรงผลักดันในการสังเคราะห์จาก outer primer เหมือนที่พบในปฏิกิริยา polymerase chain reaction ดังนั้นจึงพบว่าในปฏิกิริยาความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับคู่ FIP และ BIP จึงสูงกว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ F3 B3 อยู่ถึง 8-10 เท่า นอกจากนี้ เพื่อให้การสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ตัว เกิดอย่างสม่ำเสมออย่างที่ควรจะเป็น ตามอัตราที่อิสระต่างกันโดยการจับของ F2 และ B2 เกิดได้เร็วกว่า ดังนั้นดีเอ็นเอแม่แบบจำเป็นต้องรักษาเสถียรภาพโครงสร้างดีเอ็นเอให้อยู่ในรูปใกล้เคียงกันตลอดเวลา โดยจะต้องอยู่ในรูปเส้นตรงตลอดเวลาและต้องไม่ให้จับตัวเป็นเกลียว ซึ่งทำได้โดยใช้สารเคมีพวก helix destabilizing agent เช่น betaine (N,N,N trimethyl glycine) หรือ L-proline สารเหล่านี้จะช่วยลดแรงดึงในโครงสร้างส่วนที่เป็น base stacking ได้ดี

ที่อุณหภูมิเหมาะสมของเอนไซม์ Bst DNA Polymerase ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส จะเป็นจุดที่อุณหภูมิสูงพอที่จะทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอสายคู่เริ่มคลายตัว ไพรเมอร์ FIP และ BIP ซึ่งออกแบบให้ภายในโครงสร้างไพรเมอร์มีบริเวณ 5'F1c F3 3' และ 5'B1c B2 3' มีค่า melting temperature (Tm) ในบริเวณ F2 และ B2 ต่ำกว่า F1c และ B1c เพื่อกระตุ้นให้เกิดการจับตัวของบริเวณ F2 และ B2 กับดีเอ็นเอแม่แบบก่อน ดังนั้นหากพิจารณาเฉพาะปลายด้าน forward ด้านเดียวเสียก่อนจะพบว่า บริเวณ F2 ของไพรเมอร์ FIP (5'F1c F2 3') จะจับกับแม่แบบและเริ่มสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ดังภาพที่ 4

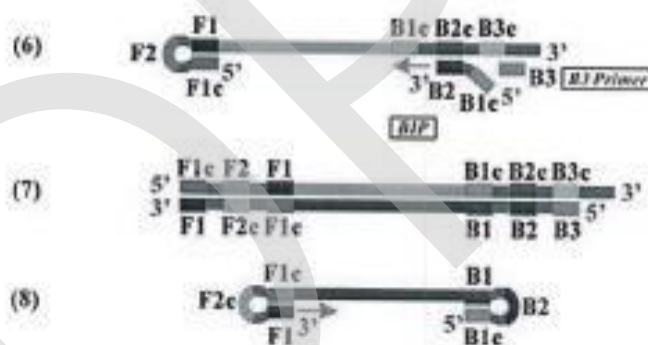


ภาพที่ 4 ขั้นตอนเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา LAMP

เมื่อสังเคราะห์เสร็จหรืออยู่ในระหว่างสังเคราะห์ก็ตาม ปลายสายดีเอ็นเอบริเวณเริ่มต้นจะมีบริเวณเหนือบริเวณ F2c (ซึ่งในที่นี้คือ F3c) เปิดอยู่ พร้อมทั้งจะให้ไพรเมอร์ F3 เข้ามาจับ ซึ่งเมื่อไพรเมอร์ F3 เข้ามาจับ พร้อมกันนั้นจะเกิดปฏิกิริยายืดสาย (extension) โดยในระหว่างที่ไพรเมอร์ F3 ต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวออกไปนั้น ก็จะมีการขจัดเอาสายดีเอ็นเอเดิมที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ FIP ให้หลุดออก สายดีเอ็นเอที่หลุดออกมีบริเวณจากปลาย 5' เป็น 5'F1c F2 F1 ไปเรื่อย ๆ จนสุดปลาย Backward ซึ่งในที่สุดบริเวณ F1c และ F1 จะจับตัวกันเป็นโครงสร้าง hair pin ดังภาพที่ 5 ทางด้านปลาย backward จะเกิดปฏิกิริยาทำนองเดียวกัน โดยอาศัยไพรเมอร์ BIP ซึ่งมีบริเวณ B1c B2 และไพรเมอร์ B3 การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอชิ้นใหม่จากไพรเมอร์ BIP และการขจัดสายโดยไพรเมอร์ B3 ก่อให้เกิดโครงสร้าง hair pin หรือ loop ในทำนองเดียวกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาปฏิกิริยาที่เสร็จสิ้น ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จะมีปลายทั้ง 2 ด้านเป็นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ปลายทั้งสองเป็น loop จนทำให้มองเห็นเป็นรูปดัมเบลล์ (dumb-bell) ดังภาพที่ 6 โครงสร้างดัมเบลล์ นี้เป็นโครงสร้างพื้นฐานและเป็นหัวใจสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพในขั้นถัดไป



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการจัดสายดีเอ็นเอในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้าน forward ช่วงแรก

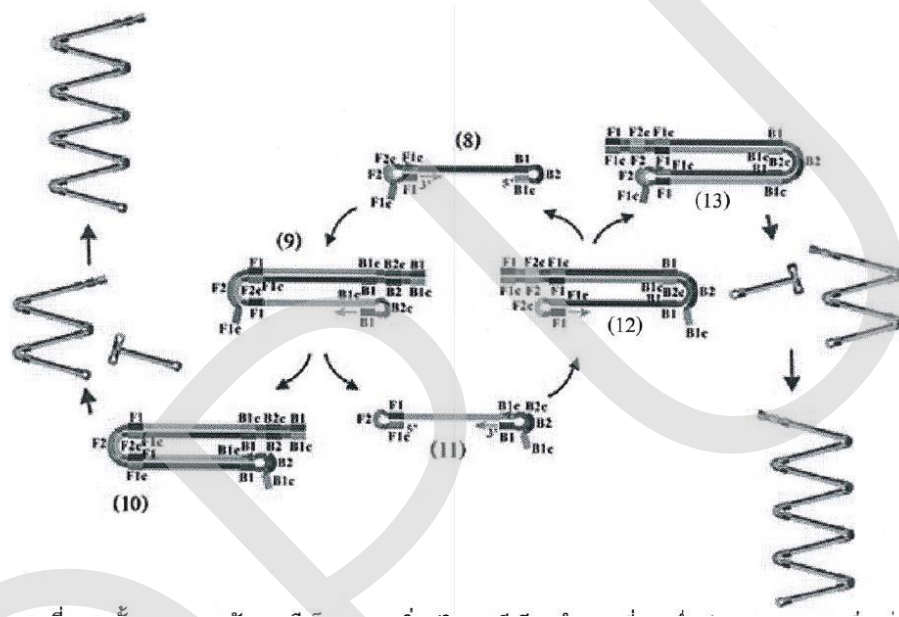


ภาพที่ 6 ขั้นตอนการจัดสายดีเอ็นเอในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้าน backward ในช่วงแรกเพื่อสร้างโครงสร้าง dumb-bell

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากโครงสร้างพื้นฐานใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณทวีคูณในขั้นที่ 2

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขั้นที่ 2 จะเป็นไปด้วยอัตราที่เร็วและต่อเนื่อง เริ่มจากโครงสร้างที่ได้จากขั้นที่ 1 ที่บริเวณ 3' ของ F1 ในโครงสร้าง dumb-bell ปลาย 3' จะเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จนสุดแม่แบบ ขณะเดียวกันที่บริเวณ F2c ซึ่งขณะนี้ เป็นโครงสร้าง single strand (บริเวณ loop) ทำให้ไพรเมอร์ FIP สามารถจับตัวและสังเคราะห์สายใหม่และบริเวณที่เหลือของไพรเมอร์ F1c สามารถจับตัวกับโครงสร้าง F1 ในสายในภายหลังดังภาพที่ 7 การสังเคราะห์สายโดยไพรเมอร์ FIP นี้ เกิดขึ้นจนสุดสายโครงสร้าง dumb-bell ทำนองเดียวกับปลาย B1 จะสามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ ได้ผลการสังเคราะห์สายที่ปลาย

B1 ทำให้เกิดโครงสร้างที่ 10 และสายที่ถูกขจัดจะขดตัวกลับมาเป็นโครงสร้าง 11 ได้ ที่โครงสร้าง 10 เมื่อไพรเมอร์ BIP มาเกาะในบริเวณ B2c ส่วน 3' ของ B2 จะเกิดการสังเคราะห์ขึ้นใหม่จนสุดและการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่นี้จะวนอ้อมทุกสายในโครงสร้าง 10 ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็นซิกแซก ยาวขึ้นได้เรื่อย ๆ ทำนองเดียวกัน โครงสร้าง 11 เมื่อพิจารณาต้าน backward ที่ปลาย 3' ของบริเวณ B1 ก็จะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เช่นกัน



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการจัดสายดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงที่สองซึ่งเป็นช่วงกระตุ้นเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบทวีคูณ

ดังนั้นในขั้นตอนการสังเคราะห์ในขั้นตอนที่ 2 จะพบการสังเคราะห์สายใหม่เกิดขึ้นกับโครงสร้าง 8 9 และ 11 โดยมีส่วนหนึ่งของปฏิกิริยาจะให้โครงสร้าง 8 และ 11 กลับคืนมาทุกครั้ง และการจับตัวของ BIP ไพรเมอร์ที่โครงสร้างที่ 10 ก็กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นต่อเนื่องโดยตลอด โดยให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอรูปซิกแซกขนาดต่าง ๆ กัน ส่วนหนึ่งของโครงสร้าง 11 สังเคราะห์เป็นโครงสร้าง 12 และเพิ่มปริมาณเป็นโครงสร้างที่ 13 ซึ่งเมื่อจับตัวกับ FIB ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างซิกแซกขนาดต่าง ๆ กัน ด้วยเหตุนี้เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจะได้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอซิกแซกขนาดต่าง ๆ กัน และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาตรวจสอบโดยการแยกภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยเจลอะกาโรส จะพบรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นขั้นบันไดอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 8

จากหลักการเพิ่มปริมาณที่กล่าวมาหากพิจารณาถึงองค์ประกอบปฏิกิริยาทางเคมีพบว่าปฏิกิริยาที่ใช้จะประกอบด้วยองค์ประกอบเป็นดังตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของปฏิกิริยาตามลำดับการดำเนินการในทางปฏิบัติ (อ้างอิงเงื่อนไขในการเพิ่มปริมาณไวรัส HBV)

สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช้
1. น้ำกลั่น	เติมให้ครบปริมาณเป้าหมาย
2. 10x buffer	1x
3. $MgSO_4$	2mM
4. dNTP	400uM
5. เบตาอิน	1 M
6. ไพโรเมอร์	
F3	5 pmole
B3	5 pmole
FIP	40 pmole
P1P	40 pmole
7. เอนไซม์ Bst DNA pol	8 U
8. DNA	ในทางทฤษฎีสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่ำถึงระดับ 6 copies จนถึงสูงมากถึง 10^8 copies ได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยปกติปริมาณดีเอ็นเอที่ใส่ในปฏิกิริยาไม่ต่างไปจากระดับปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR นั่นคือไม่น้อยกว่า 50 ng/ปฏิกิริยา

ในรายละเอียดพบว่าองค์ประกอบของปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วย

1. น้ำกลั่น เป็นองค์ประกอบหลักของตัวทำละลายที่รองรับระบบและใช้ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นตามต้องการ
2. 10x polymerase buffer บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ Bst DNA polymerase ซึ่งประกอบไปด้วย 20mM Tris-HCl (pH 8.8) 10 mM KCl 10mM $(NH_4)_2 SO_4$ 0.1% Triton X-100
3. $MgSO_4$ เป็นทั้ง co-factor ของเอนไซม์ Bst DNA polymerase และเป็นองค์ประกอบที่ทำปฏิกิริยากับไพโรฟอสเฟต (PPi) ทำให้เห็นเป็นตะกอนขุ่นหากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จในปริมาณมาก

4. dNTP ใช้เป็นหน่วยย่อยในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ใช้ dNTP ในรูปสารละลาย Tris เจือจางและใช้เป็นวัตถุดิบ (substrate) ในปฏิกิริยา polymerization เพื่อต่อสายดีเอ็นเอจนได้สายดีเอ็นเอสายใหม่
5. ปีตาอีน ช่วยในการสลายภาพของโครงสร้าง double helix เพื่อช่วยให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้สะดวกขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหา base stacking และเพิ่มโอกาสในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเพาะและลดการเพิ่มปริมาณบริเวณที่ไม่เกี่ยวข้องในกรณีที่ไม่มีอาจใช้ L-proline แทนได้
6. ไพร์เมอร์ F3 B3 ความเข้มข้นขั้นต่ำ 5 pmol (ประมาณ 3 ล้านล้านโมเลกุล) ไพร์เมอร์ FIP และ BIP ความเข้มข้นสูง 40 pmol (ประมาณ 240 ล้านล้านโมเลกุล)
7. เอนไซม์ที่แนะนำได้แก่ *Bst* DNA polymerase โดยปกติสามารถใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ strand displacement อื่นได้หลายชนิด แต่แนะนำให้ใช้เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase สามารถใช้ตัวอื่นแทนได้ แต่อาจให้ประสิทธิภาพที่ไม่เทียบเท่า ยกเว้นในกรณีทำให้ปฏิกิริยาร้อนขึ้นเสียก่อนด้วยกระบวนการ denaturation ที่อุณหภูมิสูงเพื่อช่วยให้โครงสร้างเป็นสายเดี่ยว
8. ดีเอ็นเอแม่แบบ ในทางอุดมคติบริเวณดีเอ็นเอเกือบทุกบริเวณสามารถใช้เป็นแม่แบบของปฏิกิริยาได้ แต่ก็พบว่าประสิทธิภาพของ LAMP ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอมาก เนื่องจากขั้นตอนส่วนใหญ่ของ LAMP ขึ้นกับ strand displacement ซึ่งเกิดขึ้นในอัตราเร็วที่ไม่สูงนัก *Notomi et al.*, (2000) พบว่า ขนาดของแม่แบบที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 130-200 นิวคลีโอไทด์ หากขนาดของดีเอ็นเอแม่แบบใหญ่มากถึง 500 นิวคลีโอไทด์ ปฏิกิริยายังคงเป็นไปได้แต่จะมีประสิทธิภาพต่ำมาก ขอแนะนำที่ดีสำหรับการออกแบบปฏิกิริยา ควรกำหนดขนาดดีเอ็นเอที่เหมาะสมให้ไม่มากไปกว่า 300 นิวคลีโอไทด์ซึ่งรวม F3 และ B3 และเนื่องจากความเฉพาะเจาะจงสูงมากของปฏิกิริยา จึงทำให้ LAMP สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่อาจมีการปนเปื้อนในปฏิกิริยาจึงไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ นอกจากนี้เนื่องจาก *Bst* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่มีเสถียรสูงจะทนต่อการปนเปื้อนทางโมเลกุลจากสารต่าง ๆ ได้ดีกว่า *Taq* DNA polymerase ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จึงทำให้สามารถใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายได้ก็กว่ากรณีเดียวกันที่ดำเนินการกับ PCR

สำหรับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา ในขั้นตอนการดำเนินการจะใช้เงื่อนไขดีเอ็นเอในด้านคุณภาพและปริมาณไม่ต่างไปจากที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR กล่าวคือ ดีเอ็นเอจะต้องบริสุทธิ์ และมีปริมาณไม่น้อยกว่า 10-50 นาโนกรัม ต่อปฏิกิริยา เพื่อจะเป็นหลักให้การเพิ่มปริมาณเกิดขึ้นโดยไม่มีอุปสรรค

Enomoto et al. (2005) , Kaneko et al. (2005) รายงานการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมด้วยวิธีอย่างง่ายจากของเหลวในร่างกายมาทำปฏิกิริยาได้สำเร็จ แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา LAMP ทนต่อการยับยั้งต่าง ๆ ได้ดีกว่า PCR ดังนั้นในหลายกรณี LAMP จึงสามารถทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการใช้วิธีสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและรวดเร็วได้ดีกว่า นอกจากนี้ปฏิกิริยา LAMP ยังสามารถใช้ RNA เป็นแม่แบบโดยทำปฏิกิริยาร่วม reverse transcription LAMP ภายในหลอดเดียวได้โดยตรง

โดยปกติในกรณีที่ต้องการเพิ่มปริมาณนิวคลีอิกโดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ (RT-LAMP) อาจเลือกใช้วิธีเป็น 2 ขั้นตอน โดยการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription เสียก่อนแล้วจึงทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามเนื่องจาก LAMP อยู่บนหลักการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในรูป strand displacement จึงทำให้สามารถทำปฏิกิริยา reverse transcription และ LAMP ไปพร้อมกันได้ขั้นตอนเดียว

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.1.1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.1.1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ UNIVERSAL รุ่น 32 R

3.1.1.3 gel document

3.1.1.4 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.1.5 ตู้บ่มเชื้อ

3.1.1.6 เครื่องแก้ว

3.1.1.7 เครื่องชั่ง

3.1.1.8 ไมโครเวฟ

3.1.1.9 Autopipette

3.1.1.10 micropipette tip พร้อมกล่อง

3.1.1.11 agarose gel

3.1.1.12 primer สำหรับเทคนิค LAMP

3.1.1.13 *Bst* DNA polymerase

3.1.1.14 ethanol

3.1.1.15 DOA – Aflatoxin ELISA test kit

3.1.1.16 MgSO_4

3.1.1.17 KCl

3.1.1.18 DNA binder

3.1.1.19 dNTP

3.1.1.20 clone test kit

3.1.1.21 Bataine

3.1.1.22 Ethanol

3.1.1.23 propanol

3.2 วิธีวิจัย

3.2.1 พัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

3.2.1.1 เก็บตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* จากห้องปฏิบัติการจำนวน 100 ตัวอย่าง

3.2.1.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่พบในเชื้อราทั้งสองชนิด

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนอะพลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ถูกออกแบบจากลำดับเบสในธนาคารยีน (genbank) ได้ทั้งหมด 4 ตัวดังนี้คือ

ALFA_RF3	5'-GCAACCTGATGACGACTGAT-3'
ALFA_RB3	5'-GCCACTGTTGGTTTCTCCAC-3'
ALFA_RFIP	5'-CAAGTAGCCATCCTGCGCGC-GGAACAAGAGGGCTACCGA-3'
ALFA_RBIP	5'-ATCGTTCTCAAGGTGCTGGCA-CCGTTGAGGTACACTGGGT-3'

3.2.1.3 โคลนชิ้นส่วนของยีนสร้างอะพลาทอกซินเพื่อใช้อ้างอิง (positive control)

การสร้าง positive control เพื่อใช้อ้างอิง เริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน of ยีนสร้างอะพลาทอกซินเพื่อให้ได้ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วตามด้วยขั้นตอนการโคลนยีนตามลำดับต่อไปนี้

1) ทำการโคลนยีนสร้างอะพลาทอกซินที่เพิ่มปริมาณได้กับพลาสมิด

นำแถบดีเอ็นเอของยีนสร้างอะพลาทอกซินเชื่อมต่อกับพลาสมิดตามขั้นตอนที่แนะนำไว้ในคู่มือที่มากับชุดการโคลนยีนสำเร็จรูป หลังจากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนที่มียีนสร้างอะพลาทอกซินด้วยวิธี CTAB โดยนำตัวอย่างประมาณ 100 กรัม ใส่ลงใน CTAB บัฟเฟอร์ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร แล้วบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใส่ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 1 ml แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาเติมสารฟีนอลและคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่ใกล้เคียงกับตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาด 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสแล้วเติม คลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงขนาด 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสแล้วเติมโพรพานอล (propanol) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงขนาด 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงขนาด 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

เทด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอธานอลทิ้ง แล้วทำให้ตะกอนแห้งหลังจากนั้นละลายตะกอนด้วย TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อตรวจสอบความตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

2) คัดเลือกโคลนที่ได้มาเก็บไว้เป็น positive control

3.2.1.4 ทดสอบความจำเพาะและแปรผลยีนสร้างอะพลาทอกซินด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ตัว และเปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA โดยการนำเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* จำนวน 100 ตัวอย่าง ในการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA ต้องนำเชื้อราทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth และนำมาสกัดสารพิษ โดยการนำสปอร์ของเชื้อราจากขวดเพาะเลี้ยงมาใส่ใน eppendorf tube เติมน้ำและบดด้วยมือเพื่อให้เซลล์แตก หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นำเฉพาะส่วนใสมาเจือจาง 100 เท่าแล้วนำไปทดสอบด้วย DOA – Aflatoxin ELISA test kit ส่วนเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification มีสภาวะที่เหมาะสมดังต่อไปนี้

น้ำกลั่น	5.55	ไมโครลิตร
Bataine	1.25	ไมโครลิตร
10x บัฟเฟอร์	1	ไมโครลิตร
dNTP	0.4	ไมโครลิตร
Mg ₂ SO ₄	0.3	ไมโครลิตร
Primer (ผสม)	0.5	ไมโครลิตร
BST เอนไซม์	0.5	ไมโครลิตร
สารตัวอย่าง	0.5	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ที่พัฒนาขึ้น โดยนำโคลนที่ได้จากข้อ 3.2.1.3 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9}

3.2.2 เก็บตัวอย่างสมุนไพร 2 ชนิดคือขมิ้นชันและขิงที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ที่พัฒนาขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 พัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

ผลการพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังต่อไปนี้

4.1.1 เก็บตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* จากห้องปฏิบัติการจำนวน 100 ตัวอย่าง

ตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* จำนวน 100 ตัวอย่างได้มาจากห้องปฏิบัติการที่มีการแยกเชื้อที่เชื่อถือได้



ภาพที่ 8 ตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus*

4.1.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่พบในเชื้อราทั้งสองชนิด

คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อราทั้งสองชนิดในระดับสปีชีส์ตั้งลำดับของยีนดังภาพ มีจำนวนทั้งหมด 4 ตัว สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอได้ผลที่มีความจำเพาะ

661 gcaacctgat gacgactgat atgggtcatct cggggaacaa gagggctacc gatgcggtcc

F1c

721 ggaagatcct cgggtgttcg tgcgcgcagg atggctactt gctgagcatg gtcgtcctta

B1c

B2

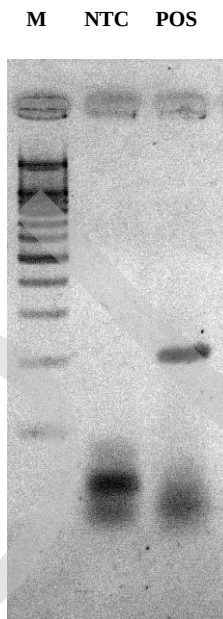
781 tcgttctcaa ggtgctggca tggatatctg cggcagcagg caccagtggt acctcaacgg

B3

841 cggcggggtgg agaaaccaac agtggcagct gtagcaacag

4.1.3 โคลนชิ้นส่วนของยีนสร้างอะฟลาทอกซินเพื่อใช้อ้างอิง (positive control)

การโคลนชิ้นส่วนของยีนสามารถทำได้โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนสร้างอะฟลาทอกซินเพื่อให้ได้ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการดังภาพที่ 9 แล้วตามด้วยขั้นตอนการโคลนยีนตามลำดับต่อไปนี้

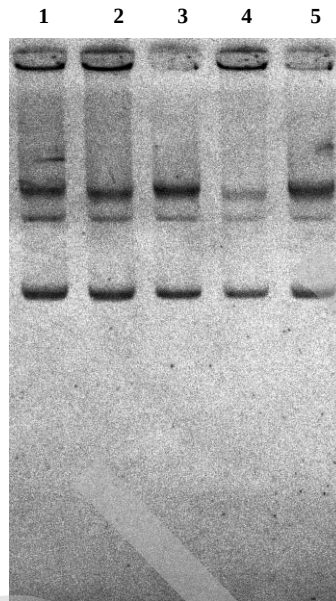


ภาพที่ 9 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ขนาดที่ต้องการจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus*

(M = marker; NTC = negative control; POS = positive control)

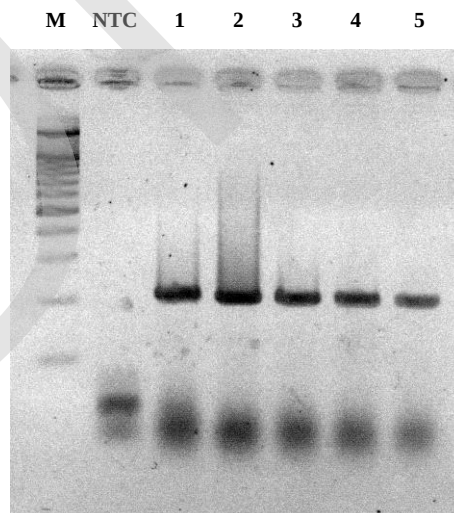
1) ทำการโคลนยีนสร้างอะฟลาทอกซินที่เพิ่มปริมาณได้กับพลาสมิด

เมื่อทำการโคลนยีนสร้างอะฟลาทอกซินกับพลาสมิดแล้วพบว่ามีจำนวน 5 โคลนที่สามารถนำยีนสร้างอะฟลาทอกซินเชื่อมต่อกับพลาสมิดได้สำเร็จ จึงทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอทั้ง 5 โคลนแล้วนำมาตรวจสอบบน 1.5% agarose gel ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ผลการสกัดพลาสมิด DNA
ที่ได้จากการโคลนยีนสร้างอะฟลาทอกซินจำนวน 5 โคลน

2) คัดเลือกโคลนที่ได้มาเก็บไว้เป็น positive control



ภาพที่ 11 แถบ PCR เพื่อตรวจสอบยีนสร้าง aflatoxin ที่โคลนจากพลาสมิด
(M = marker; NTC = negative control; 1-5 = sample)

4.1.4 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงและแปรผลยีนสร้างอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ตัว และเปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA

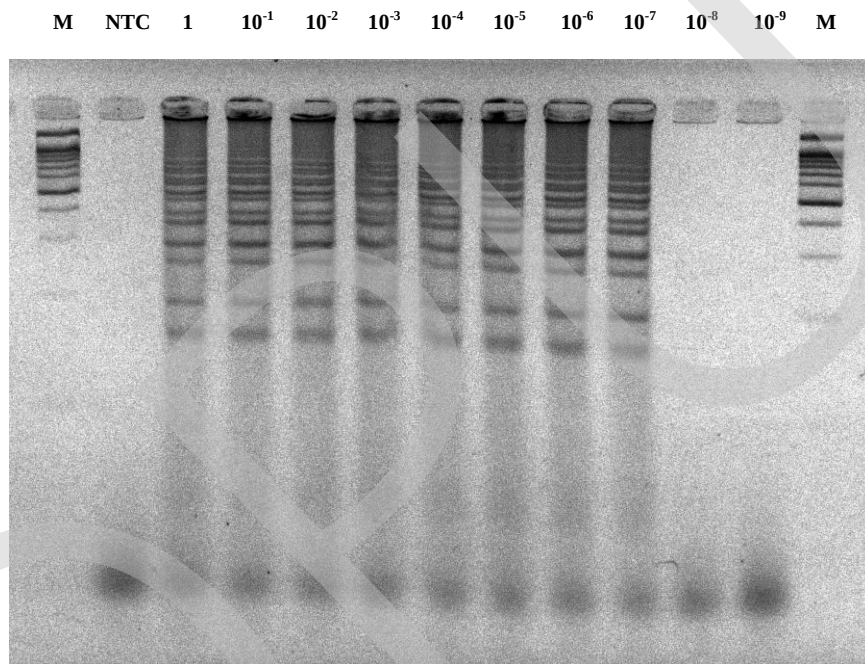
ผลการศึกษาความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อราทั้งสองชนิดจำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่ามีผลเป็นบวกเช่นเดียวกันในตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ในการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP และเทคนิค ELISA (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ผลการทดสอบสารอะฟลาทอกซินเชิงคุณภาพ ด้วยชุดตรวจสอบเทคนิค ELISA

4.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ที่พัฒนาขึ้น

ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจสอบยีนสร้างอะฟลาทอกซินตามความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่เทคนิคยังสามารถตรวจสอบตรวจสอบการปนเปื้อนได้คือ ความเข้มข้นที่เจือจางจากปริมาณตั้งต้นไป 10^{-7} เท่า ดังแสดงดังภาพที่ 13

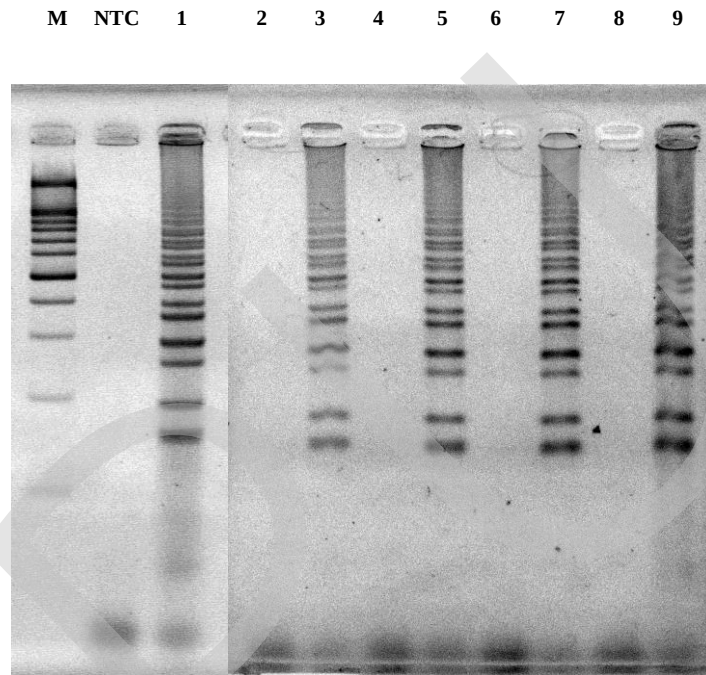


ภาพที่ 13 ความไวของการตรวจวิเคราะห์ยีนสร้างอะฟลาทอกซิน ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

4.2 เก็บตัวอย่างสมุนไพร 2 ชนิดคือขมิ้นชันและขิงที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ที่พัฒนาขึ้น

เก็บตัวอย่างสมุนไพรที่มีวางจำหน่ายตามท้องตลาด 2 ชนิด ได้แก่ ขิงและขมิ้นชัน ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 20 ตัวอย่างจากผู้ผลิต 20 ราย ส่วนขมิ้นชันสามารถเก็บตัวอย่างได้ 6 ตัวอย่างจากผู้ผลิตจำนวน 6 ราย เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ที่พัฒนาขึ้น พบว่าตัวอย่างขิงทั้งหมด 20 ชนิด ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อราสายพันธุ์สร้างอะฟลาทอกซิน จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนในขมิ้นชันตรวจพบการปนเปื้อนจำนวน 3 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 14 และเมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดตรวจหาสารอะฟลาทอกซินด้วยเทคนิค DOA-Aflatoxin ELISA test kit ที่พัฒนาโดยกรมวิชาการเกษตร พบว่าตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อราในขิงและขมิ้นชันด้วยเทคนิค Loop

Mediated Isothermal Amplification ตรวจสอบไม่พบสารอะฟลาทอกซินเมื่อตรวจวิเคราะห์
ด้วย DOA-Aflatoxin ELISA test kit



ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบตัวอย่างขิงและขมิ้นชันด้วยเทคนิค
Loop Mediated Isothermal Amplification
(M = marker; NTC = negative control; 1-9 = ตัวอย่างจากขิงและขมิ้นชัน)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซินในขมิ้นชันและขิงบนหลักการ point of care ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP) พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเมื่อนำเทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม LAMP ตรวจสอบเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซินจำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่ามีความเฉพาะเจาะจงเช่นเดียวกับเทคนิค ELISA ทั้ง 100 ตัวอย่าง ซึ่งเทคนิค ELISA เป็นเทคนิควิเคราะห์ทาง Immunoassay ในรูปแบบการแข่งขันแบบตรง (Direct competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ซึ่งจะตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินที่ถูกสกัดออกมาจากตัวอย่าง นอกจากความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซิน เทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม Loop Mediated Isothermal amplification ยังมีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซิน โดยปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อได้คือ 10^{-7} เท่า และเมื่อประกอบชุดตรวจวิเคราะห์แล้ว ได้นำไปใช้ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซินในตัวอย่างสมุนไพรขมิ้นชันและขิงที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดพบว่าตัวอย่างขิงผงจำนวน 20 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนจำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนขมิ้นชันมีจำนวน 6 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างสมุนไพรทั้งสองชนิดที่พบการปนเปื้อนจากเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซิน จะมีลักษณะของการผลิตภัณฑ์ทั้งแบบผงเครื่องดื่มละลายน้ำ แบบถุงชง และแคปซูล ซึ่งผู้ผลิตบางรายใช้บรรจุภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐานทำให้มีการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซิน ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LAMP ทั้งนี้การปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินสามารถเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่การเก็บเกี่ยวผลผลิต ระหว่างการเก็บรักษา และการขนส่ง ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารก่อมะเร็งชนิดนี้สูง นอกจากจะเป็นปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพและอนามัยของประชาชนผู้บริโภคแล้ว ยังเป็นปัญหาทั้งในและต่างประเทศในการนำมาใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้า

การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในขมิ้นชันและขิงในครั้งนี้เกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 60 นาทีด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว ให้ความเฉพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิค ELISA ซึ่งอุณหภูมิเดียวก็น่าจะสามารถเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างรวดเร็วจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ภาคสนามจึงสามารถทำการตรวจได้ทุกที่ โดยเทคนิคเดิมอยู่บนหลัก polymerase chain reaction (PCR) จะต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน 2 ถึง 3 ระดับ จึงต้องพึ่งพาเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ รวมทั้งทักษะของผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ จึงไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ เทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อในระดับที่สูงกว่าเทคนิค PCR และ ELISA เนื่องจากอาศัยไพรเมอร์ 2 คู่ซึ่งจะเพาะต่อยีนเป้าหมาย 6 บริเวณ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สัมพันธ์กันระหว่างเทคนิค LAMP และเทคนิค ELISA ยิ่งทำให้เทคนิคนี้ควรนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรอื่น ๆ รวมทั้งการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่มีผลเสียต่อสุขภาพในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซินเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมที่มีขั้นตอนหลักสำคัญ 2 ส่วนคือการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจึงมีความสำคัญซึ่งจะส่งผลให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้สำเร็จ โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรขมิ้นชันและขิงที่นำมาวิเคราะห์มีหลายรูปแบบซึ่งแต่ละรูปแบบก็จะมีส่วนผสมอื่นๆ ที่อาจจะมีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย จึงควรมีการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LAMP งานวิจัยครั้งนี้ได้ชุดตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นประยุกต์ใช้กับขมิ้นชันและขิง ซึ่งการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ครั้งนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมไปจนถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้างสารอะฟลาทอกซินในขมิ้นชันและขิง โดยมีการสุ่มตัวอย่างอย่างเป็นระบบเพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์สาเหตุเพื่อหาแนวทางการแก้ไขการปนเปื้อนเชื้อราชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

เอกสารอ้างอิง

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2545. **เครื่องเทศและสมุนไพร** , กรุงเทพฯ. 17 หน้า

ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ. 2551. **หลักการและวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระบบใหม่** : 5-12

สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข. 2544. **การศึกษาองค์ความรู้ ภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย พืชสมุนไพรไทย:เพื่อพัฒนาองค์ความรู้สู่ระดับนานาชาติและสนับสนุนให้ประชาชนเกิดการพึ่งตนเอง.** สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.2543. **การส่งออกสมุนไพร:ศักยภาพ ความพร้อมของประเทศ ปัญหา อุปสรรค และทางแก้. (เอกสารประกอบการสัมมนา).** งานมหกรรมแห่งเอเชีย 2000

อมรา ชินภูติ. 2544. **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา** 11 (3): 27-28.

อมรา ชินภูติ ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. 2547. **หลักการวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป (DOA-ELISA TEST KIT), น. 10. คู่มือการใช้ชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป. สำนักงานวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.**

อมรา ชินภูติ. 2547. **สถานการณ์การปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซินในเงาะ**

calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W. and, Keller N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology Molecular biology** 66: 447-459.

Degola F., , Berni E., Dall Asta C., Spotti E., Marchelli R., Ferrero I. and Restivo F.M. 2007. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology** 103: 409-417.