การศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน จากอาหารโคนมสู่ผลิตภัณฑ์นม และประสิทธิภาพการดูดซับด้วยสารชีวภาพ ในห้องปฏิบัติการ

นายปัญญา เรืองวสุ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-533-053-1

STUDIES OF PERCENT CARRY-OVER OF AFLATOXIN FROM COW FEED TO MILK PRODUCTS AND THE EFFICIENCY OF ADSORPTION BY BIO-ADSORBING AGENTS *IN VITRO*

Mr. Panya Ruangwasu

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Environmental Biology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2001

ISBN 974-533-053-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน จากอาหารโคนมสู่ผลิตภัณฑ์นม และประสิทธิภาพการดูดซับด้วยสารชีวภาพ ในห้องปฏิบัติการ

สภามหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....
(ผศ. ดร. พาณี วรรณนิธิกุล)
ประธานกรรมการ

....
(ผศ. ดร. เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

....
(ผศ. ดร. สุนทร กาญจนทวี)
กรรมการ

....
(ผศ. ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ)
กรรมการ

....
(ศ. ดร. ไมตรี สุทธจิตต์)
กรรมการ

....
(รศ. ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

....
(รศ. ดร.ประสาท สืบค้า)
คณบดีสำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ปัญญา เรืองวสุ: การศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน จากอาหารโคนมสู่ผลิตภัณฑ์นม และประสิทธิภาพการดูดซับด้วยสารชีวภาพ ในห้องปฏิบัติการ (STUDIES OF PERCENT CARRY-OVER OF AFLATOXIN FROM COW FEED TO MILK PRODUCTS AND THE EFFICIENCY OF ADSORPTION BY BIO-ADSORBING AGENTS *IN VITRO*) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์, 88 หน้า. ISBN 974-533-053-1

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน จากอาหารโคนมสู่น้ำนม และการดูดซับอะฟลาท็อกซินด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ การศึกษาประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบ น้ำนมหลังการแปรรูป และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า อาหารโคนมทั้ง 6 ฟาร์ม มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 อยู่ในช่วง 37.47-201.38 ppb อะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ อยู่ในช่วง 0.16-0.75 ppb การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมไปยังน้ำนมดิบ อยู่ในช่วง 0.35-1.02% และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ จากฟาร์มที่ 1 สู่น้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ เท่ากับ 62.5%

การทดลองที่ 2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design จัดกลุ่มการทดลองแบบ factorial 4 x 2 โดยมีปัจจัยที่หนึ่ง คือผลิตภัณฑ์ดูดซับ aluminosilicate, MOS ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค และปัจจัยที่สอง คือระดับ pH 5.8 และ 6.8 การทดลองใช้ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml เจือปนในอาหารโคนม 50 g บ่มที่อุณหภูมิ 39 ^{0}C เป็นระยะเวลา 2 วัน ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารด้วย HPLC ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ทางการค้ามีค่าการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ pH 5.8 และ 6.8 เท่ากับ 91.01 และ 89.60% ตามลำดับ ส่วนยีสต์จากกระเพาะโค มีค่าการดูดซับที่ pH 5.8 และ 6.8 เท่ากับ 86.59 และ 87.99% ตามลำดับ และทั้งคู่มีประสิทธิภาพการดูดซับสูงกว่า aluminosilicate และ MOS อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของ aluminosilicate และ MOS มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) เมื่อ pH เพิ่มจาก 5.8 เป็น 6.8 คือการดูดซับเพิ่มจาก 60.47 เป็น 72.25% และจาก 50.43 เป็น 64.91% ตามลำดับ ดังนั้นยีสต์จากกระเพาะโคมีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ใกล้เคียงหรือดีกว่าผลิตภัณฑ์ดูดซับชีวภาพและเคมีทางการค้า

การทดลองที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 แบบ *in vitro* วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design จัดกลุ่มการทดลองแบบ

factorial 2 x 3 x 2 โดยมีปัจจัยที่หนึ่ง คือผลิตภัณฑ์ดูดซับ 2 ชนิด คือยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ปัจจัยที่ 2 คือระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ 3 ระดับ คือ 1.25×10^7 , 2.5×10^7 และ 5×10^7 cells/ml และปัจจัยที่ 3 คือระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน กำหนดให้บล็อกเป็นระดับความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml และ 400 ng/ml ที่เจือปนในอาหารโคนม 50 g ที่ระดับ pH 5.8 อุณหภูมิ 39 ^{0}C และวิเคราะห์หาอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารด้วย HPLC พบว่าประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในส่วนของระดับความเข้มข้นของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) กล่าวคือเมื่อระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับเพิ่มขึ้น การดูดซับมีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้น ในส่วนของระยะเวลามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) เมื่อเวลาเพิ่มจาก 2 วัน เป็น 4 วัน การดูดซับมีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้น งานวิจัยนี้เป็นแนวทางเบื้องต้นของการศึกษาการลดสารพิษจากราในอาหารสัตว์ ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มศักยภาพและพัฒนายีสต์จากกระเพาะโคให้เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ เพื่อใช้ลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์ต่อไปในอนาคต

สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม ลายมือนักศึกษา...

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา................................

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.........................

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.........................

PANYA RUANGWASU: STUDIES OF PERCENT CARRY-OVER OF AFLATOXIN FROM COW FEED TO MILK PRODUCTS AND THE EFFICIENCY OF ADSORPTION BY BIO-ADSORBING AGENTS *IN VITRO*. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. BENJAMART CHITSOMBOON, Ph.D. 88 PP. ISBN 974-533-053-1

The present thesis aimed to study aflatoxin levels and its transfer from dairy cow feeds to milk and counteraction by adsorbing products. The research was divided into three major studies. The first study was to determine aflatoxin levels in dairy cow feeds, milk and milk products. The dairy cow feeds in six farms were contaminated with aflatoxin B_1 ranging from 37.47 to 201.38 ppb. Milk from the cows fed with the contaminated feeds had aflatoxin M_1 ranging from 0.16-0.75 ppb. The carry-over of aflatoxin in dairy cow feeds to raw milk was between 0.35-1.02%. There was a transfer of aflatoxin M_1 from raw milk to pasteurized milk of 62.5%.

The second study was to investigate the adsorption of aflatoxin B_1 *in vitro* by various substances. The experimental design was 4 x 2 factorial in completely randomized design. Factor A was adsorbing agent, aluminosilicate, mannanoligosaccharide (MOS), commercialized-live yeast and yeast from the bovine rumen, and factor B was pH, 5.8 and 6.8. Fifty grams of dairy cow feed was spiked with 100 ng/ml standard aflatoxin B_1 and incubated with or without various adsorbing agents at 39^{o}C for 2 days. Aflatoxin B_1 was extracted from feeds and quantified using HPLC. The results showed that the percent adsorption of aflatoxin B_1 at pH 5.8 and 6.8 was 91.01 and 89.60% by commercialized-live yeast, and 86.59 and 87.99% by yeast from the bovine rumen, respectively. The percent adsorption of both bio-adsorbing agents was significantly ($p<0.01$) higher than the aluminosilicate and MOS. When pH was changed from 5.8 to 6.8 in the feeds, the adsorption efficiency of both aluminosilicate and MOS was significantly ($p<0.01$) increased from 60.47 to 72.25% and from 50.43 to 64.91%, respectively.

The final study was to investigate factors affecting the efficiency of adsorption by bio-adsorbing agents. The experimental design was 2 x 3 x 2 factorial in randomized complete block design. Factor A was bio-adsorbing agent, commercialized-live yeast and yeasts from the bovine rumen; factor B was concentration of bio-adsorbing agent, $1.25x10^7$, $2.5x10^7$, $5x10^7$ cells/ml, and factor C was number of days of incubation with bio-adsorbing agents, 2 and 4 days.

The block was concentration of aflatoxin B_1, 200 and 400 ng/ml, which was spiked into the 50 g cow feed at pH 5.8 and 39 ^{o}C. The aflatoxin B_1 was extracted and quantified by using HPLC. The results suggested no significant difference ($p>0.05$) in the adsorption efficiency of commercialized-live yeast and yeasts from the bovine rumen. The adsorption efficiency of aflatoxin B_1 by bio-adsorbing agents was concentration and time dependent. The efficiency was significantly higher ($p<0.01$) on day 2 compared to day 4 in the cultures. Also, the adsorption significantly increased ($p<0.01$) with higher concentration of yeast cells. Therefore, the exploitation of yeasts from the bovine rumen to reduce contaminated aflatoxin B_1 in feeds is feasible. The future development of yeasts from the bovine rumen as a commercialized bio-adsorbing product for mycotoxins might be worthwhile.

สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา 2544

ลายมือนักศึกษา...
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..................................
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.............................
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.............................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา แนะนำแนวคิดในการดำเนินการวิจัย แก้ปัญหาต่างๆ ทั้งในด้านวิชาการและการดำเนินการวิจัย ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายต่างๆ ในการดำเนินการทำวิจัย อีกทั้งให้กำลังใจและดูแลอย่างใกล้ชิด

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ท่านได้กรุณาอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย อีกทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนทร กาญจนทวี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ท่านได้ให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการ ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการเสนอแนวความคิดในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือคัดแยกยีสต์จากกระเพาะโค

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิรัฐ เรืองศรีตระกูล และ ดร. ดวงจันทร์ สุประเสริฐ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ยืมสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 และ M_1 ระหว่างที่รอการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ตลอดจนให้คำแนะนำวิธีการสกัดอะฟลาท็อกซินและการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ขอขอบคุณ พี่ๆ บุคลากร ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แนะนำการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษา ตลอดจนให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าจนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จตลอดมา

ปัญญา เรืองวสุ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……………………………………………………………………….ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)……………………………………………………………………ค

กิตติกรรมประกาศ…………………………………………………………………………จ

สารบัญ……………………………………………………………………………………..ฉ

สารบัญตาราง………………………………………………………………………...…..ญ

สารบัญรูป…...……………………………………………………………………………..ฎ

บทที่

1 **บทนำ**……………………………………………………………………..…1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……………………………………...1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย…………………………………………………………2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย……………………………………………………...…..2

1.4 สมมติฐานของการวิจัย……………………….………………………………2

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย………………………………………………...3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…………………………………………………..3

2 **วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**…………………………………….….……4

2.1 อะฟลาท็อกซิน…………………………………………………….……..…..4

2.1.1 สูตรโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน………………………..………...4

2.1.2 ชนิดของอะฟลาท็อกซิน………………………………….………...5

2.1.3 คุณสมบัติของอะฟลาท็อกซิน…………………………..………...6

2.1.4 กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินในรา…………………….……..7

2.1.5 การเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซินภายในร่างกาย…………..……..9

2.1.6 ความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในหลอดทดลอง………………..…..11

2.1.7 ความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในสัตว์ทดลอง…………………….12
2.1.8 ภาวะการเกิดพิษของอะฟลาท็อกซินในคน………………………….....13
2.2 ปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์………......14
2.3 ปัจจัยที่ทำให้ราที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์สร้างสารพิษ …..……....16

สารบัญ (ต่อ)

2.4 วิธีการตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา…………………………………....17
2.5 ผลของอะฟลาท็อกซินต่อสาธารณสุขและความปลอดภัย……..………...17
2.6 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ตรวจพบในประเทศไทย……………………..19
2.7 แนวทางการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราในน้ำนมและวัตถุดิบอาหารสัตว์…………………………………………………….20
2.8 วิธีการที่ใช้ในการลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษจากรา…………………...22
2.8.1 วิธีทางกายภาพ……………………………………………………..22
2.8.2 วิธีทางชีววิทยา……………………………………………………..22
2.8.3 วิธีทางเคมี…………………………………………………………..23
2.9 ผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา………………………………………..…..24
2.9.1 สารดูดซับ aluminosilicate……………………………..………..24
2.9.2 Mannanoligosaccharide (MOS)……………………….…………...25
2.9.3 ยีสต์………………………………………………………….………….26
3 **วิธีการดำเนินงานวิจัย**………………………………...………….……….27
3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณอะฟลาท็อกซิน ที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบก่อนการแปรรูป น้ำนมดิบหลังการแปรรูป และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม……………………………….………...………...27
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง………………………………………………….27
3.1.1.1 การสุ่มตัวอย่างอาหารโคนมสำเร็จรูป……………………….....27
3.1.1.2 การสุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน….….27
3.1.1.3 การสุ่มตัวอย่างน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน……….....27
3.1.1.4 การสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่มที่วางขายตามท้องตลาด…………………………………………………...28

3.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1…………………………....28
3.1.2.1 เครื่องมือ………………………………………………………28
3.1.2.2 สารเคมี……………………………………………………….28
3.1.2.3 การสกัดอะฟลาท็อกซิน B_1…………………………..…….29

สารบัญ (ต่อ)

3.1.2.4 การชะล้างสารที่สกัดได้ให้สะอาดด้วย chromatography column……..30

3.1.2.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC……..31

3.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1……..33

3.1.3.1 เครื่องมือ……..33

3.1.3.2 สารเคมี……..33

3.1.3.3 การสกัดอะฟลาท็อกซิน M_1……..34

3.1.3.4 การชะล้างสารที่สกัดได้ให้สะอาดด้วย chromatography column……..34

3.1.3.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC……..35

3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล……..38

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ……..39

3.2.1 การเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมน (rumen fluid)……..40

3.2.2 การคัดแยกยีสต์จากกระเพาะโคให้บริสุทธิ์……..41

3.2.3 การคัดแยกยีสต์ทางการค้าให้บริสุทธิ์……..42

3.2.4 การเพาะเลี้ยงยีสต์……..42

3.2.5 การนับจำนวนยีสต์โดยใช้ haemacytometer……..42

3.2.6 การเตรียมชุดการทดลอง……..44

3.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1……..45

3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล……..45

3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของผลิตภัณฑ์ดูดซับ……..45

3.3.1 การเพาะเลี้ยงยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค……..47

3.3.2 การเจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค……..47

3 . 3 . 3 การเตรียมชุดการทดลอง……..47

3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1……..47

สารบัญ (ต่อ)

3.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล……………………………………………………….47

3.4 สถานที่ทำการวิจัย…………………………………………………………..48

3.5 ระยะเวลาทำการวิจัย………………………………………………………..48

4 **ผลการทดลอง**…………………………………………………………..…49

5 **วิจารณ์ผลการทดลอง**…………………………………………………………..58

6 **สรุปผลการทดลอง**………………...…………………………………………63

รายการอ้างอิง……………………………………………………………………………..65

ภาคผนวก……………………………………………………………………………………75

ภาคผนวก ก……………………………………………………………………...76

ภาคผนวก ข……………………………………………………………………..79

ภาคผนวก ค……………………………………………………………………...83

ประวัติผู้เขียน…………………………………………………………………..…...88

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงสูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล และจุดหลอมเหลวของอะฟลาท็อกซิน……………..……6

2.2 ระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน………………………………………………….12

2.3 ผลการวิเคราะห์ อะฟลาท็อกซิน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในปี 2538 และ2539…………………14

2.4 ผลการวิเคราะห์อะฟลาท็อกซิน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในปี 2539 และ 2540…………………15

2.5 ปริมาณอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์ที่จัดว่าเป็นอาหารสัตว์ที่เสื่อมคุณภาพ…………………16

2.6 ข้อกำหนดอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนม และผลิตภัณฑ์นม ของประเทศต่างๆ………………..19

2.7 ชนิดของสารดูดซับในการจับกับสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ประเภทต่างๆ……...26

3.1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1……………………………………...32

3.2 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1……………………………………..37

3.3 แผนการศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ……………………39

3.4 จำนวนเซลล์ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค จากการนับโดยใช้ haemacytometer…..43

3.5 แผนการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของยีสต์ทางการค้าและ ยีสต์จากกระเพาะโค ที่ 200 ppb และ 400 ppb เวลา 2 และ 4 วัน……………………………..46

4.1 แสดงปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (ppb) ในอาหารโคนม ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมดิบ และ % carry over………………………………………………………………….50

4.2 แสดงปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมดิบ น้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน และ % carry over…………………………………………………………………………..50

4.3 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม……………………………………...51

4.4 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (AFB_1) ในอาหารโคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC…………….52

4.5 % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 (AFB_1) ในอาหารโคนม ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ สารพิษจากรา…………………………………………………………………………53

4.6 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC……………………55

4.7 % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 …………………………………….…………………..57

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน B_1 , B_2 , G_1, G_2, B_{2a} และ G_{2a}……………………………….5

2.2 แสดงโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน M_1 และ M_2……………………………………………..6

2.3 แสดงการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินในรา………………………………..………………8

2.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซิน B_1 ภายในร่างกายสัตว์…………………………...10

2.5 แสดงการจับตัวระหว่างหมู่ไดคาร์โบนิล ของอะฟลาท็อกซิน กับผิวของ HSCAS………..…24

3.1 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)…………………………………...29

3.2 standard curve ของสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1………………..………………………..33

3.3 standard curve ของสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1……………………………….…….38

3.4 แสดงการเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก……………………………………………………41

3.5 แสดง Haemacytometer…………………………………………………………………….43

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารพิษอะฟลาท็อกซินจากราเป็นกลุ่มสารเมทาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็ง และก่อกลายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดอาการเป็นพิษต่อร่างกายของคนและสัตว์ได้ อะฟลาท็อกซินที่ได้รับส่วนใหญ่มาจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อน ราและสารพิษที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ สามารถเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนในการผลิตอาหารสัตว์ ตั้งแต่การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการลำเลียงเพื่อนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ ในประเทศไทยวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ได้จากการผลิตภายในประเทศ และนำเข้าจากต่างประเทศ วัตถุดิบหลักประเภทธัญพืช ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ ปลายข้าว ประเภทโปรตีนจากพืช ได้แก่ กากถั่วลิสง กากทานตะวัน และกากพืชชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดแทนกากถั่วเหลือง ประเภทโปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น เนื้อกระดูกป่น และอื่นๆ ซึ่งวัตถุดิบที่นำมาประกอบเป็นอาหารสัตว์เหล่านี้อาจมีสารพิษอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และคณะ (2540) รายงานว่ากากถั่วลิสงที่ผลิตในประเทศมีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับที่สูงมากคือ 200-1,500 ppb เมื่อสัตว์ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินจะมีการถ่ายทอดสู่ผลผลิต เช่น ในเนื้อสัตว์ ไข่ และน้ำนม (อนงค์ บิณฑวิหค, ดานิศ ทวีติยานนท์, ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล, วรา พานิชเกรียงไกร และ อรวรรณ จำรัสฉาย, 2540)

แม่โคที่ได้รับอาหารที่มีสารพิษอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนเป็นประจำจะมีโอกาสสูงที่จะถ่ายทอดสารพิษสู่น้ำนมได้ (Marth, 1990; Van Egmond, 1989) ถึงแม้ว่าราที่ผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซินอาจถูกทำลายด้วยขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ แต่สารพิษอะฟลาท็อกซินยังสามารถคงสภาพอยู่ได้นาน ดังนั้นปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาท็อกซินในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม เป็นสิ่งที่ควรได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะทำให้ผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน มีสารพิษตกค้าง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบทางด้านสุขภาพของผู้บริโภค เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจระดับประเทศ เพราะถ้ามีสารพิษจากราปนเปื้อนในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศสูง ย่อมเป็นช่องทางให้เกิดการนำเข้าน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศมากขึ้น การส่งออกของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมจากประเทศไทยก็เป็นไปได้ยาก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและอุตสาหกรรมด้านโคนม ดังนั้นเพื่อศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยของผู้บริโภค เพื่อช่วยพัฒนาอุตสาหกรรมโคนมของประเทศไทยให้ได้มาตรฐานสากล และช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารโคนมและในน้ำนมโคให้น้อยลงเท่าที่จะทำได้

โครงการนี้จึงเสนอที่จะศึกษาเกี่ยวกับปริมาณการถ่ายทอดสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมไปยังน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม รวมทั้งศึกษาวิธีการลดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินโดยใช้ยีสต์จากกระเพาะโค เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ดูดซับต่างๆ ที่เป็นผลิตภัณฑ์ดูดซับทางชีวภาพ เช่น mannanoligosaccharide (MOS) ยีสต์ทางการค้า และผลิตภัณฑ์ดูดซับทางเคมี aluminosilicate เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นของการศึกษาการลดสารพิษจากราในอาหารสัตว์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

1.2.2 เพื่อศึกษาปริมาณการถ่ายทอดของสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมไปสู่น้ำนม

1.2.3 เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาท็อกซินของผลิตภัณฑ์ดูดซับ aluminosilicate, MOS, ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การวิจัยมุ่งเน้นศึกษาปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

1.3.2 การวิจัยมุ่งเน้นศึกษาการถ่ายทอดของสารพิษอะฟลาท็อกซิน จากอาหารโคนมสู่น้ำนม

1.3.3 การวิจัยมุ่งเน้นศึกษาความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาท็อกซินของยีสต์จากกระเพาะโค เทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า คือผลิตภัณฑ์ดูดซับ aluminosilicate, MOS และยีสต์ทางการค้า

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 แม่โคที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาท็อกซิน จะสามารถถ่ายทอดสารพิษสู่น้ำนม และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มน่าจะมีปัญหาการตกค้างของสารพิษอะฟลาท็อกซิน

1.4.2 ยีสต์จากกระเพาะโคน่าจะมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษอะฟลาท็อกซินได้ เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากราทางการค้า aluminosilicate, MOS และยีสต์ทางการค้า

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

aflatoxin, aluminosilicate, mannanoligosaccharide (MOS), carry-over, ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบ และในผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่ม

1.6.2 ทราบอัตราส่วนของสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมที่ถูกถ่ายทอดไปสู่น้ำนม

1.6.3 เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับปริมาณการตกค้างของสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์และในน้ำนม

1.6.4 เป็นแนวทางเบื้องต้นในการลดการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาท็อกซินด้วยการดูดซับ

1.6.5 ทราบประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษอะฟลาท็อกซินของยีสต์จากกระเพาะโค เทียบกับผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากราทางการค้า aluminosilicate, MOS และยีสต์ทางการค้า เพื่อศึกษาศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ในอนาคต

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารพิษจากรา (mycotoxins) คือกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ราสร้างขึ้น และสามารถทำให้เกิดอาการเป็นพิษต่อร่างกายของคนและสัตว์ได้ สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์มีหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดจากราในสกุล (genus) *Aspergillus, Fusarium* และ *Penicillum* (Davis and Diener, 1987) สารพิษจากราที่มีความสำคัญและที่ต้องการศึกษา คืออะฟลาท็อกซิน (aflatoxin)

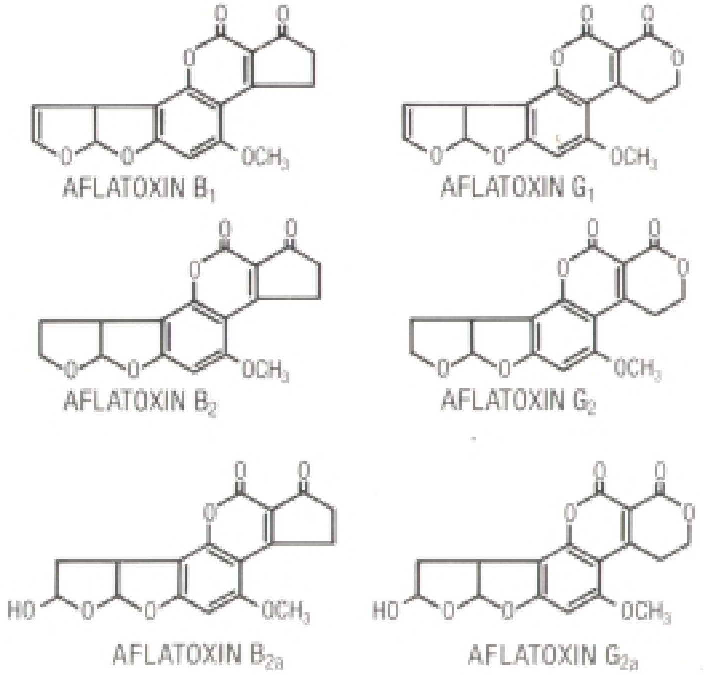
2.1 อะฟลาท็อกซิน

อะฟลาท็อกซิน ผลิตโดยราชนิด *Aspergillus flavus, A. parasiticus* และ *A. nomius* (Kurtzman, Horn and Hesseltine, 1987; Hocking, 1997; Steyn and Stander, 1999) นอกจากนี้ *A. ruber, A. wenti, A. oryzae, A. niger, A. ostianus, A. ochraceus, A. tamarii, Penicillium puberrulum, P. variable, P. citrinum, P. frequentanus* และ *Rhizopus* sp. ยังสามารถผลิตอะฟลาท็อกซินได้เช่นกัน (คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์ และ อดิลักษ์ เล็บนาค, 2539; Goto, Wicklow and Ito, 1996) สภาพที่เอื้ออำนวยต่อการสร้างอะฟลาท็อกซินได้ดี จะต้องมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ (percent, %) ความชื้น 17% และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 24-35 องศาเซลเซียส (degree Celsius, ^{0}C) ราดังกล่าวจะไม่สามารถเจริญในสภาพที่มีความชื้นต่ำกว่า 12% ดังนั้นปัญหาการปนเปื้อนจึงเกิดขึ้นบ่อยในเขตที่มีอากาศอบอุ่นไปจนถึงเขตร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทย (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2539)

2.1.1 สูตรโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน

อะฟลาท็อกซินเป็นสารเคมีที่เป็นอนุพันธ์ของ coumarin ต่อกับ bifuran ring (รูปที่ 2.1)ในกรณีของอะฟลาท็อกซิน B_1 จะมี cyclopentanone ring จับกับ coumarin ทางด้านขวา ในกรณีของอะฟลาท็อกซิน G_1 จะมี 6 - member lactone ring จับกับ coumarin ทางด้านขวา เมื่อ furan ring ของอะฟลาท็อกซิน B_1 และอะฟลาท็อกซิน G_1 เกิด saturation ด้วย ไฮโดรเจน 2 อะตอม จะเกิดเป็นอะฟลาท็อกซิน B_2 และอะฟลาท็อกซิน G_2 ซึ่งความเป็นพิษจะน้อยกว่าอะฟลาท็อกซิน B_1 และอะฟลาท็อกซิน G_1 สำหรับอะฟลาท็อกซิน M_1 และอะฟลาท็อกซิน M_2 เกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ เข้าที่ตำแหน่งที่ 4 ของ furan ring ในอะฟลาท็อกซิน B_1 และอะฟลาท็อกซิน B_2 ตามลำดับ (รูปที่ 2.2) แต่ถ้าเติมหมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าวเข้าที่ตำแหน่งที่ 2 ของ furan ring ในอะฟลาท็อกซิน B_1

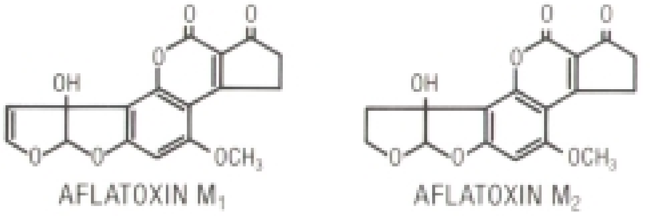
และอะฟลาท็อกซิน G_1 จะเกิดเป็นอะฟลาท็อกซิน B_{2a} และอะฟลาท็อกซิน G_{2a} (รูปที่ 2.1) ตามลำดับ (ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช, 2540; Steyn and Stander, 1999)



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน B_1 , B_2 , G_1, G_2, B_{2a} และ G_{2a}
ที่มา: Palmgren and Hayes (1987)

2.1.2 ชนิดของอะฟลาท็อกซิน

สารพิษอะฟลาท็อกซินมีหลายชนิด คือ สารพิษอะฟลาท็อกซินชนิด B_1, B_2, B_{2a}, G_1, G_2, G_{2a}, GM_1, M_1, M_2, P_1, Q_1 และ R_0 ชนิดที่มีความเป็นพิษร้ายแรงได้แก่ อะฟลาท็อกซิน ชนิด B_1, B_2, G_1 และ G_2 (รูปที่ 2.1) รา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซิน B_1 ในปริมาณที่สูงกว่าสารพิษชนิดอื่นๆ อะฟลาท็อกซิน B_1 มีพิษร้ายแรงมากที่สุด และเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดมะเร็งตับของสัตว์ทดลองได้ดีที่สุด รองลงมาคือ G_1, B_2 และ G_2 (ศุภกิจ อังศุภากร, วิทยา ธรรมวิทย์ และ สมพงศ์ สหพงศ์, 2520) สำหรับอะฟลาท็อกซิน M_1 และ M_2 (รูปที่ 2.2) เป็นเมทาบอไลท์ของอะฟลาท็อกซิน B_1 และ B_2 มักพบในน้ำนมและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาท็อกซิน B_1 และ B_2 (ชาญยุทธ จรูญเกียรติกำจร และ อุทัย คันโธ, 2538ก)



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน M_1 และ M_2
ที่มา: Palmgren and Hayes (1987)

2.1.3 คุณสมบัติของอะฟลาท็อกซิน (ไมตรี สุทธจิตต์, 2531) มีดังนี้คือ

2.1.3.1 สามารถเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ช่วงความยาวคลื่น 256-365 nm อะฟลาท็อกซิน B_1 และ B_2 เรืองแสงสีน้ำเงิน อะฟลาท็อกซิน G_1 และ G_2 เรืองแสงสีเขียว

2.1.3.2 ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เคมีหลายชนิด เช่น เมทานอล เอทานอล อะซีโตน และคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในอีเทอร์

2.1.3.3 มีอุณหภูมิหลอมเหลวสูง (ตารางที่ 2.1) ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันไอเพื่อทำลายอะฟลาท็อกซิน จึงไม่ค่อยได้ผล

2.1.3.4 สามารถถูกทำลายได้โดย ไฮโปคลอไรท์ แอมโมเนีย ด่างแก่ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมมา

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล และจุดหลอมเหลวของอะฟลาท็อกซิน

ชนิดของอะฟลาท็อกซิน	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (^{o}C)
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268-269
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286-289
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	244-246
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237-240
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	299
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	293

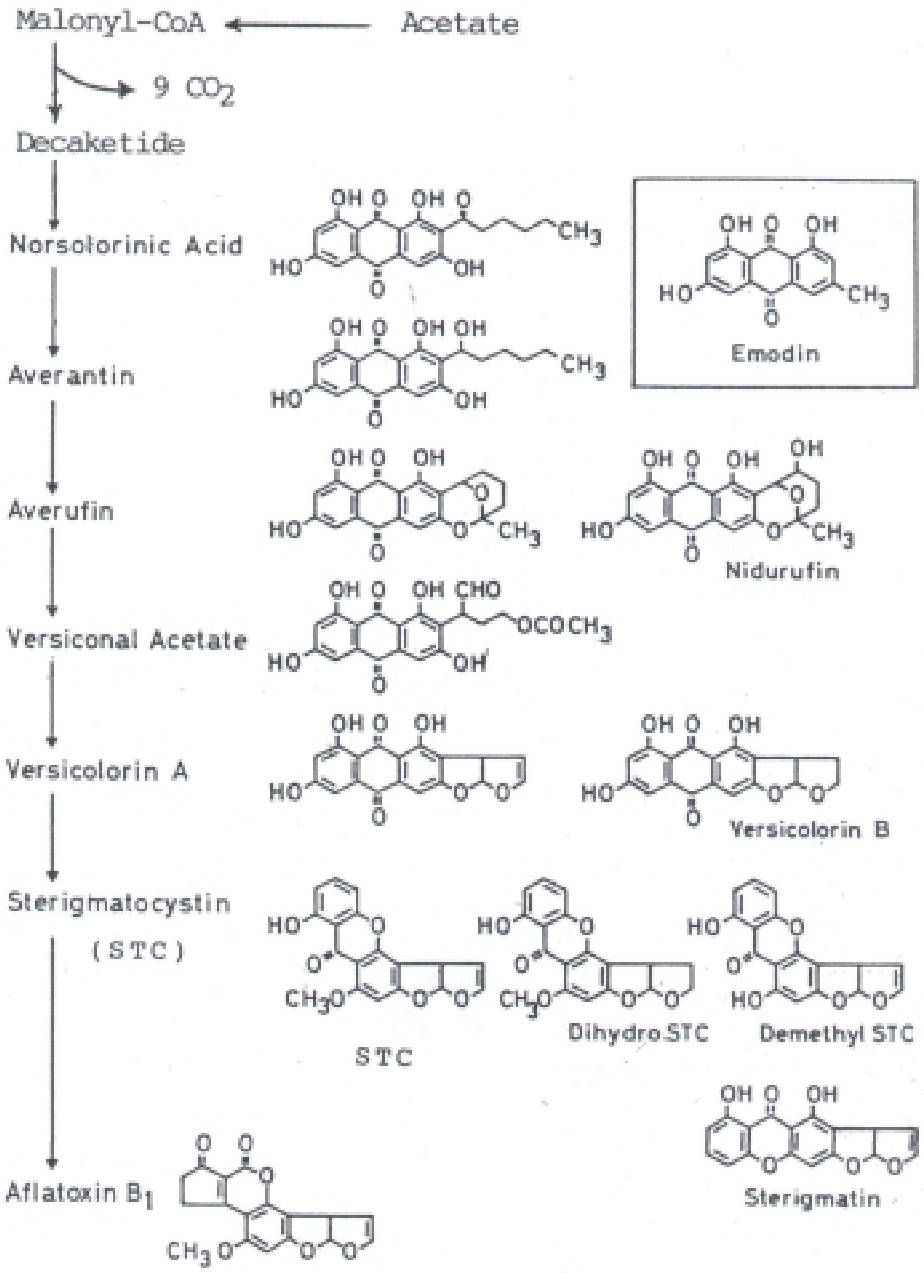
ที่มา: Marth (1990)

2.1.4 กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินในรา

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และสาโรช ค้าเจริญ (2543) รายงานว่ารา สามารถสร้างอะฟลาท็อกซิน ได้ภายใน 24 ชั่วโมง และสามารถสร้างได้นานติดต่อกันถึง 10 วัน โดยระดับสูงสุดของอะฟลาท็อกซินที่สร้างขึ้น สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 7 ภายหลังจากราเจริญ เติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยง หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ ในช่วงสัปดาห์แรก อะฟลาท็อกซิน B_1 และ G_1 จะมีการสังเคราะห์ขึ้นมากที่สุด และเพิ่มระดับการสังเคราะห์ลงในขณะที่อะฟลาท็อกซิน ชนิด B_{2a} และ G_{2a} มีระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว

กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินโดยรามี แอซีเตท (acetate) และมาโลเนท (malonate) เป็นสารตั้งต้น แหล่งธาตุอาหารที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และกรดอะมิโน นอกจากนี้การเพิ่มธาตุโลหะบางชนิด เช่น Fe Mg และ Cd ช่วยเพิ่มการสร้างอะฟลาท็อกซิน (ชาญยุทธ จรูญเกียรติกำจร และ อุทัย คันโธ, 2538ข; Marth, 1990) แอซีเตท และมาโลเนท ถูกกระตุ้นด้วยโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) กลายเป็นแอเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) และมาโลนิลโคเอ (malonyl-CoA) จากนั้นสารทั้งสองจะรวมตัวกันได้ แอซีโตแอซีทิลโคเอ (acetoacetyl-CoA) พร้อมกับมีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยารวมตัวทุกครั้ง หมู่แอซีทิลจะถูกเติมลงไปบนสารตัวกลางคีไตด์ (ketide) จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นวงแหวนที่มีคาร์บอน 20 ตัว ได้ C_{20} polyketide สารตัวกลางนี้จะถูก ดีคาร์บอกซิเลท (decarboxylate) และถูกออกซิไดส์ มีปฏิกิริยาหลายขั้นตอนผ่านตัวกลางอย่างน้อยอีก 4 ชนิด กลายเป็นสารพิษสเตอริกมาโตซิสติน (sterigmatocystin) และอะฟลาท็อกซิน ตามลำดับ (ไมตรี สุทธจิตต์, 2531; Bhatnagar, Clevland and Cotty, 1994; Steyn and Stander, 1999; Ciegler, Kadis and Aji, 1971) ดังรูปที่ 2.3

Yabe, Nakamura and Hamasaki (1999) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ทางชีวภาพของอะฟลาท็อกซินชนิด G_1 และ G_2 ใน cell extracts ของ *A. parasiticus* NIAH-26 จากสารตั้งต้น O-methylsterigmatocystin และ dihydro-O-methylsterigmatocystin ตามลำดับ พบว่าปริมาณของอะฟลาท็อกซิน G_1 และ G_2 เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเติม NADPH ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินชนิด G_1 และ G_2 ไม่ได้มาจากอะฟลาท็อกซินชนิด B_1 และ B_2 หรือจาก 5-methoxysterigmatocystin, dimethoxysterigmatocystin หรือ sterigmatocystin เป็นการยืนยันว่าอะฟลาท็อกซินชนิด B_1 และ B_2 ไม่ได้เป็นสารตั้งต้นของอะฟลาท็อกซิน G_1 และ G_2 ตามลำดับแต่อย่างใด และอะฟลาท็อกซินทั้งสองกลุ่ม (B และ G) มาจากสารตั้งต้นตัวเดียวกันคือ O-methylsterigmatocystin และ dihydro-O-methylsterigmatocystin การสังเคราะห์อะฟลาท็อกซิน G_1 และ G_2 ต้องการ NADPH, microsomal enzyme (cytochrome P450) และ 220-kDa cytosol protein

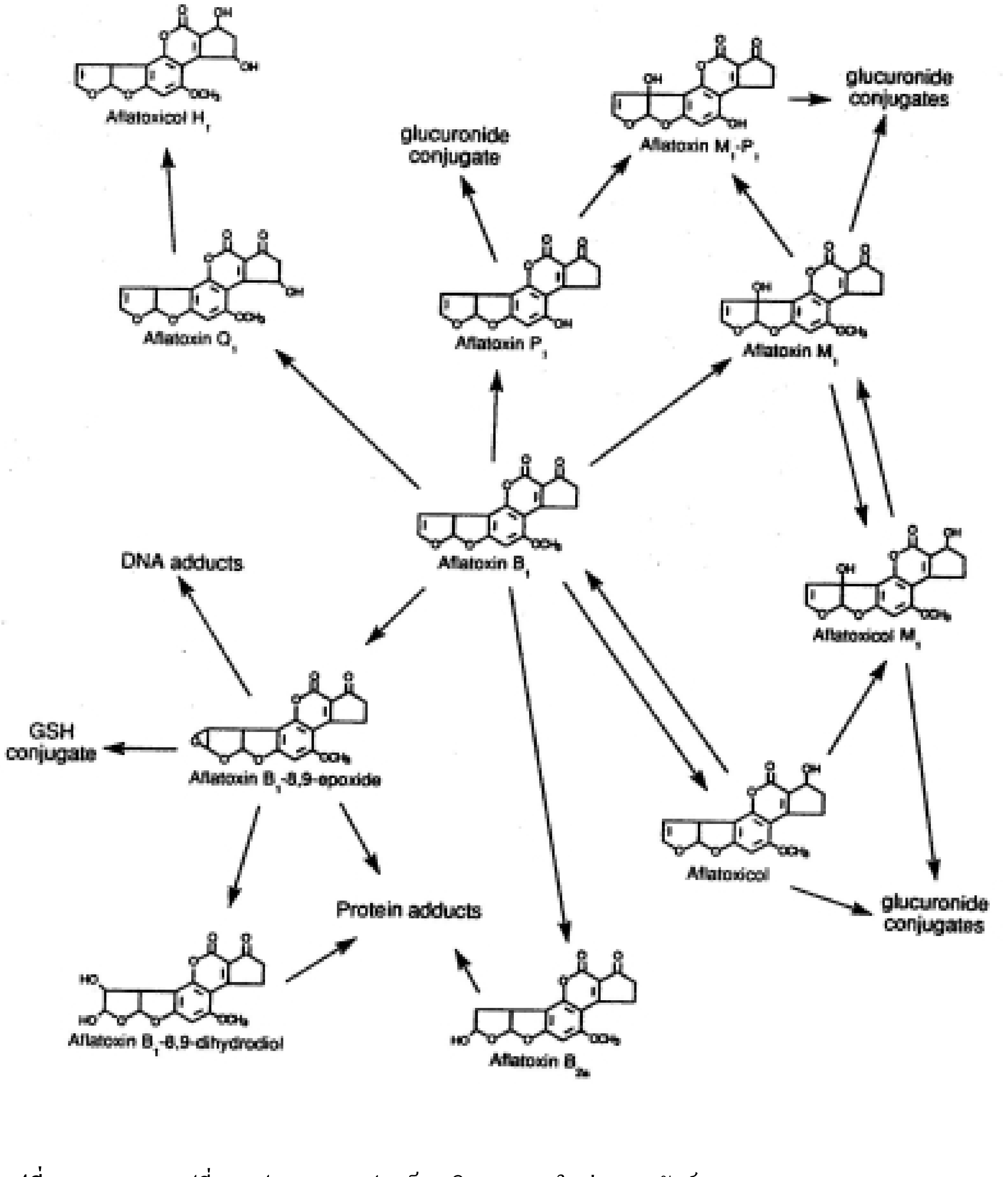


รูปที่ 2.3 แสดงการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินในรา
ที่มา: ไมตรี สุทธจิตต์ (2531)

2.1.5 การเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซินภายในร่างกาย

อะฟลาท็อกซินเมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็ก ประมาณ 10-20% และจะถูกกำจัดออกจากร่างกายประมาณ 80-90% โดยจะถูกกำจัดออกทางมูลมากที่สุดคือประมาณ 50-60% และในปัสสาวะประมาณ 20-30% สำหรับอะฟลาท็อกซินที่อยู่ในอวัยวะต่างๆนั้นพบว่ามีการสะสมมากที่สุดในตับ และไต ส่วนในอวัยวะอื่นจะมีปริมาณต่ำกว่า 0.1% ดังนั้น อะฟลาท็อกซินจึงเป็นพิษต่อตับมากที่สุด และอะฟลาท็อกซินถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้เกือบหมดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะไม่มีการสะสมภายในร่างกาย เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาท็อกซินเข้าไปเพียงครั้งเดียว แต่อาจจะมีการสะสมได้เช่นกัน ถ้าหากได้รับอะฟลาท็อกซินเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่อง (อุรธิดา เพ็งปาน, 2543; Sawney, Vodehra and Baker, 1973; Shank and Wogan, 1965; Wogan, 1966) ภายหลังการถูกดูดซึม อะฟลาท็อกซินจะรวมตัวกับอัลบูมิน (albumin) ในซีรัม (serum) สารบางส่วนจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ น้ำดี และอุจจาระ บางส่วนจะถูกเก็บไว้ในเซลล์ตับ อะฟลาท็อกซิน B_1 จะถูกเปลี่ยนแปลงในไซโตซอล (cytosol) เป็นอะฟลาท็อกซิคอล (aflatoxicol) ในไมโครโซม (microsome) อะฟลาท็อกซิน B_1 จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะฟลาท็อกซินชนิด M_1, P_1, Q_1 และอิปอกไซด์ (epoxide) (รูปที่ 2.4) อะฟลาท็อกซิน 8, 9-อีปอกไซด์ (aflatoxin 8,-9 epoxide) จะมีความไวมาก สามารถรวมตัวกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนอย่างรวดเร็ว ได้ DNA adducts และ albumin adducts ตามลำดับ โดยกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ สามารถตรวจพบ AFB_1-N7-guanine และ AFB_1-serum albumin adduct ซึ่งเป็น biomarker ในเนื้อเยื่อและซีรัมของกลุ่มประชากรที่ได้รับอะฟลาท็อกซิน (Gaylor, Kadlubar and Beland, 1992; Groopman, Wild, Hasler, Junshi, Wogan and Kensler, 1993; Groopman, Wogan, Roebuck and Kenler, 1994; Shibamoto and Bjeldanes, 1993) เมื่ออะฟลาท็อกซินรวมตัวกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอผิดปกติ ปฏิกิริยาทางชีวภาพดังกล่าวจะถูกเร่ง หรือควบคุมโดยไซโตโครม P450 (cytochrome P450) และไซโตโครม B_5 (cytochrome B_5) ของกระบวนการมิกซ์ฟังก์ชันมอนออกซิจิเนส (mixed function monooxygenase) ในไมโครโซม เมื่อสารพิษอะฟลาท็อกซินรวมตัวกับดีเอ็นเอ หน้าที่ทางชีวภาพของดีเอ็นเอจะถูกเปลี่ยนแปลงทำให้เอนไซม์นิวคลิอิกแอซิดพอลีเมอเรส (nucleic acid polymerase)ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ การสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ จะหยุดชะงักลง (Ueno, 1983) ในสัตว์ทดลองการเกิด conjugation ของกลูตาไธโอน (glutathione) กับ 8,-9 อีปอกไซด์ ของอะฟลาท็อกซิน โดยการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอส-ทรานเฟอเรส (glutathione S-tranferase) เป็นกลไกสำคัญในการลดการเกิดเนื้องอก และลดความเสียหายของดีเอ็นเอ หนูถีบจักรมีความต้านทานต่อการเกิดมะเร็งด้วยอะฟลาท็อกซินสูงกว่าหนูขาวใหญ่ ซึ่งเกิดมะเร็งได้ง่ายกว่า

เนื่องจากหนูถีบจักรมีการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส มากกว่าหนูขาวใหญ่ ประมาณ 3-5 เท่า จึงทำให้หนูถีบจักรต้านพิษของอะฟลาท็อกซินได้มากกว่าหนูขาวใหญ่ ซึ่งเกิดมะเร็งง่ายกว่า ดังนั้นมนุษย์น่าจะมีการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส สำหรับคอนจูเกชัน 8,-9 อีปอกไซด์ของอะฟลาท็อกซิน น้อยกว่าหนูขาวใหญ่และหนูขาวเล็ก ซึ่งบ่งชี้ว่ามนุษย์มีความสามารถในการทำลายพิษของ 8,-9 อีปอกไซด์ของอะฟลาท็อกซินได้น้อย (ไมตรี สุทธจิตต์, 2543)



รูปที่ 2.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาท็อกซิน B_1 ภายในร่างกายสัตว์

ที่มา: Eaton, Ramsdell and Neal (1994)

2.1.6 ความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในหลอดทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษโดยวัดความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย ดังวิธีการทดสอบของเอมส์ (Ames' test) ใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* เป็นตัวทดสอบและอาศัยเอนไซม์มิกฟังก์ชันออกซิเดส จากตับหนู หรือ supernatant 9,000 g fraction (S-9 fraction) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเมทาโบลิซึม เลียนแบบปฏิกิริยาจริงที่เกิดขึ้นในตับของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เชื้อ *S. typhimurium* ที่นำมาใช้เป็นแบคทีเรียพันธุ์ใหม่ เช่น สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งต้องการกรดอะมิโนฮีสติดินสำหรับการเจริญเติบโต เนื่องจากสังเคราะห์ฮิสติดินเองไม่ได้ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีอะฟลาท็อกซิน เชื้อบางส่วนจะกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เดิม ซึ่งไม่ต้องการฮิสติดิน คือเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีฮีสติดิน ทำให้ทราบว่าเกิดการกลายพันธุ์ขึ้น จำนวนโคโลนีของเชื้อที่กลายพันธุ์กลับคืน (His^{+}, revertant colony) จะแปรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารพิษก่อกลายพันธุ์ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนโคโลนีเพิ่มมากกว่าค่าเปรียบเทียบซึ่งไม่มีสารพิษ แสดงถึงความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารพิษที่นำมาทดสอบ การทดสอบความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของอะฟลาท็อกซิน โดยการใช้แบคทีเรียเป็นการบอกความเป็นพิษทางชีวภาพของอะฟลาท็อกซินได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังใช้ *E. coli, Flavobacterium aurantiacu, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis* และ *Neurospora crassa* เป็นตัวทดสอบความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน มีรายงานว่าเมล็ดพืชที่ชอบขึ้นในน้ำ *Lepidium sativum* จะหยุดการงอกหรือหยุดการสร้างคลอโรฟิลล์เมื่อมีอะฟลาท็อกซิน เซลล์จากรากถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) จะมีรูปร่างโครโมโซมผิดปกติถ้าแช่ในสารละลายที่มีอะฟลาท็อกซิน ฤทธิ์ของกรดจิบเบอเรลลิกต่อเมล็ดฝ้าย ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α-amylase) จะลดลงโดยอะฟลาท็อกซิน การสังเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อใบเลี้ยงแตงกวาจะถูกยับยั้งโดยอะฟลาท็อกซิน เซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน เช่น เซลล์จากไตวัว เซลล์ตับ HeLa cells เซลล์จากตัวอ่อนของไก่หรือเป็ด เซลล์จากไฟโบรบลาส (fibroblast) ของหนู และเซลล์ลิมโฟซัยท์ (lymphocytes) จากคน อะฟลาท็อกซินสามารถยับยั้งการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟซัยท์ของคนต่อ phytohemagglutinin แสดงว่าอะฟลาท็อกซินลดความสามารถในการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน (ไมตรี สุทธจิตต์, วิบูลย์ รัตนาปนนท์, อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ, นภาพร โออริยกุล และทรงพรรณ หวังใจสุข, 2529; ไมตรี สุทธจิตต์, 2543; Said, Ross, Hamade, Matsumoto and Shank, 1999)

2.1.7 ความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในสัตว์ทดลอง

อะฟลาท็อกซินเป็นพิษในสัตว์ทดลองทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ค่า LD_{50} แตกต่างกันมากแล้วแต่ชนิดของสัตว์ทดลอง ลูกเป็ดเป็นสัตว์ที่ไวต่อความเป็นพิษอะฟลาท็อกซินมากที่สุด ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน

อะฟลาท็อกซิน	LD_{50} ลูกเป็ดอายุ 1 วัน (mg/kg น้ำหนักตัว)
B_1	0.36
G_1	0.78
B_2	1.17
G_2	3.45

ที่มา: ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช (2540)

ประเทศอังกฤษในปี พ.ศ. 2503 เกิดการตายของไก่งวงจำนวนมากด้วยโรค Turkey-X disease เนื่องจากกินอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน (Shibamoto and Bjeldanes, 1993) สัตว์ขนาดใหญ่ เช่นหนูพุก หนูตะเภา หนูแฮมสเตอร์ หมู แกะ วัว และลิง เมื่อได้รับอะฟลาท็อกซินจะมีพิษต่อตับ ตับจะอักเสบ มีไขมันคั่งในเซลล์ ตับแข็ง ท่อน้ำดีมีขนาดใหญ่มากขึ้น เลือดออกในตับและตายในที่สุด (ไมตรี สุทธจิตต์, 2543) ไก่ที่ได้รับอะฟลาท็อกซินจะมีอาการบวมน้ำ มีจุดไขมันในเซลล์ตับ ตับมีขนาดใหญ่ เซลล์ตับถูกทำลาย เกิดโรคกระดูกอ่อน ผิวหนังถลอก เนื้อยุ่ย เส้นเลือดฝอยเปราะ ทำให้เลือดออกตามอวัยวะภายใน ในสุกรจะเกิดอาการแท้ง ดีซ่าน โลหิตจาง เกิดมะเร็งตับ ภูมิต้านทานลด ในโคเกิดเนื้อตายเป็นจุดๆ ในตับ (fibrosis) เส้นเลือดฝอยเปราะ (พันธิพา พงษ์เพียจันทร์, 2539; มาลินี ลิ้มโภคา, 2527; ศุภกิจ อังศุภากร, 2526; ศุภกิจ อังศุภากรและคณะ 2520; อรุณศรี วงษ์อุไร, 2540) กลไกในการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของอะฟลาท็อกซินทำให้สารกลุ่มนี้โดยเฉพาะอะฟลาท็อกซิน B_1 จัดเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (มาลินี ลิ้มโภคา, 2527) ความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน มีพิษรุนแรงต่อตับ ทำให้เกิดโรคตับอักเสบที่รุนแรงในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งคน และทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ สัตว์แต่ละชนิดจะแสดงอาการและความไวต่ออะฟลาท็อกซินต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อายุของสัตว์ รวมทั้งสภาพแวดล้อมและปริมาณของอะฟลาท็อกซินที่ได้รับ พวกสัตว์ปีก เช่น เป็ด ไก่ ไก่งวง มีความไวต่อ อะฟลาท็อกซินมากที่สุด รองลงมาได้แก่ สุกร สุนัข ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) หนู และคน ส่วนสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความต้านทานต่ออะฟลาท็อกซินมากกว่าสัตว์อื่น ยกเว้นในลูกสัตว์เหล่านี้ซึ่งจะมีความไวต่อสารพิษอะฟลาท็อกซินมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัย (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2539)

2.1.8 ภาวะการเกิดพิษของอะฟลาท็อกซินในคน

อะฟลาท็อกซินเป็นสารก่อมะเร็งในตับของคนและสัตว์ ถ้ามีการบริโภคอาหารที่มีอะฟลาท็อกซิน อย่างต่อเนื่องจะมีผลในการทำลายตับ ซึ่งจัดเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่ถูกกระตุ้นโดยอะฟลาท็อกซิน ทำให้เกิดการสะสมของไขมันที่ตับ ถ้ามีปริมาณมากจะเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของตับจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลืองแดง ตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับ มะเร็งตับ และตายในที่สุด (อรุณศรี วงษ์อุไร, 2540; สุรีลักษณ์ รอดทอง, 2538) อะฟลาท็อกซินสามารถผ่านจากมารดาสู่ทารกในครรภ์โดยทางรกทั้งคนและสัตว์ และสามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อตัวอ่อนได้ เช่น การตายในครรภ์ การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ การเกิดทารกวิรูป และการเกิดเนื้องอกในตัวอ่อน (มุกดา ศรีสกุล, 2536)

อาการเป็นพิษเฉียบพลันเนื่องจากอะฟลาท็อกซินจะเกิดขึ้นเฉพาะในเด็ก ส่วนอาการพิษเรื้อรัง การเกิดไขมันมากในตับ (fatty liver) ตับอักเสบและเกิดพังผืดในตับ (liver fibrosis) ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatoma) พยาธิสภาพดังกล่าวจะเกิดขึ้นในผู้ใหญ่ เป็นการสะสมพิษทีละน้อยจนเกิดพิษขึ้นมา (ไมตรี สุทธจิตต์, 2543; Sutabhaha, Suttajit and Niyomca, 1992)

ในประเทศไทยมีรายงานการตายของเด็กทุกปีเนื่องจากผลของสารพิษอะฟลาท็อกซิน (Hayes, 1992) ตัวอย่างของการเกิดโรคที่รุนแรงเกิดเมื่อปี พ.ศ. 2511 มีรายงานการป่วยของเด็กอายุ 1-7 ปี ที่จังหวัดอุดรธานี พบว่าเด็กที่มีร่างกายแข็งแรงมีอาการป่วยอย่างเฉียบพลัน เริ่มจากมีไข้ ชัก ไม่รู้สึกตัว อาการทรุดลงอย่างรวดเร็ว และถึงแก่ความตายใน 48-72 ชั่วโมง จากการตรวจสอบเด็กที่เสียชีวิต พบว่าสมองบวม ตับโต ต่อมน้ำเหลืองบวม ไตและกล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ และพบอะฟลาท็อกซินและเมทาบอไลท์ของอะฟลาท็อกซินอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ของเด็กด้วย (สุรีลักษณ์ รอดทอง, 2538) โรคดังกล่าวมีอาการคล้ายกับอาการโรคไรย์ (Reye’s syndrome) ซึ่งกลุ่มอาการโรคไรย์ เป็นกลุ่มอาการของโรคที่เกิดขึ้นในเด็กก่อนวัยเรียนมีอาการปวดท้อง ตัวร้อน อาเจียน มักถึงแก่ชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง จากการตรวจศพพบสมองบวม ไขมันแทรกระหว่างเซลล์ของอวัยวะต่างๆ มีเลือดออกเป็นจุดเล็กๆ มีรายงานครั้งแรกจากจังหวัดอุดรธานี จึงเรียกว่า Udorn encephalopathy คล้ายกับอาการโรคไรย์ จากการตรวจสอบพบว่าเด็กรับประทานข้าวเหนียวนึ่งที่ค้างหลายวัน มีเชื้อราหลายสายพันธุ์ปนเปื้อน เมื่อนำอวัยวะของเด็กมาตรวจพบอะฟลาท็อกซินในปริมาณที่สูง (ทิพยา ปาณะโตษะ, ศิริวรรณ เอี่ยมรุ่งโรจน์, วารุณี เสนสุภา และทรงพล รัตนพันธุ์, 2530) นอกจากนั้นมีรายงานการพบประชากรในจังหวัดราชบุรี และนครปฐม เกิดมะเร็งที่ตับและตาย เนื่องจากบริโภคอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน (Shank, Bhamarapravati, Gordon and Wogan, 1972)

ในประเทศไต้หวันและอูกานดา มีรายงานอาหารที่เกิดจากความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน คือ อาเจียน ปวดท้อง ถุงลมโป่งพอง ตับแข็ง ประเทศอินเดียมีรายงานผู้ป่วยเสียชีวิต ด้วยอาการ

เลือดออกในระบบทางเดินอาหารเนื่องจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อรา (ดวงจันทร์ สุประเสริฐ, 2540)

2.2 ปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์

ภัทนีย์ เล็กศรีสมพงษ์ (2540) รายงานว่าวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่นำเข้าจากต่างประเทศและวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เพาะปลูกและเก็บเกี่ยวในประเทศไทย พบอะฟลาท็อกซินในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งปริมาณอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์ (ตารางที่ 2.3) มีดังนี้คือ

ตารางที่ 2.3 ผลการวิเคราะห์อะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในปี 2538 และ2539

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน (ppb)	
	ปี 2538	ปี 2539
ข้าวโพด	ND - <20	ND - 45
ข้าวฟ่าง	-	ND - 69
ปลายข้าว	ND - <2	<2-3
รำสด	7	2-4
รำสกัดน้ำมัน	2-13	ND - 32
กากมะพร้าว	-	8-560
รำข้าวสาลี	ND – 12	<2-10
กากฝ้าย	-	-
ถั่วนึ่ง	-	ND - 6
กากถั่วเหลืองไทย	2-39	ND - 5
กากถั่วเหลืองบราซิล	ND – 9	<2-3
กากถั่วเหลืองอินเดีย	ND - <2	ND - <2
กากถั่วเหลืองอเมริกา	<2-3	<2-6
กากถั่วลิสงอินเดีย	44-139	55-342
กากทานตะวันอาเยนตินา	2-18	<2-11
ปลาป่นเปรู	ND – 3	-

หมายเหตุ: ND = Non Detectable

ที่มา: ดัดแปลงจาก ภัทนีย์ เล็กศรีสมพงษ์ (2540)

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และคณะ (2540) รายงานว่าจากผลการวิเคราะห์วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ติดต่อกันมาเป็นระยะเวลา 22 ปี พบว่ากากถั่วลิสงที่ผลิตในประเทศมีปัญหาการปนเปื้อนของสารอะฟลาท็อกซินในระดับที่สูงมากคือ 200-1,500 พีพีบี (parts per billion, ppb)

ดังนั้นจึงเป็นปัญหามากในการนำกากถั่วลิสงที่ผลิตในประเทศมาใช้ในอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว โดยเฉพาะเป็ด ไก่ และสุกร ซึ่งกากถั่วลิสงส่วนใหญ่มักถูกนำมาใช้เป็นอาหารโคเนื้อและโคนม ในการสุ่มเก็บตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์จากโรงงานอาหารสัตว์ ฟาร์มสุกร และไก่ไข่ ทั้งจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง มาวิเคราะห์หาอะฟลาท็อกซิน (ตารางที่ 2.4) พบว่าข้าวโพดมีอะฟลาท็อกซินสูงมากในช่วงฤดูร้อน และฤดูฝน ปลายข้าวจะมีระดับของอะฟลาท็อกซินในปริมาณที่ต่ำ รำละเอียดในปี 2539 และปี 2540 มีอะฟลาท็อกซิน 68-186 ppb และ 48-210 ppb ตามลำดับ กากถั่วเหลืองที่ผลิตในประเทศและนำเข้านั้นมีอะฟลาท็อกซินในระดับใกล้เคียงกัน ปลาป่นที่ผลิตในประเทศและนำเข้าในปี 2540 มีอะฟลาท็อกซินสูง คือ 0-368 ppb และ 12-150 ppb ตามลำดับ กากถั่วลิสงในประเทศ และนำเข้าจากต่างประเทศ ในปี 2540 มีอะฟลาท็อกซิน 480-920 ppb และ 198-393 ppb ตามลำดับ ศรีสิทธิ์ การุณยะวณิช, ดวงจันทร์ สุประเสริฐ, อุมา บริบูรณ์, สุวัฒน์ โปษยะวัฒนากุล และนพาภรณ์ ปัญจะ (2538) ได้รวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์อะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นอาหารในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2525-2536 จำนวน 660 ตัวอย่าง พบว่าถั่วลิสงมีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินอยู่ในช่วง 0.1-3,528.7 ppb

ตารางที่ 2.4 ผลการวิเคราะห์อะฟลาท็อกซิน ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในปี 2539 และ 2540

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน (ppb)	
	ปี 2539	ปี 2540
ข้าวโพด	48-471	30-290
ปลายข้าว	ND - 20	ND – 60
รำละเอียด	68-186	48-210
กากถั่วเหลืองในประเทศ	10-36	12-42
กากถั่วเหลืองนำเข้า	0-34	0-31
ปลาป่นในประเทศ	0-39	0-368
ปลาป่นนำเข้า	12-54	12-150
กากถั่วลิสงในประเทศ	761-890	480-920
กากถั่วลิสงนำเข้า	286-368	198-393

หมายเหตุ: ND = Non Detectable

ที่มา: ดัดแปลงจาก เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และคณะ (2540)

ทางกรมปศุสัตว์ได้กำหนดค่าอาหารสัตว์ที่มีสารพิษอะฟลาท็อกซินมากกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดว่าเป็นอาหารสัตว์ที่เสื่อมคุณภาพ (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์ที่จัดว่าเป็นอาหารสัตว์ที่เสื่อมคุณภาพ

วัตถุดิบและอาหารสัตว์	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน (ppb)
กากถั่วเหลือง	<50
กากถั่วลิสง	<500
ปลาป่น	<40
รำละเอียด, รำหยาบ, รำสกัดน้ำมัน	<50
ข้าวโพดเมล็ด, ข้าวโพดป่น	<100
อาหารไก่	<50
อาหารเป็ด	<40
อาหารสุกร	<50
อาหารโค-กระบือ	<100

ที่มา: ดัดแปลงจาก กรมปศุสัตว์ (2539)

2.3 ปัจจัยที่ทำให้ราที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์สร้างสารพิษ มีดังนี้คือ

2.3.1 ชนิดของรา *A. flavus, A parasiticus* และ *A. nomius* จะสามารถสร้างอะฟลาท็อกซินได้ดี (Kurtzman, Horn and Hesseltine, 1987; Hocking, 1997; Steyn and Stander, 1999)

2.3.2 อุณหภูมิ ราสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 25-30 °C Ayerst (1969) พบว่า *A. parasiticus* และ *A. flavus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10-43 °C ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 32-33 °C และสารพิษอะฟลาท็อกซินจะถูกสร้างขึ้นมาในอุณหภูมิช่วงประมาณ 12-40 °C

2.3.3 pH ราจะสามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่กว้างคือตั้งแต่ 2-8.5 แต่ส่วนใหญ่มักชอบ pH ที่เป็นกรด (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539) Buchanan and Ayres (1976) พบว่า *A. parasiticus* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ได้ในช่วง pH 3.0-8.0 ซึ่ง pH 6 จะเป็น pH ที่เหมาะสม

2.3.4 ความชื้นและความชื้นสัมพัทธ์ ความชื้นมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของรา ถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูงจะทำให้ความชื้นสูงด้วย ความชื้นประมาณ 14-30% และความชื้นสัมพัทธ์ 80-100% ดังนั้นการเก็บวัตถุดิบอาหารสัตว์ ควรทำให้ความชื้นลดลงต่ำกว่า 13% และเก็บวัตถุดิบไว้ในที่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อรา

2.3.5 ก๊าซออกซิเจน ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษจากรา ถ้าลดปริมาณของออกซิเจน หรือเพิ่มปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้การเจริญเติบโตของราต่ำลง และลดปริมาณการสร้างสารพิษ ถ้าลดออกซิเจนโดยการบรรจุหีบห่อ หรือการใช้ oxygen scavengers จะสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาท็อกซิน จาก *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้ (Ellis *et al*., 1994, quoted in Hocking, 1997)

2.4 วิธีการตรวจหาปริมาณสารพิษจากรา

วิธีการตรวจหาปริมาณสารพิษจากราที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายยึดพื้นฐานของวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษที่สกัดได้จะแตกต่างกันขึ้นกับสารพิษ เช่น สารพิษบางชนิดมีคุณสมบัติเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต หรือสารบางชนิดจะทำปฏิกิริยากับสารที่ฉีดพ่นแล้วเกิดสี หรืออาจจะใช้วิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูงขึ้น เช่น วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Liquid Chromatography (GLC), และ Gas Chromatograph รวมกับ Mass Spectrometry (GC-MS) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาสารพิษที่ผลิตจากราโดยอาศัยปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยาด้วย แต่เนื่องจากสารพิษที่ผลิตจากราส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก ไม่ใช่โปรตีนที่มีขนาดใหญ่เหมือนสารพิษที่ผลิตโดยแบคทีเรียหลายๆ ชนิด จึงจำเป็นที่จะต้องเชื่อมโมเลกุลของสารพิษบางชนิดเข้ากับโปรตีน เช่น bovine serum albumin ในการพัฒนาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารพิษจากราเหล่านี้ ได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางซีรัมวิทยาในการตรวจหาสารพิษหลายชนิดที่สร้างจากรา เช่น อะฟลาท็อกซิน, อ็อคคราท็อกซิน และเซียราลีโนน โดยอาศัยเทคนิค radioimmunoassay (RIA) หรือเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งทำให้สามารถตรวจหาสารพิษเมื่อมีตัวอย่างอาหารที่ต้องการตรวจสอบเป็นจำนวนมากและสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว (สุรีลักษณ์ รอดทอง, 2538)

2.5 ผลของอะฟลาท็อกซินต่อสาธารณสุขและความปลอดภัย

สารพิษจากราที่ได้รับส่วนใหญ่มาจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อน ราและสารพิษที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ สามารถเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนในการผลิตอาหารสัตว์ วัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ในประเทศไทยได้จากการผลิตภายในประเทศ และนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งวัตถุดิบที่นำมาประกอบเป็นอาหารโคนมเหล่านี้อาจจะมีสารพิษจากราปนเปื้อน แม่โคที่ได้รับอาหารที่มีสารพิษจากราปนเปื้อนเป็นประจำจะมีโอกาสสูงที่จะถ่ายทอดสารพิษสู่น้ำนมได้ อาหารที่มีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินมักจะมีอะฟลาท็อกซิน B_1 สูงกว่าอะฟลาท็อกซินชนิดอื่น สารเมทาโบไลท์ของอะฟลาท็อกซินส่วนมากที่พบในร่างกาย จึงเป็นเมทาบอไลท์ที่มาจากอะฟลาท็อกซิน B_1 และสารที่มาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในร่างกายของสัตว์ การขับออกของสารเมทาบอไลท์ของอะฟลาท็อกซินทางน้ำนมนี้พบว่าเกิดขึ้นได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ได้กินอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน โดยอัตราการขับออกของอะฟลาท็อกซินจะขึ้นอยู่กับปริมาณอะฟลาท็อกซินที่ได้รับ เบญจมาศ มโหสถนันทน์ (2544) พบว่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมกับปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1:100 - 1:300 Van Egmond (1989) รายงานว่าปริมาณของอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ถูกขับออก

มาทางน้ำนมเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารที่แม่โคกินเข้าไป Marth (1990) รายงานว่าโคที่ได้รับอะฟลาท็อกซิน B_1 ปนเปื้อนในอาหารจะสามารถถ่ายทอดอะฟลาท็อกซิน M_1 ไปยังน้ำนมในอัตราส่วน 1-3% Devegowda, Raju, Afzali and Swamy (1998) รายงานว่าอัตราส่วนของปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ถูกขับออกทางน้ำนมต่อปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารที่ใช้เลี้ยงแม่โคมีค่าโดยเฉลี่ยประมาณ 1:65-100 เบญจมาศ มโหสถนันทน์ (2539) พบว่าแม่โคที่กินอาหารที่มีอะฟลาท็อกซิน B_1 ปนเปื้อนในปริมาณ 100 ไมโครกรัม (microgram, μg)/อาหาร 1 กิโลกรัม (kilogram, kg) จะให้น้ำนมที่มี อะฟลาท็อกซิน M_1 ปนเปื้อนในปริมาณ 1 ไมโครกรัม (microgram, μg)/ลิตร (liter, l) สุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์ (2540) พบว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซิน B_1 ปนเปื้อนตามธรรมชาติ จะมีการถ่ายทอดอะฟลาท็อกซิน M_1 ออกมากับน้ำนม ซึ่งจะมีค่า carry-over rate เฉลี่ย 2.01% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม ระยะการให้นมของแม่โค ปริมาณการให้นมของแม่โค และสรีรวิทยาของแม่โคแต่ละตัว (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2544) สุเทพ เรืองวิเศษ และเบญจมาศ มโหสถนันท์ (2539) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1ในน้ำนมดิบ และอะฟลาท็อกซิน M_1 ในอาหารที่ใช้เลี้ยงโคนม พบว่าความสัมพันธ์ขึ้นอยู่กับระยะการให้นมของแม่โค โดยมีอัตราส่วนเท่ากับ 0.02 ± 0.007 ในระยะแรกของการให้นม และลดลงตามลำดับจนถึง 0.007 ± 0.001 ในระยะหลังของการให้นม

การปนเปื้อนอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมเป็นสิ่งที่ควรให้ความสนใจและเฝ้าระวัง เพราะการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า อะฟลาท็อกซิน M_1 มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง โดยมีความรุนแรงของการก่อมะเร็งน้อยกว่าสารตั้งต้นของมัน คือ อะฟลาท็อกซิน B_1 ประมาณ 10 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าอะฟลาท็อกซิน M_1 มีพิษต่อสารพันธุกรรม และมีพิษต่อ ตับ ไต และระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองด้วย รัฐบาลของนานาประเทศได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของปัญหาจึงมีการควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในน้ำนม ผลิตภัณฑ์นม และในวัตถุดิบที่นำมาประกอบเป็นอาหารสัตว์ รวมทั้งกำหนดระดับปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมรับได้ (Maximum Residual Limit; MRL) ของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมขึ้น เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อน ในต่างประเทศ เช่น องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration, US FDA) กำหนดค่า MRL ของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมต้องไม่เกิน 0.5 μg/kg (ppb) และในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ต้องมีปริมาณอะฟลาท็อกซิน ไม่เกิน 20 ppb (Price, Lovell and Mc Chesney, 1993) ประเทศในสหภาพยุโรป กำหนดไว้ที่ระดับต่ำมากคือ 0.01-0.05 ppb สำหรับประเทศไทย ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการกำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม เพียงแต่ระบุไว้อย่างกว้างๆในประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เกี่ยวกับเรื่องมาตรฐาน

การปนเปื้อน กำหนดให้มีอะฟลาท็อกซินได้ไม่เกิน 20 μg/อาหาร 1 kg สำหรับนมและผลิตภัณฑ์นมซึ่งจัดเป็นอาหารควบคุมเฉพาะนั้นต้องไม่มีสารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และสำหรับอาหารโค กรมปศุสัตว์ (2539) ได้กำหนดค่ามาตรฐานปริมาณอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโค ต้องมีปริมาณไม่เกิน100 ppb ส่วนค่า MRL ที่เป็นมาตรฐานสากล ซึ่งกำหนดโดยคณะกรรมาธิการโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Committee) นั้นในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ตกลงที่แน่นอนว่าจะกำหนดที่ 0.05 หรือ 0.5 ppb (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2544) สำหรับปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่เป็นข้อกำหนดในบางประเทศในปัจจุบัน ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ข้อกำหนดอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนม และผลิตภัณฑ์นม ของประเทศต่างๆ

ประเทศ	**ชนิดของผลิตภัณฑ์**	**ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ต้องมีค่าน้อยกว่า**
สวิสเซอร์แลนด์	นมสด นมผง นมข้น ครีม	0.05
	นมสำหรับทารก	0.02
สหรัฐอเมริกา	นมสด นมพร่องมันเนย	0.5
รัสเซีย	นมสดและผลิตภัณฑ์นม	0.5
	อาหารเด็กอ่อน	0
สวีเดน	ผลิตภัณฑ์นม	0.05
เนเธอร์แลนด์	นมสด นมผง และอาหารทารก	0.05
เยอรมัน	นมสด	0.01
ฝรั่งเศส	นมสด นมผงสำหรับทารก	0.05
อาร์เจนตินา	นมสด นมผง	0.01
เบลเยี่ยม	นมสด	0.05
อียิปต์	นมสด ผลิตภัณฑ์นม	0.05
ไทย	นมสด ผลิตภัณฑ์นม	-

ที่มา: ญาณี วรรณสถิตย์, วนิดา ขาวเธียร, มยุรี เนาวรัตโนภาส และตรีรัตน์ รุ่งโรจน์ชัยพร (2534) และ Boutrif and Canet (1998)

2.6 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ตรวจพบในประเทศไทย

ในระหว่างปี พ.ศ. 2532-2534 สำนักคณะกรรมการอาหารและยา ได้นำตัวอย่างน้ำนมดิบจากเกษตรกร และตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ที่จำหน่ายตามท้องตลาด มาวิเคราะห์หาปริมาณ

อะฟลาท็อกซิน M_1 พบว่าน้ำนมดิบจากฟาร์มต่างๆ จำนวน 45 ตัวอย่าง ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1 จำนวน 12 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.15-0.80 ppb และนมพาสเจอร์ไรซ์ 15 ตัวอย่าง ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1 จำนวน 9 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.22-6.56 ppb (ญาณี และคณะ 2534) กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี และวัชราภรณ์ เจนสุริยะกุล (2539) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชที จำนวน 6 บริษัท บริษัทละ 3 รุ่นการผลิต พบการปนเปื้อนในช่วง 0.01-0.14 ppb อุมา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุประเสริฐ (2537) ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 และ M_2 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมต่างๆ ที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่าน้ำนมดิบที่เก็บจากฟาร์มทั้งหมด 45 ตัวอย่าง มี 12 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1 ในระดับ 0.15-0.8 ppb นมพาสเจอร์ไรซ์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มี 9 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1ในระดับ 0.22-6.56 ppb และนมผงธรรมดาทั้งหมด 11 ตัวอย่าง มีเพียง 1 ตัวอย่าง ที่พบอะฟลาท็อกซิน M_1ในระดับ 1.42 ppb สุเทพ เรืองวิเศษ (2541) ตรวจวิเคราะห์นมพาสเจอร์ไรซ์รสช็อคโกแลต 8 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิตและนมยูเอชที 5 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิตระหว่างเดือนธันวาคม 2538 ถึง กันยายน 2539 พบอะฟลาท็อกซิน M_1 ในปริมาณ น้อยกว่า 0.01–0.243 ppb สำหรับนมพาสเจอร์ไรซ์ และ น้อยกว่า 0.01-0.141 ppb สำหรับนมยูเอชที และไม่พบอะฟลาท็อกซิน B_1 ในน้ำนมทุกตัวอย่าง

2.7 แนวทางการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราในน้ำนมและวัตถุดิบอาหารสัตว์

การควบคุมและการป้องกันการปนเปื้อนของราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ให้ได้ผลดีนั้น จำเป็นที่จะต้องกระทำในหลายๆ ขั้นตอนนับตั้งแต่ การเพาะปลูกพืชไร่ การผลิตอาหารโคนม การเลี้ยงโคนม และยังต้องอาศัยความร่วมมือและความรับผิดชอบจากบุคลากรที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนดังกล่าวทั้งภาครัฐและเอกชน

การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบอาหารโคนมเป็นสิ่งสำคัญ ต้องเริ่มตั้งแต่การเพาะปลูกพืชไร่จนถึงการเก็บรักษาวัตถุดิบ (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2539; เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2540; Charmley, Threnholm and Prelusky, 1995) ขั้นตอนการควบคุมมีดังนี้คือ

2.7.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของพืชไร่ที่ดี มีความต้านทานต่อราสูง

2.7.2 การป้องกันศัตรูพืช การกำจัดแมลงศัตรูพืชเป็นวิธีการควบคุมที่สำคัญ เพราะแมลงพวกนี้สามารถเจาะทำลายเมล็ดธัญพืช และอาจเป็นตัวนำสปอร์ของราให้แพร่กระจายอย่างรวดเร็ว

2.7.3 การเก็บเกี่ยวต้องระมัดระวังการแตกหักของเมล็ดธัญพืช ไม่ให้ฝักหรือเมล็ดถูกทำลาย ตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูก เพราะเมล็ดและฝักที่สมบูรณ์ช่วยลดโอกาสที่ราจะเจริญแทรกตัวในเนื้อเยื่อได้

2.7.4 ความชื้นของวัตถุดิบ เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการเจริญเติบโตของรา การลดความชื้นในวัตถุดิบหลังการเก็บเกี่ยวจึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็น โดยทั่วไปแล้ว ความชื้นในข้าวโพดและในถั่วลิสงไม่ควรเกิน 13% และ 7% ตามลำดับ

2.7.5 สถานที่และสภาพโรงเรือนหรือยุ้งที่ใช้เก็บรักษาวัตถุดิบ ไม่ควรเปียกฝนหรือมีความชื้นสูงเพราะจะมีผลต่อความชื้นในวัตถุดิบด้วย

2.7.6 ควรทำการลอก แกะ หรือเคาะเอากากที่ติดกับผนังหรือก้นของไซโลออกให้หมดก่อนเติมวัตถุดิบใหม่ลงไป

2.7.7 ควรมีการสืบประวัติที่มาของวัตถุดิบ ระยะเวลาในการกักตุน รวมถึงปริมาณสารพิษในวัตถุดิบ วัตถุดิบที่เก่าและเก็บเป็นระยะเวลานานจะเป็นแหล่งสะสมของสารพิษมากกว่าวัตถุดิบที่สดหรือใหม่

การควบคุมการผลิตอาหารสัตว์ภายในโรงงาน ควรมีการตรวจการปนเปื้อนของสารพิษจากราในวัตถุดิบ และคัดส่วนที่ปนเปื้อนออกทิ้งก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต และมีการตรวจในอาหารสัตว์ที่ผลิตแล้วอีกครั้งก่อนออกจำหน่าย ซึ่งถ้าพบการปนเปื้อนก็ต้องคัดออกเช่นกัน

การควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษจากราในฟาร์มโคนม จะขึ้นอยู่กับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ดังนั้นเกษตรกรควรมีพื้นฐานความรู้และความเข้าใจเรื่องการปนเปื้อนสารพิษจากรา รู้จักการคัดเลือกซื้ออาหารสัตว์ หรือวัตถุดิบที่นำมาใช้ผสมเป็นอาหารข้น หรือทำเป็นอาหารหยาบ รวมทั้งวิธีในการเก็บรักษาอาหารสัตว์อย่างถูกต้อง เพื่อควบคุมความชื้นของอาหาร ซึ่งความรู้เหล่านี้เป็นสิ่งที่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนการเลี้ยงโคนม ควรจัดฝึกอบรมให้แก่เกษตรกร

การควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษจากราในน้ำนมดิบก่อนการแปรรูป ควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษจากรา เช่น อะฟลาท็อกซิน ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตหรือแปรรูป ถ้าพบการปนเปื้อนก็ควรคัดทิ้ง หรือถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ อาจเจือจางปริมาณสารพิษด้วยวิธีการที่เหมาะสม

ดังนั้นการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราจะต้องดำเนินการแบบครบวงจร โดยร่วมมือกันหลายฝ่าย ตั้งแต่เกษตรกรผู้เพาะปลูก ผู้ผลิตอาหารสัตว์ ผู้เลี้ยงสัตว์ และผู้ขายอาหารสัตว์

2.8 วิธีการที่ใช้ในการลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษจากรา

2.8.1 วิธีทางกายภาพ (Charmley *et al*., 1995; Yousef and Marth, 1986) มีดังนี้

2.8.1.1 การคัดเลือกเมล็ดพืช คัดเมล็ดที่มีรา หรือมีลักษณะลีบเล็ก น้ำหนักเบา และเปลี่ยนสีจากเดิม ออกจากกอง เพราะว่าเมล็ดที่มีลักษณะดังกล่าวมักจะมีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน การคัดเลือกอาจใช้เครื่องเป่า เพราะเมล็ดที่ถูกทำลายย่อมมีน้ำหนักเบากว่าปกติ

2.8.1.2 การต้ม การนึ่ง ภายใต้ความดันและการทอด อาจลดระดับอะฟลาท็อกซินได้บ้าง แต่ต้องใช้ระยะเวลานาน และสภาวะที่เหมาะสม อะฟลาท็อกซินที่บริสุทธิ์ จะถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่ายกว่าอะฟลาท็อกซินที่ปนอยู่ในอาหาร อะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมสามารถคงทนต่อกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และการเก็บแช่ในตู้เย็นได้ดี

2.8.1.3 วิธีพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 ^{0}C นาน 30 นาที สามารถลดปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมได้ 30% และที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C นาน 45 นาที สามารถลดปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ได้ 45% (Purchase and Steyn, 1972)

2.8.1.4 การใช้แสงอัลตราไวโอเลต โรงงานอาหารสัตว์บางแห่งใช้วิธีตรวจหาอะฟลาท็อกซินโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตบนเมล็ด และคัดเลือกเมล็ดที่เรืองแสงสีเขียวหรือสีฟ้าออก ในกรณีนี้ใช้ได้เฉพาะเมล็ดที่มีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในปริมาณสูงและอยู่ที่ผิวของเมล็ดเท่านั้น การฉายแสงอัลตราไวโอเลตช่วยลดความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน และทำลายอะฟลาท็อกซินในน้ำนมได้

2.8.1.5 การร่อนเมล็ดธัญพืชเพื่อขจัดเศษฝุ่นละอองออก และการล้าง จะเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถกำจัดสารพิษออกจากเมล็ดธัญพืชได้ แต่วิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดก็คือการเผา ให้เมล็ดพืชผ่านเปลวไฟ แต่ต้องมีการออกแบบเครื่องเผาเป็นพิเศษ วิธีการนี้มีข้อดีคือ ช่วยให้เมล็ดธัญพืชแห้งสนิท

2.8.2 วิธีทางชีววิทยา มีดังนี้

2.8.2.1 การใช้ steroid-hydroxylating fungi และ *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะฟลาท็อกซิน และอ็อคคราท็อกซิน เอ ให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษได้ (Erber and Roxas, 1995, quoted in Devegowda *et al*.,1998)

2.8.2.2 การใช้ *Rhizopus oligosporus* คุษณี ธนะบริพัฒน์, พนอ รวยสูงเนิน, สายชล นุชน้อง และ เหมือนหมาย จันทราพันธกุล (2539) พบว่าถั่วเหลืองนึ่งที่เติมสปอร์ของ *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาท็อกซินของรา *A. parasiticus* ได้ในระหว่างการผลิต

เทมเป้ กนิษฐา สังคะหะ (2536) พบว่าราสายพันธุ์ *Rhizopus* sp. - F135, *Rhycomycetes* group - F135 และ *Trichoderma* sp. - ES 136 มีประสิทธิภาพในการลดและสลาย อะฟลาท็อกซิน

2.8.2.3 การใช้ *Flavobacterium aurantiacum* 7.0 x 10^{10} เซลล์ (cells)/มิลลิลิตร (milliliter, ml) สามารถดูดซับ อะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนม 9.9 μg/ml หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{0} C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Lillehoj, Stubblefield, Shannon and Shotwell, 1971, quoted in Doyle, Applebaum, Brackett, and Marth, 1982)

2.8.2.4 การใช้ lactic acid bacteria สามารถดูดซับอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ปนเปื้อนใน phosphate buffered saline (PBS) ได้ (Pievides, El-Nezami, Peltonen, Salminen, and Ahokas, 2000)

2.8.3 วิธีทางเคมี มีดังนี้

2.8.3.1 การใช้ แคลเซียมโพรพิโคเนต (calcium propiconate) 0.25% หรือ 0.5% ของอาหารโดยน้ำหนัก ช่วยลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ ที่ได้รับอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 50 หรือ 100 ppb ได้ มีผลให้ไม่พบสารตกค้างที่ตับ ไต หรือ กล้ามเนื้อของไก่ (อนงค์ บิณฑวิหค, ประพิศ คล้ายนิล, รัมภา อินทรรักษา และ สมบูรณ์ สุธีรัตน์, 2534)

2.8.3.2 การใช้ แอมโมเนียมคาร์บอเนต (ammonium carbonate) 3% และ 5% โดยน้ำหนัก สามารถลดปริมาณ อะฟลาท็อกซิน B_1 515-645 ppb ในถั่วลิสงคั่วป่นได้ถึง 64-69% และลดปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 160 ppb ในเมล็ดข้าวโพดได้ 59-81.5% แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) 5% โดยน้ำหนัก สามารถลดปริมาณ อะฟลาท็อกซิน B_1 ในข้าวโพดและถั่วลิสงได้ 60 และ 54% ตามลำดับ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (calcium hypochlorite) 3% โดยน้ำหนัก ลดปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ได้ถึง 60% (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2529)

2.8.3.3 การใช้ กรดเบนโซอิก (benzoic acid) กรดโพรพิออนิก (propionic acid) และแอมโมเนียมเบนโซเอต (ammonium benzoate) ที่เข้มข้นมากกว่า 40, 50 และ 70 mg% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของไมซีเลียม (mycelium) ของรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* และการสร้างอะฟลาท็อกซินได้ถึง 100% ทั้งในอาหารสังเคราะห์และถั่วลิสง (ไมตรี สุทธจิตต์, พงศ์สวาท นิยมค้า, นภาพร โออริยกุล, ทรงพรรณ หวังใจสุข และ นันทฤทธ์ โชคถาวร, 2536)

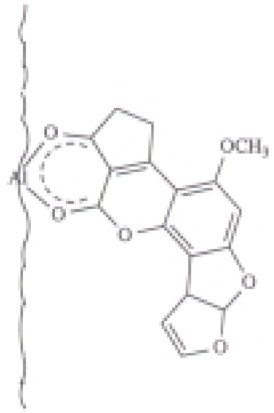
2.9 ผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา ชนิดของผลิตภัณฑ์ดูดซับที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

2.9.1 สารดูดซับ aluminosilicate

สารดูดซับสารพิษจากรากลุ่ม hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) เป็นสารที่มีองค์ประกอบภายในโครงสร้างโมเลกุลเป็น open tertiary structure โดยมีสารเคมีกลุ่มอัลคาไลน์ (alkaline) และอัลคาไลน์ เอิร์ท (alkaline earth) จับกันอยู่ภายในโครงสร้าง และมีโมเลกุลของน้ำจับกันอยู่ภายในช่องว่างของโครงข่ายที่จะหลุดออกโดยง่ายเมื่อได้รับความร้อน คุณสมบัติที่สำคัญคือสารกลุ่มนี้มีผิวหน้าที่ดูดซับสารโมเลกุลอื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่ได้ และสามารถแลกเปลี่ยนประจุบวกขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ ที่ตำแหน่ง active site โดยผ่านกระบวนการด้วยแรงไฟฟ้าสถิต หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ นอกจาก HSCAS มีความสามารถในการดูดซับสารพิษจากราได้แล้ว สารประกอบกลุ่มนี้ยังไม่ทำอันตรายต่อสัตว์ สัตว์สามารถขับออกมากับระบบขับถ่ายของเสียของสัตว์ได้ด้วย ดังนั้นการใช้สารดูดซับสาร HSCAS จึงน่าจะเป็นแนวทางในการลดปัญหาการปนเปื้อนสารพิษจากราได้ด้วยการผสมในอาหารสัตว์ (อรประพันธ์ พุ่มอินทร์ และ สุกัญญา จัตตุรพรพงษ์, 2536)

สารประกอบ HSCAS ได้แก่ clay mineral หรือ phyllosilicates มีสูตรทางเคมีดังนี้ $K_4Na_4Ca\text{-}(AlO_2)_{16}(SiO_2)_{30}.24H_2O$ และ zeolitic minerals มีสูตรเคมีดังนี้คือ Na, Ca, Zn, Mg, K-$(AlO_2)_{12}(SiO_2)_{12}.27H_2O$ ซึ่ง clay และ zeolitic minerals สร้างจากกลุ่ม aluminosilicate เช่นเดียวกัน แต่มีคุณสมบัติแตกต่างกันเนื่องจากองค์ประกอบในโครงสร้างต่างกัน (Phillips, Kubena, Harvey, Taylor and Heidelbaugh, 1988)

จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ พบว่า หมู่ไดคาร์บอนิล (dicarbonyl) ของอะฟลาท็อกซินเป็นส่วนสำคัญในการจับกับผิวของอนุภาค HSCAS ได้หลายบริเวณ (ไมตรี สุทธจิตต์, 2543) (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 แสดงการจับตัวระหว่างหมู่ไดคาร์บอนิล ของอะฟลาท็อกซิน กับผิวของ HSCAS

จากการศึกษาของ Phillips *et al.* (1988) พบว่า aluminas, silicas และ aluminosilicates สามารถดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ใน *in vitro* ได้ Kubena *et al.* (1993) ใช้สาร HSCAS 0.5% โดยน้ำหนัก ผสมในอาหารที่มีสารพิษอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน 3.5 mg/kg จะสามารถลดปริมาณอะฟลาท็อกซินได้ Kubena, Harvey, Phillips, Corrier and Huff (1990) พบว่า HSCAS 0.5% โดยน้ำหนักสามารถลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ได้ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน 7.5 mg/kg

Harvey, Phillips, Ellis and Kubena (1991) พบว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 200 μg/kg พบอะฟลาท็อกซิน M_1 ตกค้างในน้ำนมในปริมาณ 1.85 μg/l หลังจากนั้นให้โคได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 200 μg/kg ที่ผสม HSCAS ในระดับ 0.5% โดยน้ำหนัก เมื่อนำน้ำนมโคมาตรวจหาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 พบว่าอะฟลาท็อกซิน M_1 ตกค้างในปริมาณ 1.41 μg/l ระดับอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมลดลงเฉลี่ย 24% และโคที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 100 μg/kg ที่ผสม HSCAS ในระดับ 1% โดยน้ำหนัก จะสามารถลดระดับอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมลดลงเฉลี่ย 44% Smith *et al.* (1994) พบว่าแพะที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 200 μg/kg ที่ผสม HSCAS 4% โดยน้ำหนัก จะสามารถลดระดับของอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ตกค้างในน้ำนมได้ถึง 86.9% ถ้าผสม HSCAS 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน 100 μg/kg สามารถลดระดับของอะฟลาท็อกซิน M_1 โดยเฉลี่ย 51.9% (จาก 0.553 ppb เป็น 0.266 ppb) และผสม HSCAS 2% โดยน้ำหนัก ในอาหารที่มีอะฟลาท็อกซิน ปนเปื้อน 100 μg/kg สามารถลดระดับของอะฟลาท็อกซิน M_1 โดยเฉลี่ย 82.2% (จาก 0.553 ppb เป็น 0.098 ppb)

2.9.2 Mannanoligosaccharide (MOS)

สารที่ได้จากการสกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannanoligosaccharide) ได้แก่ กลูโคแมนแนน (glucomannan) มีคุณสมบัติในการจับตัวกับสารพิษจากราได้ และให้ผลดีทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง สารดังกล่าวได้แก่ Mycosorb หรือ Bio-Mos ซึ่งสกัดได้จากผนังเซล์ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Devegowda, Aravind and Morton, 1996; Devegowda *et al.*, 1998) การใช้ mannanoligosaccharide (MOS) สามารถลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ได้ (Devegowda *et al.*, 1998)

2.9.3 ยีสต์

การใช้ *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) เติมในอาหาร 0.1% สามารถลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน ในไก่ที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 5 mg/kg (Stanley, Ojo, Woldesenbet and Hutchison, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Devegowda *et al.* (1996) ใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซิน ในไก่ที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน

ยีสต์จากกระเพาะโคก็น่าจะมีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน ยีสต์จากกระเพาะโคที่ได้ทำการคัดแยกจาก rumen fluid พบยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei, C. albican, C. tropicalis, C. rugosa, C. parapsilosis, C. valida, C. ingens, Trichosporon cutaneum, T. sericeum, T. capitatum, Rhodotorula glutinis, R. mucilaginosa, R. macerans, Torulopsis pintolopseii, Kluyveromyces bulgaricus, Saccharomycopsis lipolytita, Hansenula fabianii* และ *Pichia* (Clark and di Menna, 1961; Lund, 1974)

นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆที่มีความสามารถในการดูดซับสารพิษจากราชนิดต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.7 ดังนี้

ตารางที่ 2.7 ชนิดของสารดูดซับในการจับกับสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ประเภทต่างๆ

ชนิดของสาร	สารพิษที่จับ (ตามชนิดอาหารสัตว์)
อัลฟัลฟ่า	เซียราลีโนน (หนู,สุกร), ที-ทู ท็อกซิน (หนู)
น้ำมันคาโนล่า-ผงดินเหนียว	ที-ทู ท็อกซิน (หนู)
ซีโอไลท์ (สังเคราะห์)	เซียราลีโนน (หนู)
ผงถ่าน	อ็อคคราท็อกซิน, ที-ทูท็อกซิน (หนู), อะฟลาท็อกซิน (ไก่)

ที่มา: Trenholm, Charmley and Prelusky (1996)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบก่อนการแปรรูป น้ำนมดิบหลังการแปรรูป และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม การทดลองมีแผนการดำเนินงานวิจัย ดังนี้คือ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1.1 การสุ่มตัวอย่างอาหารโคนมสำเร็จรูป* จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 1 ตัวอย่าง

1) จากฟาร์มโคนมขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.)

2) จากฟาร์มโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) จากฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อย เขตอำเภอขามทะเลสอ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 4 ฟาร์ม

3.1.1.2. การสุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน** จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 1 ตัวอย่าง

1). จากฟาร์มโคนมของ อสค.

2) จากฟาร์มโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3) จากฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อย เขตอำเภอขามทะเลสอ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 4 ฟาร์ม

3.1.1.3 การสุ่มตัวอย่างน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน** จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 1 ตัวอย่าง

---

* การสุ่มตัวอย่างอาหารโคนม สุ่มจากหลายกระสอบที่ใช้ในการเลี้ยงโคนมจากชุดการผลิตเดียวกัน นำมาผสมรวมกัน (pooled sample) แล้วทำการสุ่มอีกครั้ง (sub-sampling) ให้เป็น 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด (representative sample) ในชุดการผลิตเดียวกัน (Suksombat, 1993)

** การสุ่มตัวอย่างน้ำนม สุ่มจากหลายถังจากชุดการผลิตเดียวกัน นำมาผสมรวมกัน (pooled sample) แล้วทำการสุ่มอีกครั้ง (sub-sampling) ให้เป็น 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด (representative sample) ในชุดการผลิตเดียวกัน (Suksombat, 1993)

1) จากฟาร์มโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.1.4 การสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่มที่วางขายตามท้องตลาด สุ่มเก็บตัวอย่าง จำนวน10 ยี่ห้อ จากบริษัทที่แตกต่างกัน ยี่ห้อละ 1 ตัวอย่าง

ในการสุ่มตัวอย่างจะเลือกสุ่ม อาหารโคนม น้ำนมดิบก่อนการแปรรูป และน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน จากชุดที่มีขั้นตอนการผลิตเดียวกัน สำหรับผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่วางขายตามท้องตลาด สุ่มจากชุดการผลิตเดียวกัน จำนวน 2 กล่อง กล่องละ 2 ซ้ำ

นำตัวอย่างอาหารโคนม มาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานของ AOAC (Scott, 1990) และตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนการแปรรูป หลังการแปรรูปด้วยความร้อน และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม มาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ของกองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (อุษา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุประเสริฐ, 2537)

3.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานของ AOAC (Scott, 1990)

3.1.2.1 เครื่องมือ

1) เครื่อง HPLC ของบริษัท Thermo Separation Products (TSP) ซึ่งประกอบไปด้วย pump รุ่น P4000, เครื่องฉีดอัตโนมัติ (auto-injection) รุ่น AS3000 และ fluorescence detector รุ่น FL3000 (รูปที่3.1)

2) Liquid chromatography column ชนิด reversed phase column C18 Spherisorb 5 ODS 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร (millimeter, mm) x ความยาว 25 เซนติเมตร (centimeter, cm) ของบริษัท Waters Spherisorb

3) Chromatography column

4) เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.2.2 สารเคมี

1) สารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 (บริษัท Sigma)

2) Chloroform

3) Anhydrous sodium sulphate

4) Silica gel 60 ขนาด 0.063-0.2 mm

5) Hexane

6) Diethyl ether

7) Methanol

8) Benzene

9) Acetonitrile

10) Trifluoroacetic acid (TFA) ความเข้มข้น 98%

11) Diatomaceous earth

รูปที่ 3.1 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

3.1.2.3 การสกัดอะฟลาท็อกซิน B_1

1) นำตัวอย่างอาหารโคนมมาบดให้ละเอียด

2) ชั่งอาหารโคนม 50 กรัม (gram, g) ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml

3) เติมน้ำ 25 ml ใส่ diatomaceous earth 25 g

4) เติม chloroform 250 ml

5) ปิดขวดให้สนิทนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 นาที

6) กรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารที่สกัดได้ 50 ml นำไปผ่าน chromatography column เพื่อชะล้างสารที่สกัดได้ให้สะอาด

3.1.2.4 การชะล้างสารที่สกัดให้สะอาดด้วย chromatography column

การเตรียม column

1) ใช้ chromatography column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm ความยาว 300 mm ที่มี stopcock บุปลายล่างของ column ด้วยสำลี

2) เติม chloroform ประมาณครึ่ง column

3) ใส่ anhydrous sodium sulphate 5 g เพื่อรองรับ silica gel

4) ใส่ silica gel 10 g กวนให้เข้ากันกับ chloroform

5) ชะล้าง silica gel ที่ติดอยู่ข้าง column ด้วย chloroform ปล่อยให้ silica gel ตกลงสู่ก้นของ column เมื่ออัตราเร็วของการตกตะกอนของ silica gel ลดลง ปล่อย chloroform ไหลออกจนอยู่เหนือระดับของชั้น silica gel ประมาณ 5-7 cm

6) ใส่ anhydrous sodium sulphate 15 g

7) ปล่อยให้ chloroform ไหลออกจนอยู่เหนือระดับของ anhydrous sodium sulphate ประมาณ 1 cm

การชะล้าง column

1) นำตัวอย่างสารที่สกัดได้ 50 ml ผ่าน column

2) ล้าง column ด้วย hexane 150 ml ปล่อยให้สารชะล้างออกจนหมด

3) เติม diethyl ether 150 ml ปล่อยให้สารชะล้างออกจนหมด

4) ชะล้างอะฟลาท็อกซิน B_1 ออกจาก column โดยใช้สารผสมระหว่าง chloroform: methanol (97:3 v/v) 150 ml เก็บสารที่ถูกชะออกจาก column จนหมด

5) นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือด ลดปริมาตรจนเกือบแห้ง

6) ล้างด้วย chloroform ถ่ายลงสู่หลอดแก้วขนาดเล็ก แล้วระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

7) เติม 98% TFA 50 ไมโครลิตร (microliter, μl) ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

8) เติม methanol 1 ml ถ่ายลงสู่หลอดแก้วขนาดเล็ก เพื่อเตรียมวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1

3.1.2.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

การเตรียม mobile phase

1) เตรียม 0.05% TFA: acetonitrile: methanol (65:20:15 v/v/v) โดยใช้ปริมาณสารดังนี้ ปิเปต 98% TFA 0.5 ml ใส่ในน้ำกลั่น 1,000 ml ใช้ปริมาตร 650 ml: acetonitrile 200 ml: methanol 150 ml

2) นำ mobile phase ไปกรองผ่านชุดกรองสารละลายขนาดอนุภาค 0.45 μm

การปรับตั้งค่าของเครื่อง HPLC

1) เตรียม column ชนิด reversed phase column C18 Spherisorb 5 ODS 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm x ความยาว 25 cm ต่อเข้ากับเครื่อง HPLC

2) ตั้งค่า flow rate ของ mobile phase 1 ml/min

3) ล้าง column ด้วย mobile phase ประมาณ 5 ชั่วโมง

4) ตั้งค่า fluorescence detector ตรวจวัดที่ excitation wavelength 364 nm และ emission wavelength 424 nm

5) ระยะเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1

1) ละลายสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 1 mg ใน benzene: acetonitrile (98:2 v/v) ปริมาตร 100 ml ทำให้สารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 มีความเข้มข้น 10 μg/ml

2) ปิเปต สารละลายมาตรฐาน 20 μl ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

3) เติม 98% TFA 50 μl ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

4) ละลายสารละลายมาตรฐานด้วย methanol 2 ml ได้สารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้น 100 ppb

5) เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ10 ppb ในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้นละ 1 ml โดยวิธีการเจือจางจากสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 ตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 100 ppb ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 (ppb)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 ตั้งต้น 100 ppb (μl)	ปริมาตร methanol (μl)
2	20	980
4	40	960
6	60	940
8	80	920
10	100	900

การฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC

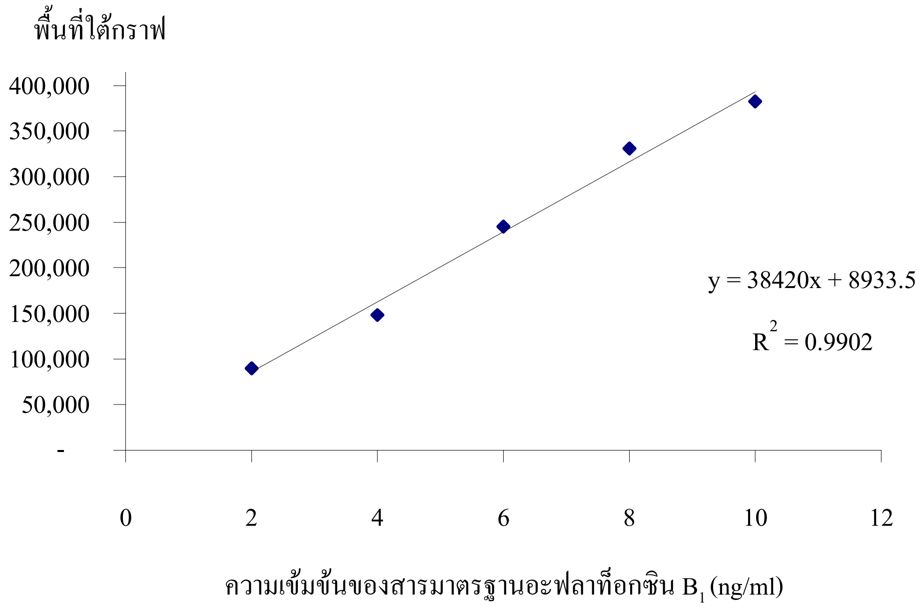
1) ฉีดสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 ความเข้มข้นละ 40 μl สารละลายมาตรฐานถูกชะล้างออกมาที่เวลา 9 นาที

2) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานมาคำนวณค่าสมการในการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในตัวอย่าง

3) ฉีดสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ตัวอย่างละ 40 μl

4) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ในแต่ละตัวอย่างมาคำนวณเปรียบเทียบกับ ค่าสมการพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 (รูปที่ 3.2)

5) วิธีการสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 มีค่า % recovery มีค่าเท่ากับ 76%



รูปที่ 3.2 standard curve ของสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1

3.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ของกองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (อุษา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุประเสริฐ, 2537)

3.1.3.1 เครื่องมือ

1) เครื่อง HPLC ของบริษัท Thermo Separation Products (TSP) ซึ่งประกอบด้วย pump รุ่น P4000, เครื่องฉีดอัตโนมัติ (auto-injection) รุ่น AS3000 และ fluorescence detector รุ่น FL3000

2) Liquid chromatography column ชนิด reversed phase column C18 Spherisorb 5 ODS 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm x ความยาว 25 cm ของบริษัท Waters Spherisorb

3) Chromatography column

4) เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.3.2 สารเคมี

1) สารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 (บริษัท Sigma)

2) Chloroform

3) Anhydrous sodium sulphate

4) Silica gel 60 ขนาด 0.063-0.2 mm

5) Hexane

6) Diethyl ether

7) Methanol

8) Benzene

9) Acetonitrile

10) Sodium chloride

11) Acetic acid

12) Toluene

3.1.3.3 การสกัดอะฟลาท็อกซิน M_1 นำตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน น้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม สกัดอะฟลาท็อกซิน M_1 ดังนี้

1) นำตัวอย่างน้ำนม 50 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2) เติม sodium chloride 1 g และ chloroform 120 ml

3) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งให้แยกชั้น (ถ้าเกิด emulsion นำไป centrifuge ที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที)

4) ปิเปตส่วนใสที่อยู่ชั้นล่าง ซึ่งเป็นชั้นของ อะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ถูกสกัดโดย chloroform นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง

5) ปิเปตสารที่กรองได้ 10 ml นำไปผ่าน chromatography column เพื่อชะล้างสารที่สกัดได้ให้สะอาด

3.1.3.4 การชะล้างสารที่สกัดให้สะอาดด้วย chromatography column

การเตรียม column

1) ใช้ chromatography column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm x ความยาว 300 mm ที่มี stopcock บุปลายล่างของ column ด้วยสำลี

2) เติม chloroform: hexane (1: 1 v/v) ประมาณครึ่ง column

3) ใส่ anhydrous sodium sulphate 2 g เพื่อรองรับ silica gel

4) ใส่ silica gel 10 g กวนให้เข้ากันกับ chloroform: hexane ที่อยู่ภายใน column

5) ชะล้าง silica gel ที่ติดอยู่ข้าง column ด้วย chloroform: hexane (1: 1 v/v) ปล่อยให้ silica gel ตกลงสู่ก้นของ column เมื่ออัตราเร็วของการตกตะกอนของ silica gel ลดลง ปล่อย chloroform ไหลออกจนอยู่เหนือระดับของชั้น silica gel ประมาณ 5-7 cm

6) ใส่ anhydrous sodium sulphate 3 g

7) ปล่อย chloroform: hexane ไหลออกจนอยู่เหนือระดับของ anhydrous sodium sulphate ประมาณ 1 cm

การชะล้าง column

1) นำตัวอย่างสารที่สกัดได้ 10 ml ผ่าน column

2) เติม toluene: acetic acid (9: 1 v/v) 30 ml ปล่อยให้ชะล้างออกจนหมด

3) เติม hexane 30 ml ปล่อยให้ชะล้างออกจนหมด

4) เติม hexane: diethylether: acetone (5: 4: 1 v/v/v) 30 ml ปล่อยให้ชะล้างออกจนหมด

5) ชะล้างด้วย chloroform: acetone (4: 1 v/v) 60 ml เก็บสารที่ถูกชะออกจาก column จนหมด

6) นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือด ลดปริมาตรจนเกือบแห้ง

7) ชะล้างด้วย methanol 1 ml ถ่ายลงสู่หลอดแก้วขนาดเล็ก เพื่อเตรียมวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1

3.1.3.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

การเตรียม mobile phase

1) เตรียม mobile phase อัตราส่วน น้ำกลั่น: acetonitrile: methanol (68: 24: 8 v/v/v) ดังนี้ น้ำกลั่น 680 ml acetonitrile 240 ml และ methanol 80 ml

2) นำ mobile phase ไปกรองผ่านชุดกรองสารละลายขนาดอนุภาค 0.45 μm

การปรับตั้งค่าของเครื่อง HPLC

1) เตรียม column ชนิด reversed phase column C18 Spherisorb 5 ODS 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm x ความยาว 25 cm ต่อเข้ากับเครื่อง HPLC

2) ตั้งค่า flow rate ของ mobile phase 1 ml/min

3) ล้าง column ด้วย mobile phase ประมาณ 5 ชั่วโมง

4) ตั้งค่า fluorescence detector ตรวจวัดที่ excitation wavelength 360 นาโนเมตร (nanometer, nm) และ emission wavelength 440 nm

5) ระยะเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1

1) ละลายสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 1 mg ใน benzene: acetonitrile (9: 1 v/v) ปริมาตร 100 ml ทำให้สารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 มีความเข้มข้น 10 μg/ml

2) ปิเปต สารละลายมาตรฐาน 20 μl ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

3) เติม 98% TFA 50 μl ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

4) ละลายสารละลายมาตรฐานด้วย methanol 2 ml ได้สารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้น 100 ppb

5) เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ10 ppb ในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้นละ 1 ml โดยวิธีการเจือจางจากสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 ตั้งต้น ที่มีความเข้มข้น 100 ppb ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 ตั้งต้น 100 ppb (μl)	ปริมาตร methanol (μl)
2	20	980
4	40	960
6	60	940
8	80	920
10	100	900

การฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC

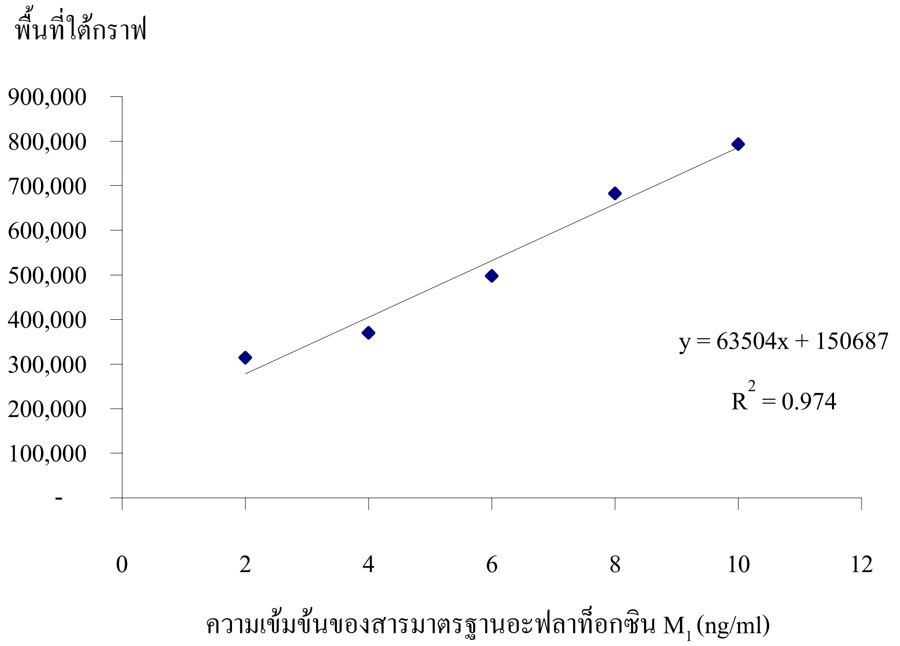
1) ฉีดสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 ความเข้มข้นละ 40 μl สารละลายมาตรฐานถูกชะล้างออกมาที่เวลา 7 นาที

2) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานมาคำนวณค่าสมการในการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในตัวอย่าง

3) ฉีดสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ตัวอย่างละ 40 μl

4) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ในแต่ละตัวอย่างมาคำนวณเปรียบเทียบกับ ค่าสมการพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1 (รูปที่ 3.3)

5) วิธีการสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 มีค่า % recovery มีค่าเท่ากับ 74%



รูปที่ 3.3 standard curve ของสารมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน M_1

3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม และปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน นำมาคำนวณหา % การถ่ายทอด (% carry over) ของอะฟลาท็อกซินจากอาหารสู่น้ำนม ดังนี้

% carry over = (ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1/ ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1) x 100

ข้อมูลปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมก่อนการแปรรูปและปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน นำมาคำนวณหา % carry over ของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมก่อนการแปรรูปสู่น้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน ดังนี้

% carry over = (ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน/ ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมก่อนการแปรรูป) x 100

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จัดกลุ่มการทดลองแบบ factorial 4 x 2 โดยมีปัจจัยที่หนึ่ง คือผลิตภัณฑ์ดูดซับ aluminosilicate 0.25 g MOS 0.25 g ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml และยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml (aluminosilicate, MOS และยีสต์ทางการค้า เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าของบริษัทแห่งหนึ่ง) และปัจจัยที่สอง คือระดับ pH 5.8 และ 6.8 ที่ระดับความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 100 นาโนกรัม (nanogram, ng)/ml ที่เจือปนในอาหารโคนม 50 g อุณหภูมิ 39 ^{0}C ระยะเวลา 2 วัน โดยมีจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำต่อหนึ่งกลุ่มการทดลอง ดังสรุปไว้ในตารางที่ 3.1 และมีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่ 1 การดูดซับโดยใช้ aluminosilicate เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8

กลุ่มที่ 2 การดูดซับโดยใช้ aluminosilicate เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 6.8

กลุ่มที่ 3 การดูดซับโดยใช้ MOS เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8

กลุ่มที่ 4 การดูดซับโดยใช้ MOS เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 6.8

กลุ่มที่ 5 การดูดซับโดยใช้ยีสต์ทางการค้า เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8

กลุ่มที่ 6 การดูดซับโดยใช้ยีสต์ทางการค้า เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 6.8

กลุ่มที่ 7 การดูดซับโดยใช้ยีสต์จากกระเพาะโค เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8

กลุ่มที่ 8 การดูดซับโดยใช้ยีสต์จากกระเพาะโค เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 6.8

ตารางที่ 3.3 แผนการศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

ผลิตภัณฑ์ดูดซับ	อะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml	
	pH 5.8	pH 6.8
control	x x x x	x x x x
aluminosilicate	x x x x	x x x x
MOS	x x x x	x x x x
ยีสต์ทางการค้า	x x x x	x x x x
ยีสต์จากกระเพาะโค	x x x x	x x x x

การหาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ จะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ ไม่เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ pH 5.8

กลุ่มที่ 2 ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ ไม่เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ pH 6.8

กลุ่มที่ 3 ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8

กลุ่มที่ 4 ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ เติมอะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 6.8

วิธีดำเนินงานวิจัยการศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับแบบ *in vitro* มีดังนี้คือ

3.2.1 การเก็บของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid)

การเก็บของเหลวในกระเพาะหมัก ได้จากการสุ่มเก็บหลังจากที่โคกินอาหาร 3 ชั่วโมง (รูปที่ 3.4) ดังนี้คือ

3.2.1.1 เปิดฝากระบอก fistula ของโคเจาะกระเพาะ ซึ่งโคเจาะกระเพาะนั้นกระเพาะหมักของโคจะถูกเย็บติดกับผนัง แล้วใส่กระบอก fistula ลงไป สามารถเปิดและปิดเพื่อเก็บของเหลวในกระเพาะหมัก และอาหารที่ได้รับการหมักย่อย (digesta)

3.2.1.2 เก็บของเหลวในกระเพาะหมักโดยใส่หัวเก็บตัวอย่าง (rumen sampler) ไว้ในกระเพาะหมักให้ปลายสายยางโผล่ออกมานอกกระบอก fistula

3.2.1.3 ใช้กระบอกฉีดยา (Syringe)ต่อเข้ากับสายยาง หลังจากนั้นดูดของเหลวออกมาประมาณ 200 ml

3.2.1.4 นำของเหลวที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ปิดฝาให้แน่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บของเหลวในกระเพาะหมักต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

รูปที่ 3.4 แสดงการเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก

3.2.2 การคัดแยกยีสต์จากกระเพาะโคให้บริสุทธิ์

3.2.2.1 ปิเปตของเหลวที่ได้จากกระเพาะหมัก 25 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 ml

3.2.2.2 นำของเหลวจากกระเพาะหมักที่เจือจางแล้ว ไปเจือจางด้วยวิธี serial dilution ในระดับความเจือจาง 1:10, 1:10^2, 1:10^3, 1:10^4, 1:10^5 และ 1:10^6

3.2.2.3 ปิเปตตัวอย่าง 0.1 ml แต่ละความเจือจาง หยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt yeast extract (MY)

3.2.2.4 ใช้เทคนิคการแยกเชื้อ spread plate technique

3.2.2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 ^{0}C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2.6 ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน นำมาทำ wet mount ศึกษาสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำการคัดแยกเชื้อยีสต์

3.2.2.7 ใช้ loop เขี่ยยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันของแต่ละโคโลนี นำมาคัดแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ streak plate technique ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY

3.2.2.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 ^{0}C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2.9 ใช้ loop เขี่ยโคโลนีของยีสต์ที่บริสุทธิ์ นำมาขีดลากบนอาหาร MY agar slant

3.2.2.10 เก็บเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหาร MY agar slant ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

3.2.3 การคัดแยกยีสต์ทางการค้าให้บริสุทธิ์

3.2.3.1 ชั่งยีสต์ทางการค้า 0.5 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ที่บรรจุอาหาร MY broth 100 ml

3.2.3.2 นำขวดรูปชมพู่ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3.3 ใช้ loop แตะ suspension ของยีสต์ มาขีดลากบนผิวหน้าอาหาร MY agar ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ cross streak technique

3.2.3.4 คัดแยกยีสต์ทางการค้า โดยใช้ loop เขี่ยโคโลนีของยีสต์ ขีดลากบนอาหารผิวเอียง MY agar slant

3.2.3.5 เก็บยีสต์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร MY agar slant ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

3.2.4 การเพาะเลี้ยงยีสต์

3.2.4.1 ใช้ loop เขี่ยยีสต์ทางการค้าจากหลอดเก็บเชื้อ MY agar slant เต็ม loop จำนวน 2 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ 1 ซึ่งบรรจุอาหาร MY 100 ml และใช้ loop เขี่ยยีสต์จากกระเพาะโคทั้ง 2 ชนิด เต็ม loop ชนิดละ 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ 2 ซึ่งบรรจุอาหาร MY 100 ml

3.2.4.2 นำขวดรูปชมพู่ทั้ง 2 ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

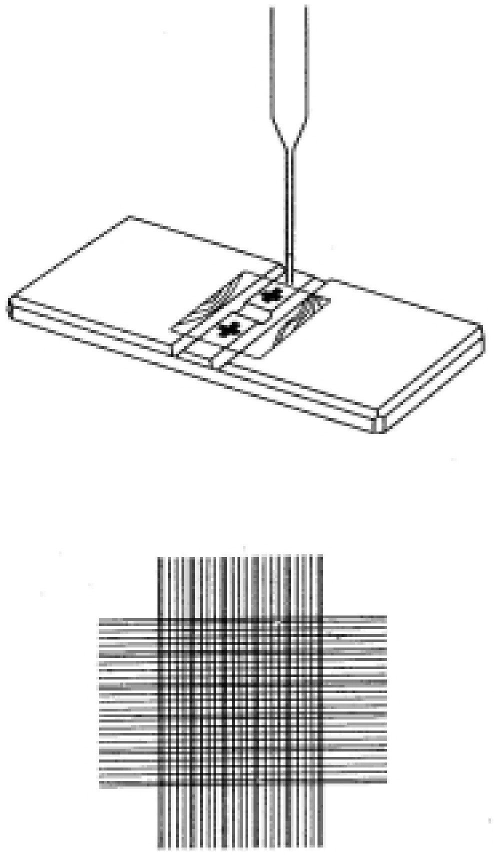
3.2.4.3 นำยีสต์ไปนับจำนวนด้วยวิธี direct count โดยใช้ haemacytometer

3.2.5 การนับจำนวนยีสต์โดยใช้ haemacytometer (Singleton, 1992)

3.2.5.1 เจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค จากการเพาะเลี้ยง ความเจือจาง 10 เท่า โดยปิเปต suspension ของยีสต์ทางการค้า 1 ml ใส่ลงในหลอดที่ 1 ที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 ml และปิเปต suspension ของยีสต์จากกระเพาะโค 1 ml ใส่ลงในหลอดที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า

3.2.5.2 ปิเปต suspension ของยีสต์จากทั้ง 2 หลอด มานับจำนวน เซลล์ยีสต์ โดยใช้ haemacytometer ซึ่ง haemacytometer มีทั้งหมด 25 ช่องใหญ่ ซึ่ง 1 ช่องใหญ่ ประกอบไปด้วย 16 ช่องเล็ก ดังนั้น 25 ช่องใหญ่ มี 400 ช่องเล็ก พื้นที่ของ haemacytometer 1 ช่องเล็ก มีพื้นที่ 1/400 mm^2 (0.05 mm x 0.05 mm) และมีความลึก 1/10 mm (0.1 mm) ดังนั้นมีปริมาตรเท่ากับ 1/4,000 mm^3 (0.00025 mm^3) หรือ 1/4,000,000 ml (0.00000025 ml)

3.2.5.3 สุ่มนับ 5 ช่องใหญ่ (80 ช่องเล็ก) (รูปที่ 3.5) ได้เซลล์ยีสต์ดังตารางที่ 3.4



รูปที่ 3.5 แสดง Haemacytometer

ตารางที่ 3.4 จำนวนเซลล์ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค จากการนับโดยใช้ haemacytometer

ชนิดของยีสต์	จำนวนยีสต์ในแต่ละช่องใหญ่					รวม	จำนวนยีสต์ cells/ml
	ช่องที่1	ช่องที่2	ช่องที่3	ช่องที่4	ช่องที่5		
ยีสต์ทางการค้า	40	39	41	43	42	205	1×10^8
ยีสต์จากกระเพาะโค	33	30	35	31	32	161	8×10^7

3.2.3.4 วิธีการนับจำนวนยีสต์ โดยใช้ haemacytometer

การคำนวณ

ช่องเล็ก	80 ช่อง	นับยีสต์ได้	205	cells
ช่องเล็ก	1 ช่อง	นับยีสต์ได้	205/80 = 2.56	cells

ช่องเล็ก	1 ช่อง	มีปริมาตร	1/(4 x 10^6) ml
ปริมาตร	1/4,000,000 ml	มีเซลล์ยีสต์	2.56 cells
ปริมาตร	1 ml	มีเซลล์ยีสต์	2.56 x (4 x 10^6)= 1 x 10^7 cells

นำค่าที่ได้คูณกับ ค่าความเจือจาง 10 เท่า 1 x 10^7 = 1 x 10^8 cells/ml

ดังนั้น มีจำนวนเซลล์ยีสต์ 1 x 10^8 cells/ml

สูตรการคำนวณ

จำนวนเซลล์ยีสต์ = (จำนวน cells ที่นับได้/จำนวนช่องเล็ก) x (4 x 10^6) cells/ml

3.2.5.5 เจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ให้มีระดับความเจือจาง 2.5 x 10^7 cells/ml

3.2.6 การเตรียมชุดการทดลอง ตามแผนการดำเนินงานวิจัย ดังตารางที่ 3.3

3.2.6.1 นำอาหารโคนมบดให้ละเอียด ผสมให้เข้ากัน ชั่งอาหารโคนมใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml ขวดละ 50 g จำนวน 40 ขวด เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของ aluminosilicate, MOS, ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ที่ pH 5.8 และ 6.8

3.2.6.2 เติมน้ำกลั่นในแต่ละขวด ขวดละ 100 ml ปรับ pH 5.8 และ6.8

3.2.6.3 เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 ใส่ในแต่ละขวด

3.2.6.4 ชั่งผลิตภัณฑ์ดูดซับ aluminosilicate 0.25 g และ MOS 0.25 g ใส่ในขวดในแต่ละชุดการทดลอง

3.2.6.5 ตรวจนับจำนวนยีสต์โดยใช้ haemacytometer ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.5 เจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ให้มีความเข้มข้น 2.5 x 10^7 cells/ml

3.2.6.6 ปิเปต suspension ของยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ที่มีความเข้มข้น 2.5 x 10^7 cells/ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขวดรูปชมพู่ละ 1 ml ในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อให้ในแต่ละ ขวดรูปชมพู่ของชุดการทดลองมีปริมาณยีสต์ 2.5 x 10^7 cells

3.2.6.7 นำขวดรูปชมพู่ในแต่ละชุดการทดลอง ไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 ^{0}C ระยะเวลา 2 วันเมื่อครบระยะเวลา นำอาหารโคนมในแต่ละชุดการทดลอง มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1

3.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 วิธีการสกัดและวิเคราะห์ ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานของ AOAC (Scott, 1990) ดังรายละเอียดที่แสดงในข้อ 3.1.2

3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในชุดการทดลอง นำมาคำนวณหา % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน ของแต่ละผลิตภัณฑ์ดูดซับโดยมีสูตรดังนี้คือ

% การดูดซับอะฟลาท็อกซิน = [(ปริมาณอะฟลาท็อกซินในกลุ่มควบคุม - ปริมาณอะฟลาท็อกซินในแต่ละกลุ่มทดลอง)/ ปริมาณอะฟลาท็อกซินในกลุ่มควบคุม] x 100

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) แบบ 4 x 2 factorial in completely randomized design ด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System, 1985)

3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของผลิตภัณฑ์ดูดซับ

คัดเลือกผลิตภัณฑ์ดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่มีประสิทธิภาพที่สุด 2 ชนิด จากการทดลองที่ 2 คือยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค นำมาศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 แบบ *in vitro* วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จัดกลุ่มการทดลองแบบ factorial 2 x 3 x 2 โดยมีปัจจัยที่หนึ่ง คือผลิตภัณฑ์ดูดซับ 2 ชนิด คือยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ปัจจัยที่ 2 คือระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ 3 ระดับ คือ 1.25 x 10^7 , 2.5 x 10^7 และ 5 x 10^7 cells/ml และปัจจัยที่ 3 คือระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน กำหนดให้บล็อกเป็นระดับความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml และ 400 ng/ml ที่เจือปนในอาหารโคนม 50 g ที่ระดับ pH 5.8 อุณหภูมิ 39 ^{0}C โดยมีจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำต่อหนึ่งกลุ่มการทดลอง ดังสรุปไว้ในตารางที่ 3.3 และมีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่ 1 ยีสต์ทางการค้า 1.25 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มที่ 2 ยีสต์ทางการค้า 1.25 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 4 วัน

กลุ่มที่ 3 ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มที่ 4 ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 4 วัน

กลุ่มที่ 5 ยีสต์ทางการค้า 5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มที่ 6 ยีสต์ทางการค้า 5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 4 วัน

กลุ่มที่ 7 ยีสต์จากกระเพาะโค 1.25 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มที่ 8 ยีสต์จากกระเพาะโค 1.25 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 4 วัน

กลุ่มที่ 9 ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มที่ 10 ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 4 วัน

กลุ่มที่ 11 ยีสต์จากกระเพาะโค 5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มที่ 12 ยีสต์จากกระเพาะโค 5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 4 วัน

ตารางที่ 3.5 แผนการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ที่ 200 และ 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน

ผลิตภัณฑ์ดูดซับ	ระดับความเข้มข้น	เวลา 2 วัน		เวลา 4 วัน	
		อะฟลาท็อกซิน B_1		อะฟลาท็อกซิน B_1	
		200 ng/ml	400 ng/ml	200 ng/ml	400 ng/ml
กลุ่มควบคุม	-	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
ยีสต์ทางการค้า	1.25 x 10^7 cells/ml	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
	2.5 x 10^7 cells/ml	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
	5 x 10^7 cells/ml	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
ยีสต์จากกระเพาะโค	1.25 x 10^7 cells/ml	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
	2.5 x 10^7 cells/ml	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
	5 x 10^7 cells/ml	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x

การหาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค จะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมในการทดลองมีดังนี้คือ

กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 1 ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ ระยะเวลา 2 วัน

กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ ระยะเวลา 4 วัน

3.3.1 การเพาะเลี้ยงยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค

นำยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ที่ถูกคัดแยกบริสุทธิ์ จากการทดลองที่ 3.2 มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 3.2.4 แล้วนับจำนวนยีสต์โดยใช้ haemacytometer (Singleton, 1992) ตามวิธีการในข้อ 3.2.5

3.3.2 การเจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค

เจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ให้มีระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.25×10^7, 2.5×10^7 และ 5×10^7 cells/ml

3.3.3 การเตรียมชุดการทดลอง ตามแผนการดำเนินงานวิจัย ในตารางที่ 3.5

3.3.3.1 นำอาหารโคนมบดให้ละเอียด ผสมให้เข้ากัน ชั่งอาหารโคนมใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml ขวดละ 50 g จำนวน 112 ขวด เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของ ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ที่ pH 5.8

3.3.3.2 เติมน้ำกลั่นในแต่ละขวด ขวดละ 100 ml ปรับ pH 5.8

3.3.3.3 เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาท็อกซิน B_1 ใส่ในแต่ละขวด

3.3.3.4 ปิเปต suspension ของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.25×10^7, 2.5×10^7 และ 5×10^7 cells/ml ที่ได้จากการเจือจางในข้อ 3.2.2 ใส่ในขวด ขวดละ 1 ml เพื่อให้ในแต่ละขวดมีปริมาณยีสต์ตามชุดการทดลอง

3.3.3.5 นำขวดรูปชมพู่ในแต่ละชุดการทดลอง ไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 ^{0}C ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน ตามแผนการทดลอง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำอาหารโคนมในแต่ละชุดการทดลอง มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1

3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานของ AOAC (Scott, 1990) วิธีการสกัดและวิเคราะห์ ในข้อ 3.1.2

3.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ได้จากข้อ 3.3.4 มาคำนวณหา % การดูดซับ อะฟลาท็อกซินด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งการคำนวณหา % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน ดังนี้

% การดูดซับอะฟลาท็อกซิน = [(ปริมาณอะฟลาท็อกซินในกลุ่มควบคุม - ปริมาณอะฟลาท็อกซินในแต่ละกลุ่มทดลอง)/ ปริมาณอะฟลาท็อกซินในกลุ่มควบคุม] x 100

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) แบบ 2 x 3 x 2 factorial in randomized complete block design ด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System, 1985)

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

3.5.1 ฟาร์มโคนม อสค.

3.5.2 ฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5.3 ฟาร์มโคนมเกษตรกรรายย่อย เขตอำเภอขามทะเลสอ จังหวัดนครราชสีมา

3.5.4 ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ อาคารเครื่องมือ 2 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มดำเนินการวิจัย วันที่ 30 พฤษาคม 2542 – สิ้นสุด วันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2545

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณอะฟลาท็อกซิน ที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบก่อนการแปรรูป น้ำนมดิบหลังการแปรรูป และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมและอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบจากฟาร์มโคนม จำนวน 6 ฟาร์ม ในตารางที่ 4.1 พบว่าฟาร์มที่ 1 มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม 45.36 ppb ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.16 ppb ซึ่งมี % การถ่ายทอด (% carry over) จากอาหารโคนมไปยังน้ำนมดิบ 0.35% ฟาร์มที่ 2 มีการปนเปื้อนของอะฟลา ท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม 37.47 ppb ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.38 ppb และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน 1.02% ฟาร์มที่ 3 มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม 44.37 ppb ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.32 ppb และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน 0.72% ฟาร์มที่ 4 มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม 131.31 ppb ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.50 ppb และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน 0.38% ฟาร์มที่ 5 มีการปนเปื้อนของ อะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม 138.19 ppb ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.62 ppb และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน 0.45% ฟาร์มที่ 6 มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม 201.38 ppb ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.75 ppb และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน 0.37% ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่ามีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมของทั้ง 6 ฟาร์ม ซึ่งอยู่ในช่วง 37.47-201.38 ppb ในส่วนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบของทั้ง 6 ฟาร์ม อยู่ในช่วง 0.16-0.75 ppb เมื่อนำมาคำนวณ % การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมไปยังน้ำนมดิบ พบว่าอยู่ในช่วง 0.35-1.02%

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (ppb) ในอาหารโคนม ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมดิบและ % carry over

ฟาร์ม	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (ppb) ในอาหารโคนม[(1)]	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมดิบ[(1)]	% carry over
ฟาร์มที่1	45.36 $\pm$ 2.51	0.16 $\pm$ 0.05	0.35
ฟาร์มที่2	37.47 $\pm$ 1.62	0.38 $\pm$ 0.01	1.02
ฟาร์มที่3	44.37 $\pm$ 3.49	0.32 $\pm$ 0.06	0.72
ฟาร์มที่4	131.31 $\pm$ 13.36	0.50 $\pm$ 0.03	0.38
ฟาร์มที่5	138.19 $\pm$ 9.50	0.62 $\pm$ 0.07	0.45
ฟาร์มที่6	201.38 $\pm$ 2.34	0.75 $\pm$ 0.03	0.37

หมายเหตุ: [(1)]Mean $\pm$ SD

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ จากฟาร์มที่ 1 ไปสู่น้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งมีกระบวนการผลิตจากชุดการผลิตเดียวกัน พบว่าน้ำนมดิบ มีอะฟลาท็อกซิน M_1 ปนเปื้อนในปริมาณ 0.16 ppb และน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน ปนเปื้อนในปริมาณ 0.10 ppb เมื่อคำนวณเป็น % การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบไปยังน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ มีค่าเท่ากับ 62.5% ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมดิบ น้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ และ % carry over

ฟาร์ม	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมดิบ[(1)]	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 (ppb) ในน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ [(1)]	% carry over
ฟาร์มที่1	0.16 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.01	62.5

หมายเหตุ: [(1)]Mean $\pm$ SD

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มตามท้องตลาด จำนวน 10 ตัวอย่าง พบอะฟลาท็อกซิน M_1 จำนวน 2 ตัวอย่าง ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 0.03-0.135 ppb ดังตารางที่ 4.3 เมื่อจำแนกตามผลิตภัณฑ์ ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1 ในนมพาสเจอร์ไรซ์ รสจืด 1 ตัวอย่าง จากจำนวน 5 ตัวอย่าง ในปริมาณ 0.135 ppb และนมพาสเจอร์ไรซ์ รสหวาน ตรวจพบ 1 ตัวอย่าง จากจำนวน 2 ตัวอย่าง ในปริมาณ 0.03 ppb สำหรับนมยูเอชที ทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1

ตารางที่ 4.3 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

ชนิดของผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1	ปริมาณที่ตรวจพบ (ppb)
นมพาสเจอร์ไรซ์ รสจืด	5	1	0.135
นมพาสเจอร์ไรซ์ รสหวาน	2	1	0.030
นมยูเอชที รสจืด	3	-	-

4.2 ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

4.2.1 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1

ผลการทดลองการศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 พบว่าปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC หลังการดูดซับด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ (ภาคผนวก ค รูปที่ 4.1) กลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 และผลิตภัณฑ์ดูดซับ ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 88.68 และ 84.69 ppb กลุ่มควบคุมที่ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 169.20 และ 193.25 ppb กลุ่ม aluminosilicate ที่ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 66.89 และ 53.63 ppb กลุ่ม MOS ที่ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 83.88 และ 67.83 ppb กลุ่มยีสต์ทางการค้าที่ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 15.21 และ 20.11 ppb กลุ่มยีสต์จากกระเพาะโคที่ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 100 ng/ml ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 22.70 และ 23.22 ppb ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (AFB_1) ในอาหารโคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา	ระดับ pH	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (ppb) [1]
กลุ่มควบคุม + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	169.20 ± 54.81
	pH 6.8	193.25 ± 34.28
Aluminosilicate + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	66.89 ± 15.36
	pH 6.8	53.63 ± 4.06
MOS + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	83.88 ± 11.47
	pH 6.8	67.83 ± 5.70
ยีสต์ทางการค้า + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	15.21 ± 5.93
	pH 6.8	20.11 ± 3.60
ยีสต์จากกระเพาะโค + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	22.70 ± 2.22
	pH 6.8	23.22 ± 1.19

หมายเหตุ: [1] Mean ± SD, n = 4

4.2.2 % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

เมื่อนำปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 จากผลการทดลองในข้อ 4.2.1 (ตารางที่ 4.4) มาคำนวณหา % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 (ภาคผนวก ค รูปที่ 4.2) พบว่าผลของผลิตภัณฑ์ดูดซับต่อ % การดูดซับ อะฟลาท็อกซิน B_1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) กล่าวคือยีสต์ทางการค้ามีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ pH 5.8 และ 6.8 มีค่าเท่ากับ 91.01 และ 89.60% และยีสต์จากกระเพาะโคมีค่าการดูดซับที่ pH 5.8 และ 6.8 เท่ากับ 86.59 และ 87.99% ตามลำดับ และทั้งคู่มีความสามารถดูดซับสูงกว่า aluminosilicate และ MOS ซึ่ง aluminosilicate มีค่าการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ pH 5.8 และ 6.8 เท่ากับ 60.47 และ 72.25% และ MOS มีค่าการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ pH 5.8 และ 6.8 เท่ากับ 50.43 และ 64.91% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

% การดูดซับต่อระดับ pH และอิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระดับ pH พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.01$) เช่นกัน เมื่อระดับ pH เพิ่มขึ้นจาก 5.8 เป็น 6.8 ประสิทธิภาพการดูดซับ อะฟลาท็อกซิน B_1 ของ aluminosilicate และ MOS เพิ่มจาก 60.47 เป็น 72.25% และจาก 50.43 เป็น 64.91% ตามลำดับ แต่ในส่วนของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ระดับ pH ที่เพิ่มขึ้นจาก 5.8 เป็น 6.8 ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับ (91.01 เป็น 89.60% และ 86.59 เป็น 87.99% ตามลำดับ) ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 (AFB_1) ในอาหาร โคนม ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา

ผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา	**ระดับ pH**	**% การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1**
aluminosilicate + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	60.47
	pH 6.8	72.25
MOS + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	50.43
	pH 6.8	64.91
ยีสต์ทางการค้า + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	91.01
	pH 6.8	89.60
ยีสต์จากกระเพาะโค + AFB_1 100 ng/ml	pH 5.8	86.59
	pH 6.8	87.99
SEM		3.16
% C.V.		5.92
		------------------------- p ------------------------
P(1)		0.0001
pH(1)		0.0004
P*pH(1)		0.0033

หมายเหตุ:

(1) P คือผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา, pH คือระดับ pH และ P*pH คืออิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรากับระดับ pH

4.3 ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม

จากผลการทดลองที่ 2 พบว่ายีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคมีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 มากที่สุด ดังนั้นจึงได้คัดเลือกยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคมาศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1

4.3.1 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ผลการทดลองการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 พบว่าปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC (ภาคผนวก ค รูปที่ 4.3) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่อะฟลาท็อกซิน B_1 และผลิตภัณฑ์ดูดซับ เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน 42.35 และ63.35 ppb และจากตารางที่ 4.6 พบว่า หลังจากการดูดซับด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ กลุ่มควบคุมไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับที่ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 247.82 และ 276.29 ppb กลุ่มควบคุมไม่ใส่ผลิตภัณฑ์ดูดซับ ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 454.99 และ 470.67 ppb ยีสต์ทางการค้า 1.25 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของ อะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 99.14 และ 83.40 ppb ยีสต์ทางการค้า 1.25 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 252.77 และ 185.33 ppb ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 58.96 และ 29.40 ppb ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 181.43 และ 105.11 ppb ยีสต์ทางการค้า 5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 55.15 และ 14.69 ppb ยีสต์ทางการค้า 5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 156.08 และ 96.77 ppb ยีสต์จากกระเพาะโค 1.25 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 108.62 และ 78.37 ppb ยีสต์จากกระเพาะโค 1.25 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 262.87 และ 176.18 ppb ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 66.11 และ 21.38 ppb ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 198.57 และ 116.19 ppb ยีสต์จากกระเพาะโค 5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 200 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลา

ท็อกซิน B_1 52.71 และ 10.32 ppb ยีสต์จากกระเพาะโค 5 x 10^7 cells/ml ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1 400 ng/ml เวลา 2 และ 4 วัน มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 174.84 และ 82.06 ppb ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษจากรา	**ความเข้มข้นของอะฟลาท็อกซิน B_1** (ng/ml)	**ระยะเวลา**	**ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 (ppb)**[(1)]
กลุ่มควบคุม	200	2	247.82 ± 4.54
		4	276.29 ± 6.05
	400	2	454.99 ± 7.23
		4	470.67 ± 12.27
ยีสต์ทางการค้า 1.25 x 10^7 cells/ml	200	2	99.14 ± 2.85
		4	83.40 ± 3.28
	400	2	252.77 ± 8.73
		4	185.33 ± 12.18
ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml	200	2	58.96 ± 3.04
		4	29.40 ± 3.01
	400	2	181.43 ± 9.34
		4	105.11 ± 3.81
ยีสต์ทางการค้า 5 x 10^7 cells/ml	200	2	55.15 ± 2.14
		4	14.69 ± 2.26
	400	2	156.08 ± 5.54
		4	96.77 ± 6.78
ยีสต์จากกระเพาะโค 1.25 x 10^7 cells/ml	200	2	108.62 ± 2.48
		4	78.37 ± 2.54
	400	2	262.87 ± 10.04
		4	176.18 ± 9.55
ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml	200	2	66.11 ± 5.17
		4	21.38 ± 3.57
	400	2	198.57 ± 8.37
		4	116.19 ± 4.16
ยีสต์จากกระเพาะโค 5 x 10^7 cells/ml	200	2	52.71 ± 4.79
		4	10.32 ± 0.96
	400	2	174.84 ± 11.72
		4	82.06 ± 5.25

หมายเหตุ: [(1)] Mean ± SD, n = 4

4.3.2 % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

เมื่อนำปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 จากผลการทดลองในข้อ 4.3.1 (ตารางที่ 4.6) มาคำนวณ % การดูดซับ พบว่า % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 (ภาคผนวก ค รูปที่ 4.4) ยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในส่วนระดับความเข้มข้นของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโค ที่ระดับ 1.25 x 10^7, 2.5 x 10^7 และ 5 x 10^7 cells/ml มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) กล่าวคือเมื่อระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับเพิ่มขึ้น การดูดซับมี % สูงขึ้น โดยที่ยีสต์ทางการค้า 5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน มีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 71.72 และ 87.06% และยีสต์จากกระเพาะโค 5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน มีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 70.15 และ 89.41% ซึ่งยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคที่ระดับ 5 x 10^7 cells/ml มี % การดูดซับสูงกว่าระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับทุกระดับ ซึ่งยีสต์ทางการค้า 1.25 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน มีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 52.22 และ 65.22% ยีสต์จากกระเพาะโค 1.25 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 49.20 และ 67.10% ยีสต์ทางการค้า 2.5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน มีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 68.17 และ 83.51% ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5 x 10^7 cells/ml ระยะเวลา 2 วัน และ 4 วัน มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 64.84 และ 83.79% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของระยะเวลา ($p<0.01$) เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 4 วัน การดูดซับมี % สูงขึ้น (ตารางที่ 4.7)

อิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระยะเวลา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) แต่ในส่วนของอิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับ อิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระยะเวลา และอิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับและระยะเวลา ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1

ผลิตภัณฑ์ดูดซับ	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์	เวลา (วัน)	% การดูดซับ
ยีสต์ทางการค้า	1.25 x 10^7 cells/ml	2	52.22
		4	65.22
	2.5 x 10^7 cells/ml	2	68.17
		4	83.51
	5 x10^7 cells/ml	2	71.72
		4	87.06
ยีสต์จากกระเพาะโค	1.25 x 10^7 cells/ml	2	49.20
		4	67.10
	2.5 x 10^7 cells/ml	2	64.84
		4	83.79
	5 x10^7 cells/ml	2	70.15
		4	89.41
SEM			1.48
% C.V.			2.93
			------------------------------- p ------------------
P[(1)]			0.1855
B[(1)]			0.0001
C[(1]			0.0001
D[(1)]			0.0001
P*C[(1)]			0.1902
P*D[(1)]			0.0001
C*D[(1)]			0.1501
P*C*D[(1)]			0.8078

<u>หมายเหตุ</u>:

[(1)] P คือผลิตภัณฑ์ดูดซับ, B คือบล็อก, C คือระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับ, D คือระยะเวลา

P*C คืออิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์,

P*D คืออิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระยะเวลา,

C*D คืออิทธิพลร่วมระหว่างระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระยะเวลา,

P*C*D คืออิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับและระยะเวลา

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาปริมาณอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบก่อนการแปรรูป น้ำนมดิบหลังการแปรรูปด้วยความร้อน และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

ผลการทดลองตรวจพบอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมทั้ง 6 ฟาร์ม อยู่ในช่วง 37.47-201.38 ppb อะฟลาท็อกซินที่ตรวจพบน่าจะสืบเนื่องมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการประกอบอาหารโคนม การเก็บรักษาวัตถุดิบและอาหารโคนมที่แตกต่างกัน ซึ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงโคส่วนใหญ่ ได้แก่ หญ้าและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากถั่วลิสง กากถั่วเหลือง ข้าวโพด ซึ่งวัตถุดิบส่วนใหญ่มีคุณภาพต่ำ และอาจมีราปนเปื้อนทำให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในปริมาณที่สูง ราสามารถสร้างสารพิษขึ้นมาในช่วงอุณหภูมิ 12-40 ^{0}C ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-85% ความชื้น 17% และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 24-35 ^{0}C (เบญจมาศ มโหสถนันท์, 2539; Ayerst, 1969) ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้น จึงเกิดปัญหาการปนเปื้อนของราและอะฟลาท็อกซินได้ง่าย นอกจากนั้นอะฟลาท็อกซิน B_1 มีจุดหลอมเหลวสูงถึง 268-269 ^{0}C (Marth, 1990) การใช้ความร้อนในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ จึงไม่สามารถทำลายอะฟลาท็อกซิน B_1 ถึงแม้ว่าราที่ผลิตอะฟลาท็อกซินอาจถูกทำลายด้วยขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ แต่สารพิษอะฟลาท็อกซินยังคงสภาพอยู่ได้นาน ส่งผลให้ตรวจพบอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนม

ปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ตรวจพบสอดคล้องกับรายงานของ เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และคณะ (2540) ซึ่งพบว่ากากถั่วลิสงที่ผลิตในประเทศมีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับสูงมาก คือ 200-1,500 ppb ศรีสิทธิ์ การุณยะวณิช และคณะ (2538) ตรวจวิเคราะห์อะฟลาท็อกซินในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นอาหารในประเทศไทย จำนวน 660 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในช่วง 0.1-3,528 ppb ภัทนีย์ เล็กศรีสมพงษ์ (2540) รายงานว่าวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และวัตถุดิบภายในประเทศ พบอะฟลาท็อกซินในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนัก วัตถุดิบที่ตรวจพบอะฟลา ท็อกซิน เช่น กากมะพร้าวมีปริมาณอะฟลาท็อกซิน 8-560 ppb กากถั่วลิสงอินเดียมีปริมาณอะฟลาท็อกซิน 55-342 ppb (ดังตารางที่ 2.3)

อาหารโคที่จัดว่าเป็นอาหารเสื่อมคุณภาพ มีปริมาณอะฟลาท็อกซินมากกว่า 100 ppb (กรมปศุสัตว์, 2539) จากการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารโคนมมาวิเคราะห์พบเพียง 3 ตัวอย่าง ที่เกินกว่ามาตรฐานที่กำหนด คือ 131.31, 138.19 และ 201.38 ppb

สำหรับอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบของทั้ง 6 ฟาร์ม พบการปนเปื้อนปริมาณค่อนข้างสูง คือมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.16-0.75 ppb อาจมีสาเหตุจากแม่โคได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลา ท็อกซิน โดยเฉพาะอะฟลาท็อกซิน B_1 ในปริมาณที่มากและเป็นระยะเวลาที่นาน ทำให้เกิดการสะสมที่ตับ และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากอะฟลาท็อกซิน B_1 เป็นอะฟลาท็อกซิน M_1 ก่อนถูกขับออกมาทางน้ำนม (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2539; อนงค์ บิณฑวิหค และคณะ, 2534; Van Egmond, 1989)

จากการศึกษาปริมาณการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมสู่น้ำนม มีค่า carry over อยู่ในช่วง 0.35-1.02% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์ (2540) ซึ่งระบุว่าค่า carry over เท่ากับ 2.01% Devegowda *et al* (1998) รายงานว่าอัตราส่วนของปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ถูกขับออกทางน้ำนมต่อปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมที่โคได้รับ มีค่าเฉลี่ย 1: 65-100 และมีค่า carry over เท่ากับ 1-1.54% รายงานของ เบญจมาศ มโหสถนันท์ (2539) รายงานว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซิน B_1 ปนเปื้อนในปริมาณ 100 ppb จะให้น้ำนมที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในปริมาณ 1 ppb ซึ่งมีค่า carry over เท่ากับ 1% สุเทพ เรืองวิเศษ และเบญจมาศ มโหสถนันท์ (2539) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1ในน้ำนมดิบ และอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารที่ใช้เลี้ยงโคนม พบว่าความสัมพันธ์ขึ้นอยู่กับระยะการให้นมของแม่โค โดยมีอัตราส่วนเท่ากับ 0.02 หรือ 2 % ในระยะแรกของการให้นม และลดลงตามลำดับจนถึง 0.007 หรือ 0.7% ในระยะหลังของการให้นม และ Marth (1990) รายงานว่าโคที่ได้รับอะฟลาท็อกซิน B_1 ปนเปื้อนในอาหารจะสามารถถ่ายทอดอะฟลาท็อกซิน M_1 ไปยังน้ำนมในอัตราส่วน 1-3%

ในฟาร์มที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ สู่นมพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งมีกระบวนการผลิตจากชุดการผลิตเดียวกัน พบว่าน้ำนมดิบมีอะฟลาท็อกซิน M_1 ปนเปื้อนในปริมาณ 0.16 ppb และน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ พบในปริมาณ 0.10 ppb และการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบไปยังน้ำนมหลังการแปรรูปด้วยความร้อน มีค่าสูงถึง 62.5%

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่าประเทศไทยในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 จากน้ำนมดิบสู่ผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม มีเพียงปริมาณการถ่ายทอดของ อะฟลาท็อกซิน B_1 จากอาหารโคนมสู่น้ำนม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาครั้งแรก เกี่ยวกับปริมาณการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซินจากอาหารโคนมสู่น้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่เกิดจากชุดการผลิตเดียวกัน ทำให้ทราบปริมาณการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซินจากชุดการผลิตเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ รสจืด และรสหวาน พบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.03-0.135 ppb ส่วนนมยูเอชที ไม่พบการปนเปื้อน ระดับการปนเปื้อนของ อะฟลาท็อกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งกำหนดไว้ที่ 20 ppb และต่ำกว่าค่ามาตรฐานของ US FDA ที่กำหนดไว้ 0.5 ppb (Price *et al.*, 1993) สำหรับค่าที่เป็นมาตรฐานสากล ซึ่งกำหนดโดยคณะกรรมาธิการโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Committee) นั้นในปัจจุบันยังไม่ได้กำหนดแน่นอนว่าจะเป็น 0.05 หรือ 0.5 ppb (เบญจมาศ มโหสถนันทน์, 2544)

ปริมาณที่ตรวจพบสอดคล้องกับผลการตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมของสำนักคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งพบอะฟลาท็อกซิน M_1 ในนมพาสเจอร์ไรซ์ 9 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 0.22-6.56 ppb (ญาณี วรรณสถิตย์ และคณะ, 2534) Saitanu (1997) ตรวจพบ อะฟลาท็อกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นม ในปริมาณ 0.05 ถึงมากกว่า 0.5 ppb กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี และวัชราภรณ์ เจนสุริยะกุล (2539) ตรวจพบอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชที จำนวน 6 บริษัท บริษัทละ 3 รุ่นการผลิต และการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.01-0.14 ppb อุมา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุประเสริฐ (2537) วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 และ M_2 ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมต่างๆ ที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่าน้ำนมดิบที่เก็บจากฟาร์มทั้งหมด 45 ตัวอย่าง มี 12 ตัวอย่างที่ตรวจพ อะฟลาท็อกซิน M_1ในระดับ 0.15-0.8 ppb นมพาสเจอร์ไรซ์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง มี 9 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ อะฟลาท็อกซิน M_1ในระดับ 0.22-6.56 ppb และนมผงธรรมดาทั้งหมด 11 ตัวอย่าง มีเพียง 1 ตัวอย่าง ที่พบอะฟลาท็อกซิน M_1ในระดับ 1.42 ppb สุเทพ เรืองวิเศษ (2541) ตรวจวิเคราะห์นมพาสเจอร์ไรซ์รสช็อคโกแลต 8 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิตและนมยูเอชที 5 บริษัท บริษัทละ 5 รุ่นการผลิต พบอะฟลาท็อกซิน M_1 ปนเปื้อนในปริมาณน้อยกว่า 0.01–0.243 ppb สำหรับนมพาสเจอร์ไรซ์ และน้อยกว่า 0.01-0.141 ppb สำหรับนมยูเอชที และไม่พบอะฟลาท็อกซิน B_1 ในน้ำนมทุกตัวอย่าง

อะฟลาท็อกซิน M_1 มีจุดหลอมเหลวสูงถึง 299 ^{0}C (Marth, 1990) ดังนั้นการใช้ความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และยูเอชที สามารถทำลายอะฟลาท็อกซิน M_1 ได้เพียงบางส่วน จึงส่งผลให้ตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์และผลิตภัณฑ์นม จากการทดลองพบว่าปริมาณการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 จากน้ำนมดิบสู่น้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ มีค่าสูงถึง 62.5% ดังนั้นปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในผลิตภัณฑ์นมน่าจะขึ้นอยู่กับกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน จากการทดลองของ Purchase and Steyn (1972) พบว่าวิธีพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 ^{0}C นาน 30 นาที สามารถลดปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1

ในน้ำนมได้ 30% และที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C นาน 45 นาที สามารถลดปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ได้ 45%

5.2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

จากผลการทดลองพบว่า ยีสต์จากกระเพาะโค ยีสต์ทางการค้า MOS และ aluminosilicate ล้วนแต่มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 โดยยีสต์จากกระเพาะโค และยีสต์ทางการค้า มีประสิทธิภาพการดูดซับสูงกว่า MOS และ aluminosilicate อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) เมื่อ pH เพิ่มจาก 5.8 เป็น 6.8 ประสิทธิภาพการดูดซับของ MOS และ aluminosilicate มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังนั้นยีสต์จากกระเพาะโคมีประสิทธิภาพการดูดซับใกล้เคียงกับยีสต์ทางการค้า และมีประสิทธิภาพสูงกว่า MOS และ aluminosilicate

Aluminosilicate มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ใน *in vitro* ประมาณ 60 และ 72% ที่ pH 5.8 และ 6.8 ตามลำดับ ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Phillips *et al.* (1988) ซึ่งรายงานว่า aluminas, silicas และ aluminosilicates สามารถดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ใน *in vitro* Kubena *et al.* (1990) และ Kubena *et al.* (1993) รายงานว่าสาร HSCAS 0.5% (โดยน้ำหนัก) ผสมในอาหารที่มีสารพิษอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในปริมาณ 7.5 mg/kg และ 3.5 mg/kg สามารถลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ได้

Harvey *et al.* (1991) พบว่าโคที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาท็อกซิน 200 μg/kg และผสม 0.5% HSCAS โดยน้ำหนัก มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนม 1.41 μg/l ซึ่งเป็นระดับตกค้าง ลดลงประมาณ 24% ส่วนโคที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 100 μg/kg เมื่อผสม HSCAS ในระดับ 1% โดยน้ำหนัก จะสามารถลดการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมได้ประมาณ 44% Smith *et al.* (1994) พบว่าแพะที่ได้รับอาหารที่ที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน 200 μg/kg เมื่อผสม HSCAS 4% โดยน้ำหนัก สามารถลดระดับของอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ตกค้างในน้ำนมได้ถึง 86.9% ถ้าผสม HSCAS 1% โดยน้ำหนัก ในอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน 100 μg/kg สามารถลดระดับของอะฟลาท็อกซิน M_1 โดยเฉลี่ย 51.9% และถ้าผสม HSCAS 2% โดยน้ำหนัก ในอาหารที่มี อะฟลาท็อกซินปนเปื้อน 100 μg/kg สามารถลดระดับของอะฟลาท็อกซิน M_1 โดยเฉลี่ย 82.2% จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ ไมตรี สุทธจิตต์ (2543) พบว่า หมู่ไดคาร์โบนิล (dicarbonyl) ของอะฟลาท็อกซินเป็นส่วนสำคัญในการจับกับผิวของอนุภาค HSCAS ได้หลายบริเวณ

MOS เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannanoligosaccharide) ได้แก่ กลูโคแมนแนน

(glucomannan) มีคุณสมบัติในการจับตัวกับสารพิษจากราได้ และให้ผลดีทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง สารดังกล่าวได้แก่ Mycosorb หรือ Bio-Mos ซึ่งสกัดได้จากผนังเซล์ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Devegowda *et al.*, 1996; Devegowda *et al.*, 1998) การใช้ mannanoligosaccharide (MOS) สามารถลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ได้ (Devegowda *et al.*, 1998)

Stanley *et al.* (1993) ทดลองใช้เซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเติมในอาหาร 0.1% สามารถลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในระดับ 5 mg/kg ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Devegowda *et al.* (1996) ที่ใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ลดระดับความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินในไก่ที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อน

กลไกการดูดซับของ MOS ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ยังไม่ทราบแน่ชัด สำหรับอิทธิพลของ pH ที่มีต่อการดูดซับกล่าวคือเมื่อระดับ pH สูงขึ้นจาก 5.8 เป็น 6.8 ประสิทธิภาพการดูดซับของ MOS และ aluminosilicate มีประสิทธิภาพสูงขึ้นนั้น ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดเช่นกัน แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางชีวภาพและเคมีของสารดูดซับ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

5.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1

จากผลการศึกษาพบว่ายีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคต่างก็มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) เมื่อระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับเพิ่มขึ้น การดูดซับมี % สูงขึ้น อาจเป็นเพราะเมื่อปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นมีผลให้สามารถจับอะฟลา ท็อกซิน B_1 ได้มากขึ้น จึงทำให้มีปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ลดลง และยังพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของระยะเวลาในการบ่มยีสต์กับอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาท็อกซิน B_1 ($p<0.01$) และอิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระยะเวลา ($p<0.01$) เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 4 วัน การดูดซับมี % สูงขึ้น อาจเป็นผลเนื่องจากเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม ทำให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์สูงขึ้น เมื่อปริมาณเซลล์ยีสต์มากขึ้นการเข้าจับกับอะฟลาท็อกซิน B_1 ก็เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้การดูดซับมี % สูงขึ้น

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

6.1 การศึกษาปริมาณอะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในอาหารโคนม น้ำนมดิบก่อนการแปรรูป น้ำนมดิบหลังการแปรรูปด้วยความร้อน และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารโคนม และน้ำนมดิบ จำนวน 6 ฟาร์ม พบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมของทั้ง 6 ฟาร์ม อยู่ในช่วง 37.47-201.38 ppb ในส่วนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบทั้ง 6 ฟาร์ม อยู่ในช่วง 0.16-0.75 ppb และ % การถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมสู่น้ำนมดิบ อยู่ในช่วง 0.35-1.02% และตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบ 0.16 ppb และน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ 0.10 ppb จากฟาร์มที่ 1 ซึ่งมีการถ่ายทอดของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมดิบไปสู่น้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ 62.5%

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ รสจืด และรสหวาน พบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.03-0.135 ppb ส่วนนมยูเอชที ไม่พบการปนเปื้อน

6.2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

จากการทดลองพบว่ายีสต์จากกระเพาะโค ยีสต์ทางการค้า MOS และ aluminosilicate ล้วนแต่มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ทั้งสิ้นโดยยีสต์จากกระเพาะโค และยีสต์ทางการค้า มีประสิทธิภาพการดูดซับสูงกว่า MOS และ aluminosilicate อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และเมื่อ pH เพิ่มจาก 5.8 เป็น 6.8 ประสิทธิภาพการดูดซับของ MOS และ aluminosilicate มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังนั้นยีสต์จากกระเพาะโคมีประสิทธิภาพการดูดซับ ใกล้เคียงกับยีสต์ทางการค้า และมีประสิทธิภาพสูงกว่า MOS และ aluminosilicate

6.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1

ประสิทธิภาพการดูดซับของยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) เมื่อระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ดูดซับเพิ่มขึ้น การดูดซับมี % สูงขึ้น นอกจากนั้นยังพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของระยะเวลา ($p<0.01$) และอิทธิพลร่วมระหว่างผลิตภัณฑ์ดูดซับกับระยะเวลา ($p<0.01$) เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 4 วัน การดูดซับมี % สูงขึ้น

ข้อเสนอแนะการทดลอง

จากการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากราอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนมเพียงอย่างเดียว น่าจะเพิ่มการวิเคราะห์อะฟลาท็อกซิน B_1 ในน้ำนมด้วย เนื่องจากอาจจะมีอะฟลาท็อกซิน B_1 ที่ยังไม่ถูกเมทาบอไลท์ อาจมีการถ่ายทอดสู่น้ำนมได้ และนอกจากนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงโคนมอาจมีสารพิษจากราชนิดอื่นปนเปื้อนด้วย เช่น fumonisin, zearalenone, vomitoxin และ orchratoxin เป็นต้น ดังนั้นควรจะมีการวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษเหล่านี้ ที่อาจจะตกค้างในอาหารโคนม รวมทั้งศึกษาปริมาณการถ่ายทอดสู่น้ำนม เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการป้องกันและแก้ไขการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารโคนม และน้ำนม ทั้งนี้เพราะว่าระดับการปนเปื้อนของสารพิษจากราเพียงชนิดเดียว อาจจะไม่เกินค่ากำหนดมาตรฐานความปลอดภัย แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของสารพิษจากรามากกว่า 1 ชนิด อาจจะสามารถเสริมฤทธิ์ความรุนแรงของสารพิษจากราชนิดใดชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดพิษรุนแรงต่อสุขภาพได้หลายเท่าตัวโดยเฉพาะพิษเรื้อรัง (chronic toxicity)

ควรมีการเก็บตัวอย่างอาหารโคนม และน้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นม จากแหล่งผลิตและแหล่งจำหน่ายทั่วประเทศไทย เพื่อครอบคลุมขอบเขตของปัญหา และเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้มีความปลอดภัยจากการบริโภคนม และมีการกำหนดระดับของอะฟลาท็อกซินในผลิตภัณฑ์นม ที่มีระดับความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยอิงกับมาตรฐานสากล เพราะว่าในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนม และผลิตภัณฑ์นม มีเพียงการกำหนดค่าการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในอาหารของคนว่าไม่ควรเกิน 20 ppb ไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529

จากการทดลองพบว่ายีสต์จากกระเพาะโคมีประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ใกล้เคียงหรือดีกว่าผลิตภัณฑ์ดูดซับชีวภาพและเคมีทางการค้าบางชนิดในปัจจุบัน ดังนั้นจึงควรค่าต่อการศึกษาและวิจัยเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มศักยภาพและพัฒนายีสต์จากกระเพาะโคให้เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ เพื่อใช้ลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินและสารพิษจากราประเภทอื่นในอาหารสัตว์ต่อไปในอนาคต โดยอาจจะคัดแยกยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ เพื่อบ่งเอกลักษณ์และปรับปรุงสายพันธุ์ ให้มีประสิทธิภาพการดูดซับสูงสุด

นอกจากนี้น่าจะศึกษาการดูดซับอะฟลาท็อกซิน โดยผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพชนิดอื่นๆ เช่น ผลิตภัณฑ์จากพืช เป็นต้น เพื่อเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์ทางเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. (2539). ไร้สารพิษอะฟลาท็อกซิน ไร้โรคภัย ประชาชนสุขใจ. **สัตว์เศรษฐกิจ.** 13(298): 76-78.

กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี และวัชราภรณ์ เจนสุริยะกุล. (2539). **การปนเปื้อนอะฟลาท็อกซิน M_1 และ B_1 ในนมพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชที รสจืดและรสช็อคโกแลต.** โครงการพิเศษปีการศึกษา 2539. ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

กนิษฐา สังคะหะ. (2536). การคัดเลือกเชื้อราที่สลายอะฟลาท็อกซิน. **ข่าวสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.** 34(370): 8.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. (2540). สารพิษจากเชื้อรา: การควบคุมและป้องกัน. ใน เปล่งศรี อิงคนินันท์. (บรรณาธิการ). **การประชุมทางวิชาการในวาระ 80 ปีแห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่อง สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ ระหว่าง วันที่ 13-14 มีนาคม 2540**. (หน้า 191-200). กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์ และ อดิลักษ์ เล็บนาค. (2539). ผลการตรวจสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์. **สาส์นไก่.** 43(10): 47-62.

ชาญยุทธ จรูญเกียรติกำจร และ อุทัย คันโธ. (2538ก). ผลของอะฟลาท็อกซินต่อสัตว์เลี้ยง. **สัตว์เศรษฐกิจ.** 12(268): 73-76.

ชาญยุทธ จรูญเกียรติกำจร และ อุทัย คันโธ. (2538ข). สารพิษอะฟลาท็อกซินต่อสัตว์เลี้ยง. **สัตว์เศรษฐกิจ.** 12(269): 64-68.

ญาณี วรรณสถิตย์, วนิดา ขาวเธียร, มยุรี เนาวรัตโนภาส และตรีรัตน์ รุ่งโรจน์ชัยพร. (2534). **โครงการศึกษาวิจัยปริมาณอะฟลาท็อกซินในนม.** สำนักคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข.

ดวงจันทร์ สุประเสริฐ. (2540). อะฟลาท็อกซินและความเกี่ยวข้องกับคุณภาพชีวิตมนุษย์. ใน สุกัญญา กองเงิน, นันนทวรรณ สุโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย. (บรรณาธิการ). **คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาท็อกซินในถั่วลิสง.** (หน้า 57-65). กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์, พนอ รวยสูงเนิน, สายชล นุชน้อง และ เหมือนหมาย จันทราพันธกุล. (2539).

การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 12(2): 8-15.

ดำเริง จันทร์สุวรรณ. (2537). **สถิติสำหรับการวิจัยทางสังคมศาสตร์**. ภาควิชาสังคมวิทยาและมานุษยวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทิพยา ปาณะโตษะ, ศิริวรรณ เอี่ยมรุ่งโรจน์, วารุณี เสนสุภา และทรงพล รัตนพันธุ์. (2530). **รายงานการศึกษาวิจัย การปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในอาหารสำเร็จรูปที่ทำจากถั่ว.** ฝ่ายค้นคว้าและวิจัยทางวิชาการ. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.

เบญจมาศ มโหสถนันทน์. (2539). สารพิษเชื้อราในอาหารโคนม. ใน พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป (บรรณาธิการ). **ประมวลความรู้เกี่ยวกับโคนม** (หน้า 117-123). กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เบญจมาศ มโหสถนันทน์. (2544). เล่าสู่กันฟัง "อะฟลาท็อกซิน M_1" ในน้ำนม. **จดหมายข่าวโคนม.** 5(5): 4-6.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. (2539). **หลักการอาหารสัตว์.** กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์.

ภัทนีย์ เล็กศรีสมพงษ์. (2540). สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์. ใน เปล่งศรี อิงคนินันท์ (บรรณาธิการ). **การประชุมทางวิชาการในวาระ 80 ปีแห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่อง สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ ระหว่าง วันที่ 13-14 มีนาคม 2540** (หน้า 83-89). กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มาลินี ลิ้มโภคา. (2527). **พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์**. (พิมพ์ครั้งที่2). ภาควิชาเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มุกดา ศรีสกุล. (2536). **การติดตามการได้รับอะฟลาท็อกซินระหว่างอยู่ในครรภ์ของเด็กแรกเกิด.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ไมตรี สุทธจิตต์. (2531). **สารพิษรอบตัวเรา.** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไมตรี สุทธจิตต์. (2543). **สารเคมีก่อมะเร็ง.** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไมตรี สุทธจิตต์, พงศ์สวาท นิยมค้า, นภาพร โออริยกุล, ทรงพรรณ หวังใจสุข และ นันทฤทธิ์ โชคถาวร. (2536). การป้องกันเชื้อราที่ผลิตสารพิษและการทำลายอะฟลาท็อกซินในสิ่งแวดล้อม. ใน **การประชุมวิชาการทั่วประเทศประจำปี 2536 เรื่องมนุษย์กับสิ่งแวดล้อม วันที่ 14-15 มกราคม 2536** (หน้า 302-305). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไมตรี สุทธจิตต์, วิบูลย์ รัตนาปนนท์, อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ, นภาพร โออริยกุล และ ทรงพรรณ

หวังใจสุข. (2529). **รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาหาวิธีทำลายอะฟลาท็อกซินในอาหารที่ตรวจพบ**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และสาโรช ค้าเจริญ. (2543). **ผลของอะฟลาท็อกซินต่อความเสี่ยงของสุขภาพและการผลิตสัตว์.** คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เยาว์มาลย์ ค้าเจริญ, สาโรช ค้าเจริญ, เชิดชัย รัตนเศรษฐกุล, ภาวดี ภักดี, วินัย ใจขาน, อรุณีพงศ์ ศรีสถาพร, พรรณศรี สากิยะ, พิทักษ์ ศรีประย่า, สมพงษ์ ฉายพุทธ และ บุญตา ธรรมบุตร (2540). **รายงานการวิจัยเรื่อง ความปลอดภัยจากอาหารที่ผลิตจากถั่วลิสงในระบบที่ควบคุมการเกิดอะฟลาท็อกซิน (โครงการย่อยที่ 3).** คณะเกษตรศาสตร์: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศรีสิทธิ์ การุณยะวณิช. (2540). มาตรการควบคุมอะฟลาท็อกซินในอาหารประเภทถั่ว กระทรวงสาธารณะสุข โครงการรณรงค์การลดปัญหาอะฟลาท็อกซินในถั่วลิสง. ใน สุกัญญา กองเงิน, นันนทวรรณ สุโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย. (บรรณาธิการ). **คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาท็อกซินในถั่วลิสง.** (หน้า 66-82). กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

ศรีสิทธิ์ การุณยะวณิช, ดวงจันทร์ สุประเสริฐ, อุมา บริบูรณ์, สุวัฒน์ โปษยะวัฒนากุล และนพาภรณ์ ปัญจะ. (2538). อะฟลาท็อกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 37(1): 19-32.

ศุภกิจ อังศุภากร. (2526). โรคสัตว์ที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อรา. **สัตวแพทย์สาร.** 34(1): 75-86.

ศุภกิจ อังศุภากร, วิทยา ธรรมวิทย์ และ สมพงศ์ สหพงศ์. (2520). โรคของสัตว์เศรษฐกิจที่เกิดจากพิษของเชื้อรา. **เวชชสารสัตวแพทย์**. 7(2): 127-143.

สุเทพ เรืองวิเศษ. (2541). **การปนเปื้อนและสาเหตุการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซิน B_1 และ M_1 ในนมปรุงแต่งพาสเจอร์ไรซ์ และยูเอชที รสช็อคโกแลต.** รายงานการวิจัย ทุนโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539.

สุเทพ เรืองวิเศษ และเบญจมาศ มโหสถนันท์. (2539). **ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมและปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 ในน้ำนม.** รายงานผลการวิจัย ทุนรัชดาภิเษกสมโภช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์. (2540). **การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนมเป็น อะฟลาท็อกซิน M_1.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะโภชนศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2539). **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. (2538). **จุลินทรีย์และโรคซึ่งเกิดจากอาหาร**. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อนงค์ บิณฑวิหค, ดานิศ ทวีติยานนท์, ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล, วรา พานิชเกรียงไกร และ อรวรรณ จำรัสฉาย. (2540). การตรวจวิเคราะห์สารพิษอะฟลาท็อกซิน และเมทาโบไลท์ในเนื้อเยื่อของสัตว์เศรษฐกิจในประเทศไทย. **ธุรกิจอาหารสัตว์.** 14(56): 53-61.

อนงค์ บิณฑวิหค, ประพิศ คล้ายนิล, รัมภา อินทรรักษา และ สมบูรณ์ สุธีรัตน์. (2534). การลดความเป็นพิษของอะฟลาท็อกซินโดยใช้มัยโคอินฮิบิเตอร์. ใน **ประมวลเรื่องการประชุมทางวิชาการด้านปศุสัตว์ ครั้งที่ 10 วันที่ 13-16 กันยายน 2534.** (หน้า 521-532). กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อรประพันธ์ พุ่มอินทร์ และสุกัญญา จัตตุรพรพงษ์. (2536). การใช้สารซีโอไลท์ในการลดพิษอะฟลาท็อกซิน. **สุกรสาร์น.** 20(78): 17-19.

อรุณศรี วงษ์อุไร. (2540). อะฟลาท็อกซินในถั่วลิสง. ใน สุกัญญา กองเงิน, นันนทวรรณ สุโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย. (บรรณาธิการ). **คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาท็อกซินในถั่วลิสง.** (หน้า 41-47). กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

อุมา บริบูรณ์ และดวงจันทร์ สุประเสริฐ. (2537). การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน M_1 และ M_2 ในนมและผลิตภัณฑ์นม. **วารสารกระทรวงสาธารณสุข.** 13(7-9): 108-114.

อุรธิดา เพ็งปาน. (2543). **การวิเคราะห์ติดตามการได้รับอะฟลาท็อกซินในคน.** วิทยานิพนธ์ **ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพิษวิทยา คณะวิทยาศาสตร์** มหาวิทยาลัยมหิดล.

Ayerst, G. (1969). The effect of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. **J. Stored. Prod. Res**. 5:127-141.

Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. and Cotty, P. J. (1994). Mycological aspects of aflatoxin formation. In Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (eds.). **The toxicology of aflatoxins.** (pp. 327-346). San Diego: Academic press.

Boutrif, E. and Canet, C. (1998). Mycotoxin prevention and control: FAO programes. **Revue. Med. Vet.** 149(6): 681-694.

Buchanan, R. L. and Ayres, J. C. (1976). Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. **J. Food Sci.** 41: 128-132.

Charmley, L. L., Trenholm, H. L. and Prelusky, D. B. (1995). Mycotoxin: Their origin, impact and importance: Insights into common methods of control and elimination. In Lyons, T.

P. and Jacques, K. A. (eds.). **Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 11th Annual Symposium** (pp. 41-63). Leics, UK: Nottingham University.

Ciegler, A., Kadis, S. and Aji, S. A. (1971). **Microbrial toxin: fungi toxin.** New York: Academic press.

Clarke, R. T. J. and di Menna, M. E. (1961). Yeasts from the bovine rumen. **J. Gen. Microbio.** 25: 113-117.

Davis, N. D. and Diener, U. L. (1987). Mycotoxin. In Beuchat, L. R. (ed.). **Food and beverage mycology** (2nd ed., pp. 518-598). New York: Van Nostrand Reinhold.

Devegowda, G., Aravind, B. I. R. and Morton, M. G. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* and mannaoligosaccharides to couteract aflatoxicosis in broilers. Australian Poult. 80: 103-106. Quoted in Devegowda, G., Raju, M. V. L. N., Afzali, N. and Swamy, H. V. L. N. (1998). Mycotoxin picture world: novel solutions for their counteraction. **Biotechnology in the feed industry**. Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium. (pp. 241-255). UK: Nottingham University Press.

Devegowda, G., Raju, M. V. L. N., Afzali, N. and Swamy, H. V. L. N. (1998). Mycotoxin picture world: novel solutions for their counteraction. In Lyons, T. P. and Jacques, K. A. (eds.). **Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium** (pp. 241-255). Leics,UK: Nottingham University.

Eaton, D. L., Ramsdell, H. S. and Neal, G. E. (1994). Biotransformation of aflatoxins. In Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (eds.). **The toxicology of aflatoxins.** (pp. 45-72). San Diego: Academic Press.

Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., Ramaswamy, H. and Doyon, G. (1994). Novel techniques for controlling growth of and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in packaged peanuts. Food. Microbiol. 11:357-368. Quoted in Hocking, A. D. (1997). Toxigenic *Aspergillus* Species. In : Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montrille, T. J. (eds.). **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. (pp. 397). Washington D.C.: ASM Press.

Erber, E. and Roxas, A. C. (1995). Mycotoxicoses: Their influence on performance and health and how to prevent them effectively. In **Proc. Agrig. '95 plus convention.** Philippine: EE1-EE6. Quoted in Devegowda, G,. Raju, M. V. L. N., Afzali, N. and

Swamy, H. V. L. N. (1998). Mycotoxin picture world: novel solutions for their counteraction. In Lyons, T.P. and Jacques, K.A. (eds.). **Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium** (pp. 241-255). Leics, UK: Nottingham University Press.

Gayler, D. W., Kadlubar, F. F. and Beland, F. A. (1992). Application of biomarkers to risk Assessment. **Environ. Health. Perspect.** 98: 139-141.

Goto, T., Wicklow, D. T. and Ito, Y. (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 62(11): 4036-4038.

Groopman, J. D., Wild, C. P., Hasler, J., Junshi, C., Wogan, G. N. and Kensler, T. W. (1993). Molecular epidemiology of aflatoxin exposures: validation of aflatoxin-N7-guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and human. **Environ. Health. Perspect.** 99: 107-113.

Groopman, J. D., Wogan, G. N., Roebuck, B. D. and Kensler, T. W. (1994). Molecular biomarker for aflatoxins and their application to human cancer prevention. **Cancer. Res.** 54: 1907-1911.

Harvey, R. B., Phillips, T. D., Ellis, J. A. and Kubena, L. F. (1991). Effects on aflatoxin M_1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin contaminated diets of dairy cows. **J. Am. Vet. Res.** 52(9): 1556-1559.

Hayes, P. R. (1992). **Food Microbiology and Hygiene** (2nd ed.). London: Elsevier Applied Science.

Hocking, A. D. (1997). Toxigenic *Aspergillus* species. In Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montrille, T. J. (eds.). **Food microbiology fundamentals and frontiers.** (pp. 393-405). Washington D.C.: ASM press.

Kubena, L. F., Harvey, R. B., Phillips, T. D., Corrier, D. E. and Huff, W. E. (1990). Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Poult. Sci.** 69: 727-735.

Kubena, L. F., Harvey, R. B., Huff, W. E., Elissalde, M. H., Yersin, A. G., Phillips, T. D. and Rottinghus, G. E. (1993). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. **Poult. Sci**. 72: 51-59.

Kurtzman, C. P., Horn, B. W. and Hesseltine, C. W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **J. Microbiol.** 53: 147-158.

Lillehoj, E. B., Stubblefield, R. D., Shannon, G. M. and Shotwell, O. L. (1971). Aflatoxin M_1 removal from aqueous solution by *Flavobacterium aurantiacum*. Mycopathol. Mycol. Appl. 45: 259-266. Quoted in Doyle, M. P., Applebaum, R. S., Brackett, R. E. and Marth, E. H. (1982) Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods nad agricultural commodities. **J. Food Prot.** 45(10): 964-971.

Lund, A. (1974). Yeasts and moulds in the bovine rumen. **J. Gen. Microbio.** 81: 453-462.

Marth, E. H. (1990). Mycotoxins. In. Cliver, D. O. (ed.). **Foodborne disease.** (pp. 137-157). California: Academic Press.

Palmgren, M. S. and Hayes, A. W. (1987). Aflatoxins in food. In Krogh, P. (ed.). **Mycotoxins in food.** (pp. 65-95). London: Academic press.

Phillips, T. D., Kubena, L. F., Harvey, R. B., Taylor, D. R. and Heidelbaugh, N. D. (1988). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. **Poult. Sci.** 67: 243-247.

Pievides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S. and Ahokas, J. (2000). Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Bind Aflatoxin M_1 in aFood Model. **J. Food Prot.** 63(5): 645-650.

Price, W. D., Lovell, R. A. and Mc Chesney, D. G. (1993). Naturally Occurring Toxins in Feedstuffs: Center for Veterinary Medicine Perspective. **J. Anim. Sci**. 71: 2556-2562.

Purchase, I. F. H. and Steyn, M. (1972. Reduction of the aflatoxin M1 content of milk by Processing. **J. Food Cosmet. Toxicol.** 10: 383-387.

Said, B., Ross, M. K., Hamade, A. K., Matsumoto, D. C. and Shank, R. C. (1999). DNA-damaging effects of genotoxins in mixture: nonadditive effects of aflatoxin B_1 and N-acetytaminofluorene on their mutagenicity in *Salmonella typhimulium*. **Toxicol. Sci.** 52: 226-231.

Sawney, D. S., Vodehra , D. C. and Baker, R. C. (1973). The metabolism of C^{14} aflatoxins in laying hens. **Poultry Sci.** 52: 1302-1309.

Scott, P. M. (1990). Natural Poisons. In Helrich, K. (ed.). **Official methods of analysis of the**

association of official analytical chemists (15^{th} ed., pp. 1184-1213). Virginia: Arlington.

Shank, R.C., Bhamarapravati, N., Gordon, J.E. and Wogan, G.N. (1972). Dietary aflatoxin and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer in two municipalpopulations of thailand. **Fd. Cosmet. Toxicol.** 10: 171-179.

Shank, R.C. and Wogan, G.N. (1965). Distribution and excretion of C^{14} -labelled aflatoxin B_1 in the rat. **Fed. Proc.** 24: 627.

Shibamoto, T. and Bjeldanes, L.F. (1993). **Introduction of food toxicology.** Sandiego: Academic press

Singleton, P. (1992). **Introduction of bacteria for students of biology biotechnology and medicine.** England: John Wiley & Sons.

Smith, E. E., Phillips, T. D., Ellis, J. A., Harvey, R. B., Kubena, L. F., Thompson, J. and Newton, G. (1994). Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M_1 Residue in dairy goat milk and effect on milk production and components. **J. Anim. Sci.** 72: 677-682.

Stanley, V. G., Ojo, r., Woldesenbrt, S. and Hutchison, D. H. (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poult. Sci**. 72: 1867-1872.

Statistical Analysis System. (1985). **SAS user' guide: Statistics.** NC: SAS Institute

Steyn, P. S. and Stander, M. A. (1999). Mycotoxins with special reference to the carcinogenic Mycotoxins: aflatoxins, ochatoxins and fumonisins. In Ballantyne, B., Marrs, T. and Syversen, T. (eds.). **General and applied toxicology.** (2^{nd} ed. pp. 2145-2176). London: Macmillan reference.

Suksombat, W. (1993). **Effect of concentrate supplementation on dairy cow performance with emphasis on tropical forages.** Ph.D. Animal Science, University of Massey, New Zealand.

Sutabhaha, S., Suttajit, M. and Niyomca, P. (1992). Studies of aflatoxins in Chiang Mai, Thailand. **Kitasato. Arch. of Exp. Med.** 65(1): 45-52.

Trenholm, H. L., Charmley, L. L. and Prelusky, D. B. (1996). Mycotoxins binding agents: An update on what we know. **Biotechnology in the feed industry**. Proceedings of

Alltech's 12th Annual Symposium. (pp. 335). UK: Nottingham University Press.

Ueno, Y. (1983). **Mycotoxins.** Bangkok: Mahidol University.

Van Egmond, H. P. (1989). Aflatoxin M_1: Occurrence, Toxicity, Regulation. In Van Egmond, H. P. (ed.). **Mycotoxins in dairy product** (pp. 11-55). London: Elsevier Applied Science.

Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. **Bacteriol. Rev.** 30: 460.

Yabe, K., Nakamura, M. and Hamasaki, T. (1999). Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G and B-group aflatoxins. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3867-3872.

Yousef, A. E. and Marth, E. H. (1986). Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M_1 in raw or heated milk with and without added peroxide. **J. Dairy Sci**. 69:2243-2247.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารโคนมและน้ำนมดิบของเกษตรกรรายย่อย

การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารโคนมและน้ำนมดิบ สุ่มเก็บตัวอย่างในฟาร์มของเกษตรกรรายย่อย ในเขตอำเภอขามทะเลสอ จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีจำนวนฟาร์มประมาณ 100 ฟาร์ม ทำการสุ่มเก็บโดยหาจำนวนของฟาร์มที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง จากสมการ (ดำเริง จันทร์สุวรรณ, 2537) ดังนี้

$$M = N/(1 + Nd^2)$$

เมื่อ M = จำนวนฟาร์มที่จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง

d = 0.05 หรือ 5%

N = จำนวนฟาร์มของเกษตรกรรายย่อยทั้งหมด ในเขตอำเภอขามทะเลสอ จังหวัดนครราชสีมา

$$M = 100/(1 + 100(0.05^2))$$

$$= 4$$

ดังนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์และน้ำนมดิบจำนวน 4 ฟาร์ม

อาหารเลี้ยงยีสต์

ส่วนประกอบของ Malt yeast extract broth (MY broth)

malt extract	3 g
yeast extract	3 g
peptone	5 g
glucose	10 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

pH 5

ชั่งสูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ MY ตามน้ำหนักที่กำหนด ละลายลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการ และปรับ pH ให้เท่ากับ 5 บรรจุอาหารที่เตรียมได้ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C เวลา 15 นาที

ส่วนประกอบของ Malt yeast extract agar ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

malt extract	3 g
yeast extract	3 g
peptone	5 g
glucose	10 g
agar	15 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

pH 5

ชั่งสูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ MY ตามน้ำหนักที่กำหนด ละลายในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ นำไปต้มให้วุ้นละลาย เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการ ปรับ pH เท่ากับ 5 บรรจุอาหารที่เตรียมได้ในขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C เวลา 15 นาที เมื่อครบระยะเวลา เทอาหารลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่อาหารจะแข็งตัว

ภาคผนวก ข

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแผนการทดลองแบบ CRD จัดกลุ่มการทดลองแบบ factorial ที่มี 2 แฟกเตอร์

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

เมื่อกำหนดให้

X	คือ ค่าสังเกตแต่ละค่า	
μ	คือ ค่าเฉลี่ยของประชากร	
α, β	คือ อิทธิพลหลักของแฟกเตอร์ A และ B ตามลำดับ	
$\alpha\beta$	คือ ปฏิกิริยาระหว่างอิทธิพลหลัก	
ε_{ijk}	คือ ค่าความคลาดเคลื่อนในการทดลอง	
i	คือ จำนวนระดับของแฟกเตอร์ A	
j	คือ จำนวนระดับของแฟกเตอร์ B	
k	คือ จำนวนค่าสังเกตในแต่ละทรีทเมนต์	

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแผนการทดลองแบบ RCBD จัดกลุ่มการทดลองแบบ factorial ที่มี 3 แฟกเตอร์

$$X_{ijkl} = \mu + B_i + \alpha_j + \beta_k + \delta_l + (\alpha\beta)_{jk} + (\alpha\delta)_{jl} + (\beta\delta)_{kl} + (\alpha\beta\delta)_{jkl}\ \varepsilon_{ijkl}$$

เมื่อกำหนดให้

X	คือ ค่าสังเกตแต่ละค่า
μ	คือ ค่าเฉลี่ยของประชากร
B, α, β, δ	คือ ผลของบล็อก และอิทธิพลหลักเนื่องจากแฟกเตอร์ A B และ C ตามลำดับ
$\alpha\beta, \alpha\delta, \beta\delta, \alpha\beta\delta$	คือ ปฏิกิริยาระหว่างแฟกเตอร์
ε_{ijkl}	คือ ค่าความคลาดเคลื่อนในการทดลอง
i	คือ จำนวนระดับ
j	คือ จำนวนระดับของแฟกเตอร์ A
k	คือ จำนวนระดับของแฟกเตอร์ B
l	คือ จำนวนระดับของแฟกเตอร์ C

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์

การทดลองที่ 2 การศึกษาปริมาณการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ (บทที่ 4)

% การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

Source	Df	SS	MS	F value	Pr>F
Treatment	7	6781.899937	968.842848	48.63	0.0001
Product (P)	3	6077.021162	2025.673721	101.67	0.0001
pH	1	344.531250	344.531250	17.29	0.0004
P x pH	3	360.347525	120.115842	6.03	0.0033
Error	24	478.18655	19.92444		
Total	31	7260.086487			

R-Square	C.V.	SEM
0.934134	5.919755	3.156263614

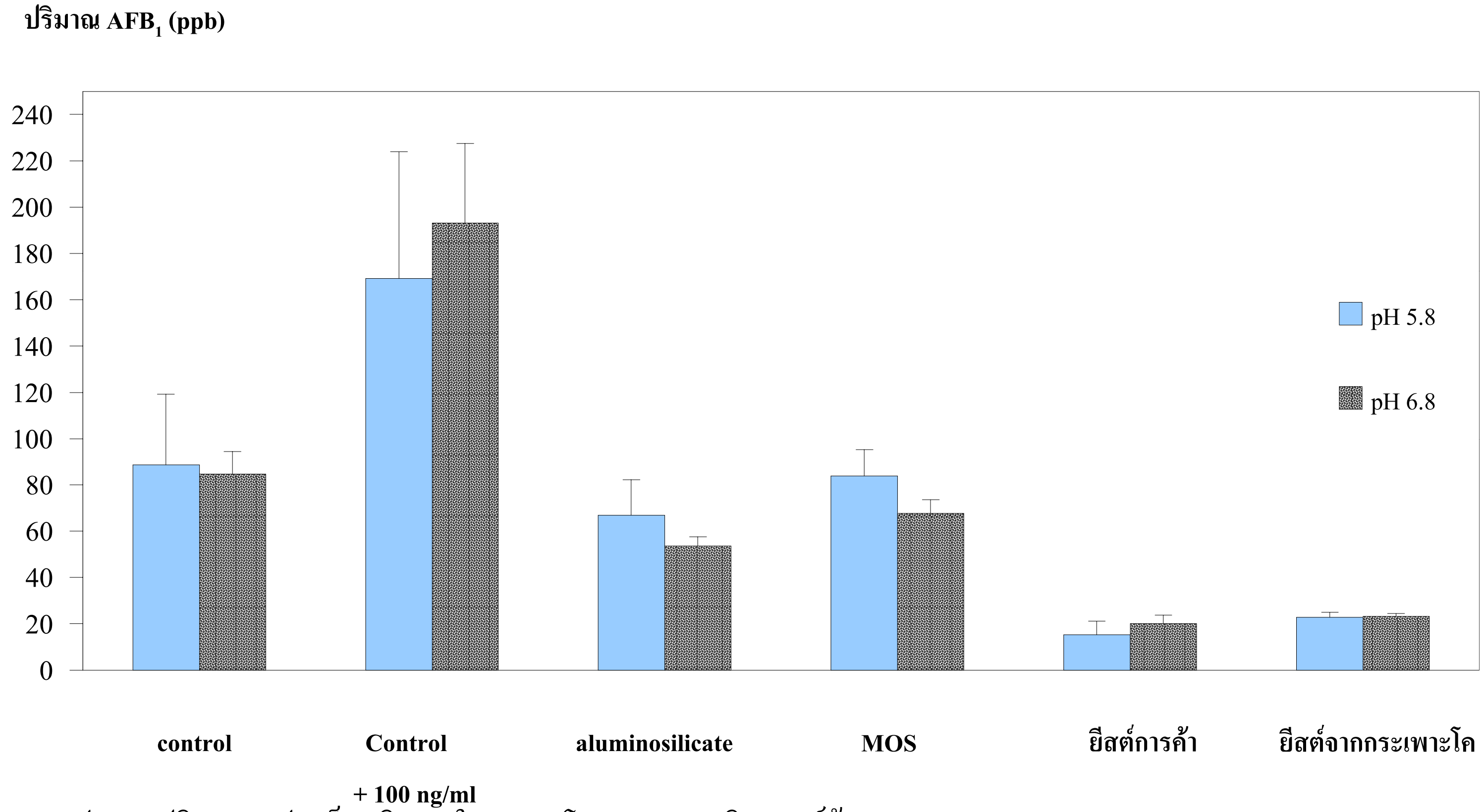
การทดลองที่ 3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ของผลิตภัณฑ์ดูดซับ (บทที่ 4)

% การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ (ยีสต์จากกระเพาะโคเปรียบเทียบกับยีสต์ทางการค้า)

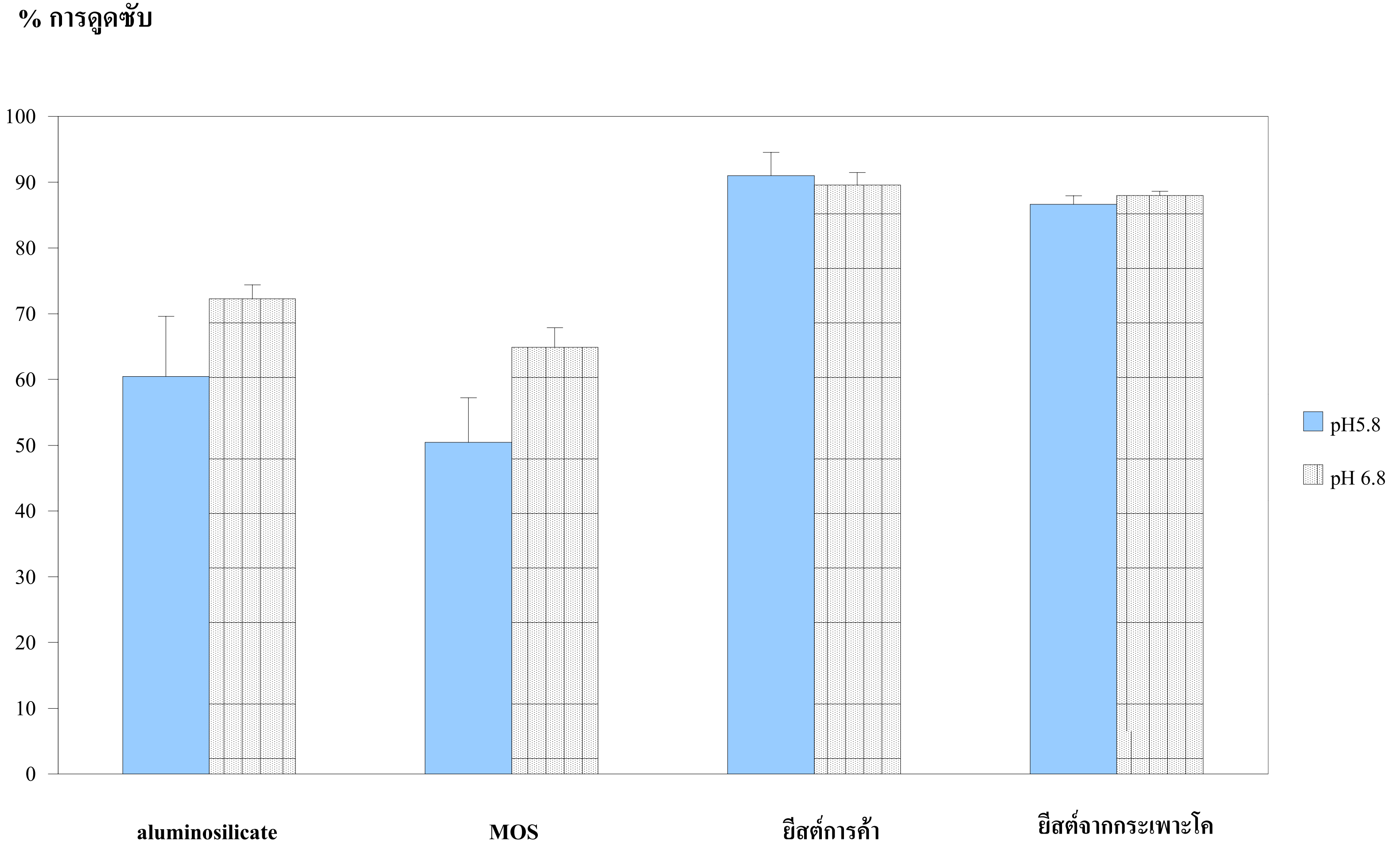
Source	Df	SS	MS	F value	Pr>F
Treatment	12	19408.98460	1617.41538	372.68	0.0001
Product (P)	1	7.735026	7.735026	1.78	0.1855
Block (B)	1	4681.766334	4681.766334	1078.76	0.0001
Concentration (C)	2	7943.572890	3971.786445	915.17	0.0001
Day (D)	1	6639.527676	6639.527676	1529.86	0.0001
PxC	2	14.697702	7.348851	1.69	0.1902
PxD	1	102.982551	102.982551	23.73	0.0001
CxD	2	16.845452	8.422726	1.94	0.1501
PxCxD	2	1.856965	0.928482	0.21	0.8078
Error	83	360.21623	4.33995		
Total	95	19769.20082			

R-Square	C.V.	SEM
0.981779	2.932799	1.473084

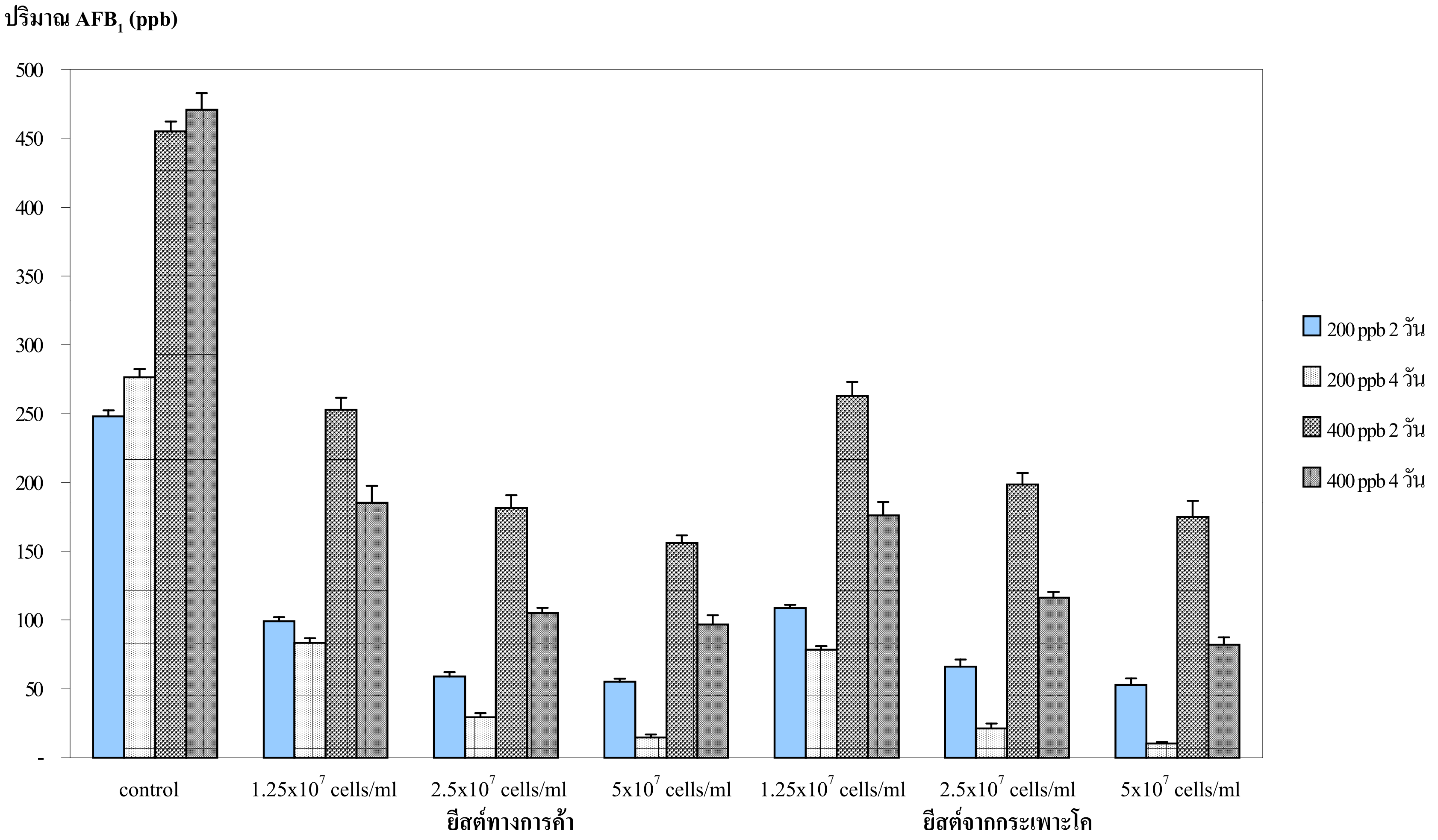
ภาคผนวก ค



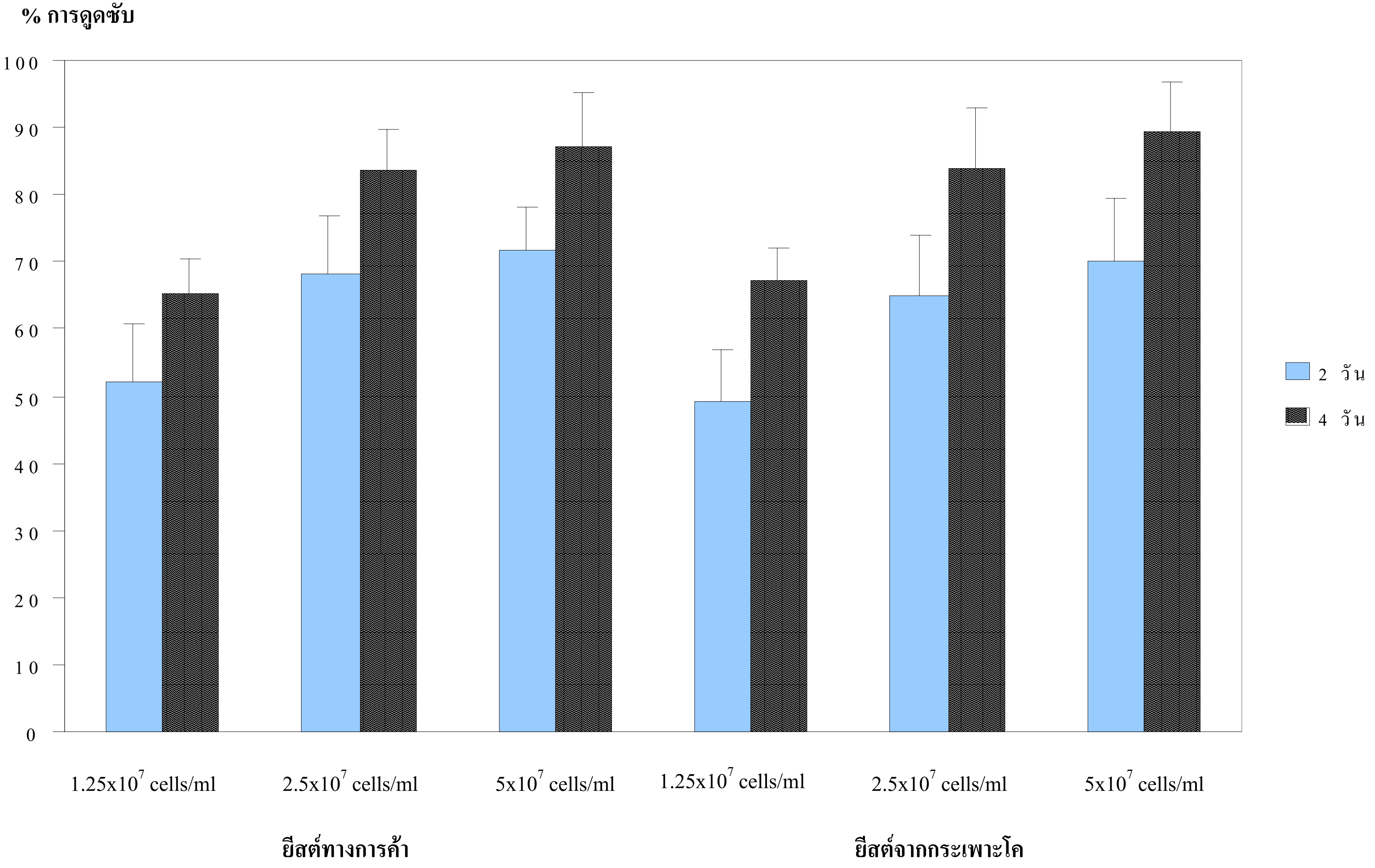
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหารโคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC



รูปที่ 4.2 กราฟแสดง % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณอะฟลาท็อกซิน B_1 ในอาหาร โคนม จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC



รูปที่ 4.4 กราฟแสดง % การดูดซับอะฟลาท็อกซิน B_1 ด้วยผลิตภัณฑ์ดูดซับ

ประวัติผู้เขียน

นายปัญญา เรืองวสุ เกิดเมื่อวันที่ 13 กันยายน พ.ศ. 2517 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2540 ภายหลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จึงเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ที่สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี