การตรวจสอบการสร้างสารพิษออคราทอกซิน เอ ของเชื้อรา ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ชนัญญา ช่วยศรีนวล
นักวิจัยปฏิบัติการ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ออคราทอกซิน (Ochratoxin) เป็นสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม Cyclic pentaketide มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ ออคราทอกซิน เอ บี และซี ซึ่งความเป็นพิษจะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้าง โดยออคราทอกซิน เอ มีความเป็นพิษสูงสุด จัดเป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B สารที่อาจจะก่อมะเร็งในคนได้ (Possibly carcinogenic for humans) มีความเป็นพิษต่อไตและตับทั้งในคนและสัตว์ เป็นสารกดภูมิคุ้มกัน สารก่อมะเร็งในระบบทางเดินปัสสาวะ และก่อให้เกิดลูกวิรูปในสัตว์ทดลอง (IARC, 1976) เชื้อราที่สามารถสร้างสารออคราทอกซิน คือ เชื้อราในสกุล *Aspergillus* เช่น *A. ochraceus*, *A, alliaceus, A. niger*, *A. carbonarius* และสกุล *Penicillium* เช่น *P. verrucosum* (Samson *et al*., 2004) เชื้อราดังกล่าวมักพบปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ เมล็ดโกโก้ ถั่วลิสง เมล็ดกาแฟ และเครื่องเทศ (Abrunhosa *et al.* 2010) หากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เชื้อรามีโอกาสเจริญและสร้างสารพิษปนเปื้อนในอาหาร ปัจจุบันคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO (The Codex Alimentarius Commission) และกลุ่มประชาคมยุโรป (EU) ได้กำหนดปริมาณออคราทอกซินสูงสุดที่ยอมรับได้ในเมล็ดธัญพืชและเครื่องเทศที่ใช้เป็นวัตถุดิบไม่เกิน 2-20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการสร้างออคราทอกซินของเชื้อรา จึงมีความจำเป็นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธีการควบคุมและเฝ้าระวัง อันตรายที่จะเกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในชีวิตประจำวัน

เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) เป็นวิธีการสำหรับแยกและตรวจสอบสารตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ผลได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงกึ่งปริมาณ มีข้อดี คือ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ต้นทุนวิเคราะห์ไม่แพง และวิธีการไม่ซับซ้อน สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบการสร้างสารพิษออคราทอกซินของเชื้อราด้วยเทคนิค TLC สามารถทำได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อราและสกัดสารพิษออคราทอกซินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Penicillium* มาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ เช่น Yeast extract sucrose agar (YES) (Esteban *et al*., 2006) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นโดยใช้ Cork borer น้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมเมทานอล (AR grade) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยเครื่อง Sonicator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยตัวกรองชนิดไนล่อน (Nylon membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารสกัดลงในขวดสีชา

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษออคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี TLC

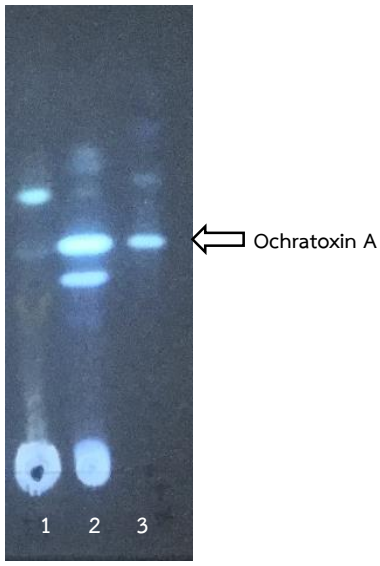
แผ่น TLC ที่ใช้การแยกและตรวจสอบสารพิษออคราทอกซิน เอ เป็นชนิด TLC silica gel 60 โดยจะต้องทำการ Pre-develop โดยการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว Develop ใน TLC chamber โดยใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (1:1) (v:v) ให้เฟสเคลื่อนที่ไป 80 มิลลิเมตร ตั้งทิ้ง

ไว้ในตู้ระเหย เมื่อแผ่น TLC แห้งสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้ทันที แต่หากยังไม่ใช้ทันที ให้นำไปเก็บในเดสซิเคเตอร์ (Desiccator) ต่อมานำสารมาตรฐานออคราทอกซินความเข้มข้นต่างๆ และสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น TLC นำไป Develop ใน TLC chamber โดยใช้สารละลายโทลูอีน: เอธิลอะซีเตต: กรดฟอร์มิค (6:3:1) (v/v) (AOAC 970.44, 2005) โดยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระยะทางเท่ากับ 70 มิลลิเมตร

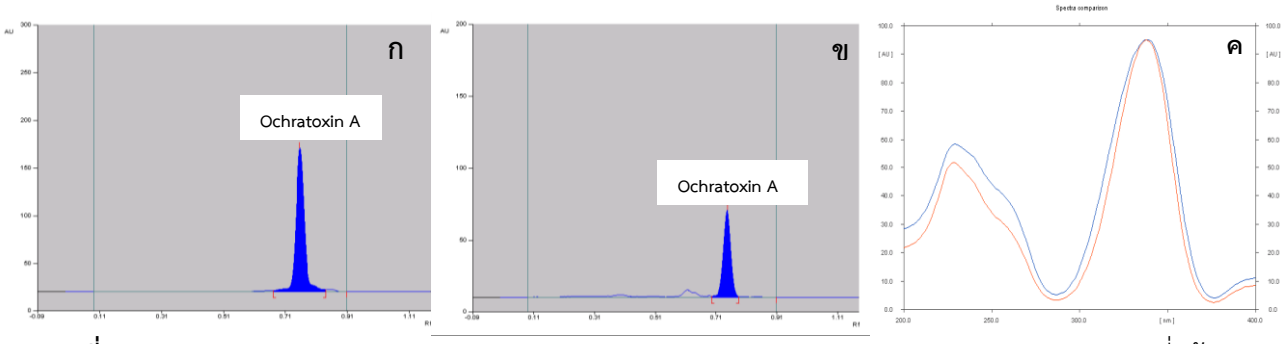
3. การตรวจสอบสารออคราทอกซินที่แยกได้บนแผ่น TLC

3.1 นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV 366 นาโนเมตร ทำการเปรียบเทียบสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานโดยใช้ค่า R_f และการเปรียบเทียบสี โดยสารออคราทอกซิน เอ จะมีสีฟ้าอมเขียว (ภาพที่1) การวิเคราะห์ผลทำได้โดยเปรียบเทียบความเข้มของจุด (Spot) ที่เป็นออคราทอกซินในตัวอย่างกับความเข้มข้นของจุด (Spot) สารออคราทอกซินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น สามารถแปลผลได้ทั้งแบบเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณ

3.2 การอ่านค่าด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (Camag TLC Scanner3) โดยใช้ Fluorescence mode ที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร (ภาพที่ 2ก และ 2ข) สามารถวิเคราะห์ข้อมูลในแบบเชิงปริมาณได้โดยเปรียบเทียบค่าพื้นที่พีคของสารในตัวอย่างกับสารมาตรฐานออคราทอกซิน เอ ที่ทราบความเข้มข้น โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน (AOAC 970.44, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันผลด้วยเปรียบเทียบลักษณะของสเปกตรัมที่ช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร (ภาพที่ 2ค)



ภาพที่ 1 การตรวจสอบสารออคราทอกซินบนแผ่น TLC ด้วยแสง UV 366 นาโนเมตร
1: Negative sample
2: Positive sample
3: สารมาตรฐานออคราทอกซิน เอ



ภาพที่ 2 TLC densitogram ของสารมาตรฐานออคราทอกซิน เอ (ก) และสารออคราทอกซิน เอ ที่สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus* (ข) ที่ได้จากการอ่านค่าด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร และการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารมาตรฐานออคราทอกซิน เอ และออคราทอกซิน เอ ที่สร้างโดยเชื้อราโดยการสแกนที่ความยาวคลื่นในช่วง 200-400 นาโนเมตร (ค)

เอกสารอ้างอิง

Abrunhosa, L., R. R. M. Paterson and A. Venâncio. 2010. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxin**. (2): 1078-1099.

AOAC. 2005. **Official Methods of Analysis of AOAC International Volumn**. 18th ed. Horxitz, W. Editor. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Esteban, A., M. L. Abarca, M. R. Bragulat and F. J. Cabanes. 2006. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. **International Journal of Food Microbiology.** 108: 188-195.

International Agency for Research on Cencer (IARC). 1976. Ochratoxin A. In Some Naturally Occurring Substances, pp. 191-197. *In* **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.** Lyon, France

Samson, R. A., J. Houbraken, A. F. A. Kuijpers, J. M. Frank and J. C. Fridvad. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Study in mycology.** 50: 45-61.

_____, E. Hoekstra, F. Lund, O. Filtenborg and J. C. Frisvad. 2000. Methods for detection, isolation and characterization of food–borne fungi, pp. 283–297. *In* R. A Samson and A. Hoekstra., *eds*., **Introduction to Food-Borne Fungi**. AmerSociety for Microbiology, Netherlands.