หลักและวิธีการวิเคราะห์สารพิษอะฟลา
Principle and analytical method for aflatoxin determination

ศศิประภา ชูช่วย และ ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล*
Sasiprapa Choochuay and Natthasit Tansakul
*ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน จตุจักร กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

ปัญหาสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อนในอาหารสัตว์เป็นปัญหาที่ยากจะหลีกเลี่ยงเพราะจัดเป็นสารพิษที่ปนเปื้อนได้ตามธรรมชาติ ซึ่งสารพิษจากเชื้อรามีหลายชนิดแต่ สารพิษอะฟลาเป็นสารพิษที่ได้รับความสนใจค่อนข้างมากในแถบประเทศที่ตั้งอยู่บนเขตศูนย์สูตรเนื่องจากมีการปนเปื้อนได้ง่ายและอาจพบได้ในปริมาณที่สูงพอจะก่อให้เกิดความพิษ ดังนั้นหลักและวิธีการตรวจวัดระดับการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาจึงมีความสำคัญในแง่ของการป้องกัน ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินหลากหลายวิธี ทั้งนี้การเลือกประยุกต์ใช้วิธีการวิเคราะห์จะขึ้นกับเหมาะสมตามสถานการณ์ที่ผู้ใช้ต้องการ บทความนี้จะขอกล่าวถึงหลักและวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณอย่างสังเขป

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน วิธีการตรวจวัด การวิเคราะห์ อาหารสัตว์

Abstract

Mycotoxin contamination in animal feeding stuff is hardly avoidable due to it is a kind of natural contaminant. Several mycotoxins have been described. In the tropical zone, aflatoxin is one of most interested as it commonly found with the concentration that can cause aflatoxicosis. Therefore, principle and analytical method of aflatoxin plays an important rule for the toxin prevention. In present, several methods of aflatoxin determination have been developed. Practically, the method selection depends on condition and user. This review article is focusing on principle and analytical method of aflatoxin detection both qualitative and quantitative methods.

Keyword: Aflatoxin, Determination, Analysis, Feed

---

*E-mail address: nattthasitt@yahoo.com/fvetnst@ku.ac.th โทรศัพท์: 02-5797537 โทรสาร: 02-5797537

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

สารพิษอะฟลา หรือ อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin; AF) เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus* spp. เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ซึ่งในธรรมชาติสามารถพบสารพิษได้หลายชนิด เช่น AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 หรือเมื่อสันดาปแล้วได้เป็น AFM1 เป็นต้น เมื่อมนุษย์และสัตว์ได้รับสารพิษผ่านการปนเปื้อนในอาหารจะก่อให้เกิดความเป็นพิษ (Aflatoxicosis) โดยเฉพาะ AFB1 จัดเป็นสารก่อมะเร็งที่แรง อีกทั้งอะฟลาทอกซินยังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เกิดลูกวิรูป และกดภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีมาตรการเฝ้าระวังและควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวในห่วงโซ่อาหาร เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ [1]

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินทั้งในอาหารของมนุษย์และสัตว์ เพื่อให้ได้วิธีการที่มีความรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ โดยอาจจำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) หรืออาจเรียกว่าเป็นการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรอง (Rapid screening method) ซึ่งโดยมากมักจะอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกัน (Immunological assay) ยกตัวอย่าง เช่น Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับการวิเคราะห์อีกประเภทหนึ่งคือการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล (Reference/Confirmatory method) โดยส่วนมากจะอาศัยหลักการทาง โครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์ เช่น โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นต้น [2-3]

1. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis)

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ คือ การวิเคราะห์ที่บ่งบอกว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนสารพิษหรือไม่มี ซึ่งส่วนมากจะใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันในการวิเคราะห์ หลักการของวิธีนี้จะอาศัยการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ และตรวจวัดสัญญาณโดยการใช้สารติดฉลาก เช่น สารรังสี เอนไซม์ หรือ สารเรืองแสง เป็นต้น วิธีทางภูมิคุ้มกันที่มีรายงานการใช้ตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ได้แก่ ELISA, Immunofiltration และ Lateral flow dipstick [4-6] อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันให้สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้มากขึ้น จึงอาจจัดวิธีทางภูมิคุ้มกันเป็นการวิเคราะห์เชิงกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative analysis)

1.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

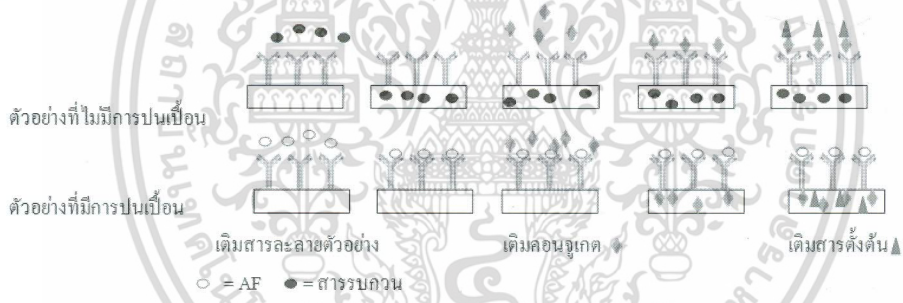
หลักการของเทคนิค ELISA คือ อาศัยความสามารถของแอนติบอดีในการจำแนกโครงสร้างของสารพิษและใช้เอนไซม์ในการตรวจวัด ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ แบบไม่แข่งขัน (Non-competitive assay) และแบบแข่งขัน (Competitive assay) โดยแบบไม่แข่งขันเกิดจากอะฟลาทอกซินในตัวอย่างจับกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์โดยตรง (Antibody-enzyme conjugate) หรือเรียกว่า Direct non-competitive ELISA หรืออาจจับแอนติบอดีตัวแรกที่จับอยู่กับแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเชื่อมกับเอนไซม์ ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า Indirect non-competitive ELISA เมื่อเติมสารตั้งต้น (Substrate) ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสี และสามารถหาปริมาณของสารพิษได้จากความเข้มข้นของสีที่เปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่แบบแข่งขันเกิดจากอะฟลาทอกซินในตัวอย่างแข่งขันกับอะฟลาทอกซินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการจับกับแอนติบอดี หากในตัวอย่างมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินมาก จะทำให้อะฟลาทอกซินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีได้น้อยลง ดังนั้นความเข้มข้นของสีจึงแปรแบบผกผันกับปริมาณของอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้อาจเกิดปัญหาความเข้มข้นของสารพิษที่ตรวจพบอาจมีค่าต่ำหรือสูงกว่าค่าจริง (Over/Under-estimation) จากสารสอดแทรกที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Matrix interference) หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาข้าม (Cross-reaction) จากชนิดย่อยของสารพิษได้ [2,5]

1.2 Immunofiltration/Flow-through assay

วิธีนี้อาศัยหลักการแข่งขันกันระหว่างแอนติเจนในตัวอย่าง และแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เพื่อจับกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงอยู่เป็นจุดบนแผ่นเมมเบรน เมื่อเติมสารตั้งต้นจะปรากฏจุดสีบนเมมเบรน หากตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษ (ภาพที่ 1) เนื่องจากแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น และเกิดจุดสีขึ้น แต่ในกรณีที่ไม่ปรากฏจุดสีแสดงว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซิน เนื่องจากอะฟลาทอกซินในตัวอย่างจะจับกับแอนบอดี ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติเจนได้น้อยลง [3] ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ใช้เวลาน้อย เครื่องมือราคาไม่แพง และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงกึ่งปริมาณได้ แต่อาจพบปัญหาจากสารสอดแทรก [6]

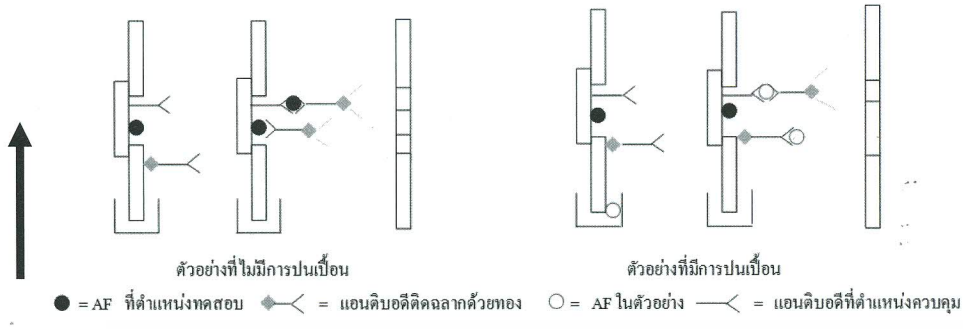


ภาพที่ 1. หลักการทำงานของวิธีการ Immunofiltration ดัดแปลงจาก [2]

1.3 Lateral flow dipstick/Lateral flow immunoassay (LFIA)

หลักการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้อาศัยการไหลของสารละลายตัวอย่างบนแผ่นเมมเบรน การอ่านผลจะอ่านจากแถบสีที่ปรากฏ โดยตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินจะปรากฏแถบสีเพียงแถบเดียว เนื่องจากแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยทอง (Gold-antibody conjugate) จะจับกับอะฟลาทอกซินในตัวอย่างและแอนติบอดีที่ตำแหน่งควบคุม แต่ไม่จับกับอะฟลาทอกซินที่ตำแหน่งทดสอบ ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนจะปรากฏแถบสีสองแถบ เนื่องจากแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยทองจะอยู่ในรูปอิสระ จึงจับทั้งแอนติบอดีที่ตำแหน่งควบคุม และอะฟลาทอกซินที่ตำแหน่งทดสอบ (ภาพที่ 2) การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย ใช้เวลาไม่นาน และสามารถนำไปใช้ในงานภาคสนามได้เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ แต่พบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องของความไวในการวิเคราะห์ [5,7]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2. โครงสร้างและหลักการของวิธี LFIA ดัดแปลงจาก [4]

2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณคือ การวิเคราะห์ที่สามารถบอกถึงความเข้มข้นที่แน่นอนของสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งนิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์ หลักการของเทคนิคนี้จะอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างในเฟส 2 เฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เทคนิคโครมาโทกราฟีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมทรี เป็นต้น

2.1 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)

หลักการของวิธีนี้อาศัยความสามารถของเฟสเคลื่อนที่ในการพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปตามเฟสอยู่กับที่ ซึ่งเคลือบอยู่บนแผ่นกระจกหรืออะลูมิเนียม ข้อดีของวิธีนี้ คือทำง่าย และต้นทุนต่ำ แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลานาน มีความไวและความจำเพาะต่ำเมื่อเทียบกับเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดอื่น จึงไม่จัดเป็นการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ อะฟลาทอกซินในอาหารและวัตถุดิบอาหารสัตว์หลายชนิด [8]

2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมเพื่อหาชนิดและปริมาณของสารที่วิเคราะห์ โดยอาศัยแรงดันในการพาเฟสเคลื่อนที่และสารละลายตัวอย่างผ่านเฟสอยู่กับที่ ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ โดยจะมีการสร้างแรงหน่วงระหว่างสารชนิดต่างๆในสารละลายตัวอย่างกับเฟสอยู่กับที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้นและตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ สำหรับอะฟลาทอกซินจะใช้รังสี อัลตร้าไวโอเลต (UV) หรือฟลูออเรสเซนต์ในการตรวจวัด และอาจเพิ่มความไวในการวิเคราะห์โดยอาศัยกระบวนการทำอนุพันธ์ (Derivatization) ของอะฟลาทอกซิน ได้แก่ การทำอนุพันธ์ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ (Pre-column derivatization) เช่น การเติมกรดไตรฟลูออโรอะซิติก หรือการทำอนุพันธ์หลังจากผ่านคอลัมน์ (Post-column derivatization) เช่น การเติมโบรไมด์ หรือไอโอดีน [9-11]

อีกวิธีหนึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการนำพาสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ผ่านทาง HPLC และตรวจวัดปริมาณสารด้วยเครื่องแมสเปกโทรเมทรี จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า ลิควิด โครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมทรี (Liquid Chromatography Mass Spectrometry; LC-MS) โดย แมสเปกโทรเมทรีเป็นเทคนิคที่ใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร และศึกษาถึงโครงสร้างโมเลกุล โดยการวัดค่ามวลต่อประจุของไอออน ซึ่งวิธีการนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราวมทั้ง เมทาโบไลท์ได้หลายชนิดในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว แต่ต้นทุนในการวิเคราะห์สูง เครื่องมือราคาแพง และมักพบปัญหาการกดการแตกตัว (Ionization suppression) หรือกระตุ้นการแตกตัว (Ionization enhancement) จากสารรบกวน ซึ่งจะผลต่อค่าร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืน (% Recovery) [3]

3. เทคนิคการวิเคราะห์อื่นๆ

3.1 Biosensors

Biosensors ประกอบด้วยส่วนของตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณเฉพาะให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า และสารชีวภาพ (Biological substances) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะเจาะจง โดยในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินมักใช้แอนติบอดีเป็นสารชีวภาพ จึงอาจเรียกวิธีนี้ว่าอิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor) (ภาพที่ 3) การจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนจะทำให้สมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีเปลี่ยนไปซึ่งจะถูกตรวจด้วยตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ และสัญญาณตอบสนองที่วัดได้จะสัมพันธ์กับปริมาณของสารพิษ ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย มีความไว ต้นทุนต่ำ และใช้เวลาไม่นานแต่มีความแม่นยำน้อยกว่าวิธีทางโครมาโทกราฟี [12-13]

ภาพที่ 3. หลักการทำงานของอิมมูโนเซนเซอร์ ดัดแปลงจาก Paniel *et al.* [14]

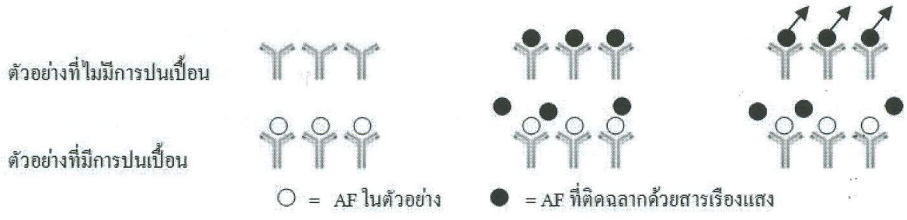
3.2 Fluorometry/Fluorometric assay

วิธีนี้เป็นการวัดการเรืองแสงของอะฟลาทอกซินหลังจากการทำอนุพันธ์ด้วยสารละลายโบรไมด์ โดยเครื่อง Fluorometer จัดเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ มีความสะดวก รวดเร็ว ใช้สารเคมีเพียงเล็กน้อย ต้นทุนต่ำ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนเมื่อเทียบกับวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ อย่างไรก็ตาม อาจพบปัญหาผลบวกเทียม (False positive) จากสารสอดแทรกได้ง่าย และไม่สามารถตรวจแยกชนิดย่อยของอะฟลาทอกซินได้ [2,5]

3.3 Fluorescence polarization (FP)

วิธีนี้อาศัยการตรวจวัดระนาบแสง (Polarization) ของสารพิษที่ติดฉลากด้วยสารที่สามารถเรืองแสงได้ (Tracer) เช่น ฟลูออเรสเซนต์ โดยกรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดี ทำให้อะฟลาทอกซินที่ติดฉลากอยู่ในรูปอิสระซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จึงเกิดการหมุนได้รวดเร็ว ทำให้ระนาบของแสงต่ำ แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่ติดฉลากจะจับกับแอนติบอดีเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การหมุนเกิดขึ้นช้าลง ทำให้ระนาบแสงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้อาจเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) จากสารสอดแทรกได้ [2,5]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4. หลักการทำงานของวิธี FP ดัดแปลงจาก [2]

3.4 Fluoerescence labeled optical – read immuno dipstick assay (FLORIDA)

เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและมีความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถตรวจวัดโดยอาศัยหลักการเดียวกันกับวิธี LFIA แต่ใช้สารเรืองแสงเช่น ฟลูออเรสเซนต์เป็นสารติดฉลาก การอ่านผลจะอ่านจากแถบสีเช่นเดียวกัน คือกรณีที่ตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษจะปรากฏแถบสีขึ้น 2 แถบ แต่กรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนจะปรากฏแถบสีเพียงแถบเดียว [5]

3.5 Capillary Electrophoresis (CE)

CE เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า คือ สารละลายบัฟเฟอร์จะบรรจุอยู่ใน silica capillary ซึ่งภายในมีสนามไฟฟ้า การแยกจะเกิดจากการเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้าจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ และตรวจวัดสัญญาณด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตหรือฟลูออเรสเซนต์ วิธีนี้จะมีข้อดีคือลดการใช้ตัวทำละลาย ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย และสามารถเพิ่มความไวโดยการทำอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซิน [5]

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ดังที่กล่าวมาแล้ว อะฟลาทอกซินจัดเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้งของมนุษย์และสัตว์ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์เพื่อจำกัดหรือลดความเสี่ยงของการเกิดความเป็นพิษ ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณหลากหลายวิธี ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของสารพิษอะฟลาในตัวอย่างตามมาตรฐานเช่น กระทรวงเกษตรของสหรัฐ (USDA) จะใช้เทคนิค Fluorometry หรือ TLC ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และจะใช้วิธีทางโครมาโตกราฟีเช่น HPLC ในการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล สำหรับในประเทศไทยโดยกรมปศุสัตว์จะใช้เทคนิค Fluorometry ในการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรอง และใช้ HPLC ซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard method) เช่นเดียวกัน ซึ่งพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์และพระราชบัญญัติอาหารโดยประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์หรือกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้ยอมรับค่าการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในระดับที่ต่างกันขึ้นกับประเภทตัวอย่างและชนิดสัตว์ ตั้งแต่ 0.5 ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัมในน้ำนม หรืออยู่ในช่วง 40-500 ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัมในวัตถุดิบอาหารสัตว์และอยู่ในช่วง 30-200 ไมโครกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัมในหัวอาหารสัตว์และอาหารสัตว์ผสมแล้ว เป็นต้น ดังนั้นการเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์จึงต้องเลือกประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมตามกับสถานการณ์ ตามชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างหรือระดับความเข้มข้นสารพิษที่ยอมรับให้มีได้รวมถึงกฎระเบียบที่กำหนดในแต่ละประเภทตัวอย่างหรือแต่ละประเทศที่กำหนดไว้แตกต่างกัน

ตาราง สรุปข้อดีและข้อด้อยของวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

วิธีการวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อด้อย
วิธีทางภูมิคุ้มกัน		
ELISA	ง่าย ต้นทุนต่ำ มีความไวในการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างต่อครั้งใช้ตัวทำละลายน้อย	เกิดปฏิกิริยาข้ามอาจเกิดผลบวกเทียมหรือผลลบเทียม ต้องทำการยืนยันผลด้วยวิธีที่น่าเชื่อถือ
Immunofiltration	ทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย เครื่องมือราคาไม่แพง	เกิดปฏิกิริยาข้ามจากสารรบกวน
LFIA	สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนที่ง่าย ไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ราคาไม่แพง	เกิดปฏิกิริยาข้ามจากสารรบกวน
วิธีทางโครมาโทกราฟี		
TLC	มีขั้นตอนที่ง่าย และต้นทุนต่ำ	ใช้เวลานาน มีความไวและความจำเพาะต่ำ
HPLC	มีความไวในการวิเคราะห์ มีความจำเพาะถูกต้อง แม่นยำ ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียงเล็กน้อย	เครื่องมือราคาแพง อาศัยผู้มีความรู้ความชำนาญ ต้องทำอนุพันธ์เพื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์
LC-MS	สามารถวิเคราะห์สารพิษได้หลายชนิดต่อครั้งไม่ต้องทำอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซิน	เครื่องมือมีราคาแพง อาศัยผู้มีความรู้ความชำนาญในการวิเคราะห์ อาจเกิดปัญหาจากสารรบกวนในตัวอย่าง
วิธีอื่นๆ		
Biosensors	มีวิธีการที่ง่าย ตัวอย่างไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ราคาไม่แพง	เกิดปฏิกิริยาข้าม ความแม่นยำต่ำ
Fluorometry	สะดวกรวดเร็ว มีความปลอดภัยสำหรับผู้วิเคราะห์ ต้นทุนต่ำ ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน	ต้องทำอนุพันธ์อะฟลาทอกซิน อาจเกิดปัญหาผลบวกเทียม ไม่สามารถแยกชนิดของสารพิษได้
FP	มีวิธีการที่ง่าย ตัวอย่างไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์	เกิดปฏิกิริยาข้ามจากสารรบกวนในตัวอย่าง
FLORIDA	มีขั้นตอนที่สะดวก ง่ายต่อการวิเคราะห์	เกิดปฏิกิริยาข้ามจากสารรบกวน
CE	ใช้ตัวทำละลายและตัวอย่างปริมาณน้อย	ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ

เอกสารอ้างอิง (References)

[1] Lee, N.A. and Rachmawati, S. 2006. A rapid ELISA for screening aflatoxin B1 in animal feed and feed ingredients in Indonesia. *Food and Agricultural Immunology,* 1-14.

[2] Zheng, M.Z., Richard, J.L. and Binder, J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. Mycopathologia, 161, 261-273.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[3] Reiter, E., Zentek, J. and Razzazi, E. 2009. Review o sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. Molecular Nutrition & Food Research, 53, 508-524.

[4] Li, P., Zhang, Q. and Zhang, W. 2009. Immunoassays for aflatoxins. Trends in Analytical Chemistry, 28(9), 1115-1126.

[5] Pittet, A. 2005. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 96, 424-444.

[6] Saha, D., Roy, D. and Dhar, T.K. 2013. Immunofiltration assay for aflatoxin B1 based on the separation of pre-immune complexes. Journal of immunological methods, 392, 24-28.

[7] Laura, A., Gilda, D.A., Marianna, C., Claudio, B., Cristina, G. and Gianfrance, G. 2011. Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. Food Additives and Contaminants, 28(2), 1-22.

[8] Stroka, J. and Anklam, E. 2000. Development of simplified densitometer for the determination if aflatoxins by thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A, 904, 263-268.

[9] ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล, กมลชัย ตรงวานิชนาม, ปารียา อุดมกุศลศรี และ ศศิธร ลิ้มสุวรรณ. 2557.การปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินและออกคราทอกซิน เอ ในอาหารสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย. สัตวแพทย์มหานครสาร, 9(1), 1-9. [Natthasit Tansakul, Kamolchai Trongvanichnam, Pareeya Udomkusonsri and Sasithorn Limsuwan. 2014. A survey of aflatoxins and ochratoxin A contamination in pet food in Thailand. *J. Mahanakorn Vet Med,* 9(1), 1-9. (in Thai)]

[10] Muscarella, M., Lammarino, M., Nardiello, D., Magro, S., Palermo, C., Centonze, D. and Palermo, D. 2009. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1,B2,G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants: Part A,* 26(10), 1402-1410.

[11] Sirhan, A.Y, Tan, G.H., Al-Shunnaq, A., Abdulrauf, L. and Wong, R.C.S. 2014. QuEChERS-HPLC method for aflatoxin detection of domestic and imported feed in Jordan. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 37, 321-342.

[12] ศิริวรรณ ตี๋ภู่. 2555. การประยุกต์ใช้อิมมูโนเซนเซอร์สำหรับการวิเคราะห์ทางอาหาร. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 17(2), 197-204. [Siriwan Teepoo. 2012. Applications of immunosensors for food analysis. *Burapha Sci.* J., 17(2), 197-204. (in Thai)]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[13] Cigic, I.K. and Prosen H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International of Molecular Sciences,* 10, 62-115.

[14] Paniel, N. Radoi, A. and Marty, J. 2010. Development of electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in milk. Sensor, 10, 9439-9448.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้