



วารสารพิษวิทยาไทย

Thai Journal of Toxicology

Volume 24, Number 2, July - December 2009



The 2nd National Conference
in Toxicology

Toxicological Issues: The Challenge
in the 21st Century

Proceedings

The 2nd National Conference in Toxicology

17-18 December 2009
Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok

Special Issue





วารสารพิษวิทยาไทย

Thai Journal of Toxicology

ISSN 0857-264X

เจ้าของ สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย

สำนักงาน สถาบันคลังสมองของชาติ ๕๓๙/๒ อาคารมหานครยิบซัมชั้น ๑๕
ถนนศรีอยุธยา ราชเทวี กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐
โทรศัพท์. ๐๒ ๖๔๐-๐๔๖๑ ต่อ ๑๑๐ โทรศัพท์ ๐๒ ๖๔๐-๐๔๖๕

คณะที่ปรึกษา

รศ.ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต	ศ.เกียรติคุณ ดร. ไมตรี สุทธจิตต์
ศ.ดร. ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์	ดร. วรณี คูสำราญ
ดร. นวลตา ม่วงน้อยเจริญ	ดร. สุมล ปวีตรานนท์
รศ.ดร. พาลาภ สิงหเสนี	

กองบรรณาธิการ

ดร. จินตนา ศิริวราศัย	รศ. ดร. วงศ์วิวัฒน์ ทศนียกุล
รศ. ดร. จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์	ศ. ดร. วรณัฐ ศุภพิพัฒน์
คุณบุษบา พฤษธาราธิกุล	ดร. วรณี คูสำราญ
รศ. ปัญญา เต็มเจริญ	ผศ.ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์
รศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์	รศ.ดร. ศรีสกดิ์ สุนทรไชย
ดร. พิมพ์ภา วณสวัสดิ์	ดร. สุมล ปวีตรานนท์
สพ.ญ. เพียงใจ คูประดินันท์	รศ.ดร.สพญ. อนงค์ ปิณฑวิหค
ศ.เกียรติคุณ ดร. มาลิน จุลศิริ	ผศ.ดร. อภิชัย ดาวฉาย

บรรณาธิการ รศ.พญ. กนกรัตน์ ศิริพานิชกร
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
๔๒๐/๑ ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร ๑๐๔๐๐
โทรศัพท์ ๐๒ ๓๕๔-๘๕๔๓ ต่อ ๖๕๐๕ โทรศัพท์ ๐๒ ๓๕๔-๘๕๓๘
Email: phksr@mahidol.ac.th

ฝ่ายการเงิน รศ.ดร.สพญ. อนงค์ ปิณฑวิหค

ฝ่ายจัดการ คุณพัชยา มาสมบุญ

กำหนดออก ปีละ ๒ ฉบับ

พิมพ์ที่ บริษัท มาชลองคูน-ซีเอสพี จำกัด โทรศัพท์ ๐๒ ๙๔๓-๘๗๘๗-๘

THAI JOURNAL OF TOXICOLOGY

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Thai Journal of Toxicology (TJT) is the official journal of **Thai Society of Toxicology**. The objective of TJT is to publish peer-reviewed, hypothesis-driven, original research articles, as well as important reviews, commentary that are relevant to diversify area of toxicology. Articles may involve laboratory experiments, epidemiological or clinical studies.

General Guideline: Three copies of manuscript (2 copies omit authors/ address/ acknowledgments for peer review) should be submitted to the editor by mail. The cover letter should include name, address, telephone, fax number and e-mail address. All authors listed on the cover page must sign a statement indicating that they have approved of the contents of the submitted manuscript. A diskette or CD should be submitted together with hard copy of manuscript.

Correspondence and Mailing Information:

Kanokrat Siripanichgon
Editor, Thai Journal of Toxicology
Department of Microbiology,
Faculty of Public Health, Mahidol University
420/1 Rajvithi Road, Rajthwee,
Bangkok 10400 Thailand
Tel: 02 354 8543 ext 6505 Fax: 02 354 8538
E-mail: phksr@mahidol.ac.th

Preparing a Manuscript:

1. The manuscript could be written in English or Thai. The maximum length of the article is 15 pages including tables, figures, references and abstracts/key words. Thai and English versions of abstracts must be submitted and limited to 250 words. Type the abstract in 1-2 paragraphs.
2. The manuscript should be typed with 1-inch margins at all sides, on one side of A-4 paper. A current copy of the Thai Journal of Toxicology will show the correct format and style.
3. **Fonts:**
Thai – Angsana 16 – single line spacing
English – Times New Roman 12 – 1.5 line spacing
4. **Tables and Figures:** Table and figure should be typed on separate pages.
5. **References:** Number references in superscript in the order cited in the text. References must be verified by the author(s) against the original documents. For articles printed in a language other than English, indicate the language in

parentheses after the article title. For more than 3 authors, list the first 3 and add “*et al*”. The title of journal should be abbreviated according to the *List of Journals Indexed in Index Medicus*. Telescope page numbers, e.g. 125-9, 181-95.

Examples of Reference Style:

Journal article

Cromwell L, Lindemann MD, Randolph JH, *et al*. Soybean meal from roundup ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. *J Anim Sci* 2002; 80: 708–15.

Brake DG, Evenson DP. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. *Food Chem Toxicol* 2004;42: 29–36.

Book

Olson KR. Poisoning & drug overdose.^{5th} ed. New York: McGraw-Hill, 2006: 52-8.

Joint FAO/IAEA/WHO. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. WHO Technical Report Series 890. Geneva: WHO, 1999.

Bradley C. Measuring quality of life in diabetes. In: Marshall SM, Home PD, Rizza RA, eds. The Diabetes Annual 10. Amsterdam: Elsevier Science, 1996: 207-24.

Conference proceedings

Harley NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, eds. Indoor air and human health. Proceedings of the 7th Life Sciences Symposium; 1984 Oct 29-31; Knoxville (TN). Chelsea (MI): Lewis; 1985, 69-78.

Website

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995;1: 7-15. Available at <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>, accessed Jun 5, 1996.

FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 2001. Available at http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf, accessed Aug10, 2005.



วารสารพิษวิทยาไทย

Thai Journal of Toxicology

ปีที่ ๒๔ ฉบับที่ ๒ กรกฎาคม-ธันวาคม ๒๕๕๒

Vol. 24 No. 2 July- December 2009

สารบัญ

สารสั้นจากนายกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย	1
สารสั้นจากนายกสมาคมพิษวิทยาคลินิกแห่งประเทศไทย	2
สารสั้นจากอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	3
Message from the President of TEMS	4
สารสั้นจากผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์	5
กำหนดการประชุมพิษวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒	6
Keynote: เหตุเกิดที่มาบตาพุด	
รศ. พญ. พรพันธุ์ บุญยรัตพันธุ์	11
Symposium 1: Global Warming and Emerging Issues in Toxicology	
Food - borne Poisonings	
รศ.นพ. วินัย วนานุกูล	12
Toxic Gas from Fermentation	
รศ.พญ. สุดา วรรณประสาท	13
Marine Envenomations and Poisonings	
ผศ.นพ. สัมมน โฉมฉาย	14
Symposium 2: คุณภาพและความปลอดภัยของยาแผนโบราณ	
ปัญหาการใช้ยาแผนโบราณ	
ภญ. วิมล สุวรรณเกษาวงษ์	18
กระบวนการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ	
ภก. ธนิต ตริธพันธุ์	20
Symposium 3: อาหารกับการป้องกันมะเร็ง	
บทบาทของอาหาร โภชนาการ การออกกำลังกายกับการป้องกันมะเร็งในมุมมองของผู้เชี่ยวชาญทั่วโลก	
ผศ. ดร. ชนิพรณ บุตรย์	21
ศักยภาพด้านมะเร็งของตำรับอาหารไทย	
ผศ. ดร. สมศรี เจริญเกียรติกุล	29
พืช ผัก สมุนไพรไทย ด้านมะเร็ง กับวัฒนธรรมการบริโภคที่ต้องเปลี่ยนแปลง	
ดร. พรทิพา พิชา	39
Symposium 4: Progress in Nanotechnology	
Nanotoxicology: A Safety Evaluation of Nanomaterials	
ดร. รวิวรรณ มณีรัตน์โชติ	40
Challenge: Development of Regulation and Control of Nanomaterial Safety in Consumer Products	
ดร. ออรัศ คงพานิช	44
Symposium 5: Controversies in Pesticide Poisoning	
Treatment of Paraquat Poisoning	
ผศ.นพ. สัมมน โฉมฉาย	45
Controversies in Pesticide Poisoning	
รศ.นพ. วินัย วนานุกูล	50

สารบัญ (ต่อ)

Plenary Lecture 1: พิษวิทยากับ พ.ร.บ.ความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัยพ.ศ. 2551	
คุณสุวิทย์ วิจิตรโสภา	51
Symposium 6: Controversies in Mercury Poisoning	
Mercury the Culprit?	
ผศ.นพ. สุชัย สุเทพารักษ์.....	56
Safety of Amalgam	
ผศ. ทญ. ดร. ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์.....	57
Symposium 7: Toxicogenomics	
Genetic Epidemiology of Breast Cancer in Thai Women	
ดร. ศุภีพร แสงกระจ่าง	62
Pharmacogenomics and its Applications	
อ. ทพญ. ดร. สรณันท์ จันทรางศุ	63
Special Lecture: Controversies in the Management of Snakebites	
ผศ.นพ. สุชัย สุเทพารักษ์.....	64
Plenary Lecture 2: Emerging Food Safety Problems	
รศ.ดร.ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต	70
Research Articles	
Detection of urinary kidney injury molecule-1 in a chronic cadmium exposed population, Mae Sot District, Tak Province	
Amnat Panyamoon, Kowit Nambunmee, Muneko Nishijo, et al.	72
Effects of bran extracts from Thai molecular breeding rices on growth and apoptosis in human promyelocytic leukemia cells	
Supanart Srisala, Rodjana Chunhabundit, Ratchanee Kongkachuichai, et al.....	81
Cytoprotective and cytotoxic effects of rice bran extracts on H ₂ O ₂ - induced oxidative damage in human intestinal Caco-2 cells	
Bunyada Jittorntrum, Rodjana Chunhabundit, Ratchanee Kongkachuichai, et al.....	92
Effect of aqueous extract from <i>Cleistanthus nervosum</i> on oxidative status in rat liver	
Taya S, Punvittayagul C, Chewonarin T, and Wongpoomchai R.....	101
Anti-oxidative stress activities of silibinin on α -Amanitin in vitro	
Khunnala A, Narongchai S, Butkrachang S, et al.....	106
Butylated hydroxytoluene in edible vegetable oils from local markets of Chiang Mai and Mae Hong Son and its thermal stability in different cooking conditions	
Likhitrungat C, Chokethaworn N, and Suttajit M.....	113
DNA extraction from buccal cells for determination of nucleotide polymorphism at rs 1800497 position in dopamine D2 receptor gene	
Pitsinee Inthi, Manit Srisuraphanont, Surinpon Likhitsatien, et al.....	119
การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการประเมินการเกิดอะพลาทอกซิน ในข้าวโพดไทยที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์	
อนงค์ บิณฑุวิทย์, ศุภวิน วัชรมูล, วิสสุทธิ์ นวลชื่น, และคณะ	124
ปริมาณไนโตรเจนในแอมมอด แอมมอยา หนุ่ยถั่ว และถั่วเขียวและได้กรอกอสีฐานที่มีจำหน่ายในตลาดของเชียงใหม่	
นรรัตน์ ภักธววรรณ และนันท์ฤทธิ ไชคถาวร	130
การประเมินสุขภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าวระดับชุมชน ในจังหวัดสมุทรสงคราม	
จันทร์ฉาย ประกอบศิลป์, เวณิกา เบ็ญจพงษ์, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, และวีรยา การพานิช.....	136
สถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลใส	
กังสดาล สิงห์สูง, เวณิกา เบ็ญจพงษ์, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, และวีรยา การพานิช.....	146
Abstracts	
Oral Presentation	157
Poster Presentation	165



สาส์นจากนายกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย



ในปี พ.ศ. ๒๕๕๑ สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทยได้ก่อตั้งครบรอบ ๒๕ ปี (ก่อตั้งเมื่อปีพ.ศ. ๒๕๒๖) สมาคมฯ จึงถือเป็นฤกษ์ดีงามและได้พัฒนาการประชุมวิชาการประจำปีขึ้นเป็น “การประชุมพิษวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ ๑ (The First National Conference in Toxicology)” โดยความร่วมมือของสมาคมพิษวิทยาคลินิก และชมรมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย ทำให้เป็นการประชุมวิชาการที่รวมนักพิษวิทยาของประเทศในสาขาต่างๆ เข้าด้วยกัน เพื่อเป็นเวทีสำหรับนักวิชาการ นักวิจัย ผู้เชี่ยวชาญด้านพิษวิทยาและศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งนักศึกษา ประชาชนทั่วไป ทั้งภาครัฐและเอกชน ได้มีโอกาสนำเสนอผลงาน ร่วมรับข้อมูลและสถานการณ์ที่ทันสมัย และแลกเปลี่ยนความคิดเห็น อีกทั้งเป็นเวทีของการส่งเสริมนักวิชาการรุ่นใหม่ และนักศึกษาพิษวิทยา ทั้งภาครัฐและเอกชน ได้มีโอกาสนำเสนอผลงาน สำหรับในปี พ.ศ. ๒๕๕๒ นี้เป็นการประชุม **พิษวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒ (The second National Conference in Toxicology - 2nd NCT)** โดยเป็นการประชุมที่มีส่วนร่วมขององค์กรที่มีกิจกรรมทางพิษวิทยามากขึ้น เช่นกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันโภชนาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เป็นต้น โดยมี Theme การประชุมของปีนี้คือ **ความท้าทายทางพิษวิทยาในศตวรรษที่ ๒๑** ที่มีหัวข้อการสัมมนาที่เป็นประเด็นปัญหาในปัจจุบันและคาดว่าจะเกิดในอนาคต เป็นการนำศาสตร์ใหม่ๆ มาสัมมนากัน และมีการนำเสนอผลงานวิจัยใหม่ๆ ทางด้านพิษวิทยาของนักพิษวิทยาจากหน่วยงานต่างๆ ด้วย

ในระยะที่ล่วงมาแล้ว การดำเนินงานของสมาคมฯ ได้รับความร่วมมือจากสมาชิก ๗ นักวิชาการ และผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องด้านพิษวิทยาทั้งในหน่วยงานของรัฐ และภาคเอกชน กิจกรรมของสมาคมฯ ได้เพิ่มความหลากหลาย จากบทบาททางวิชาการ สู่มาตรการควบคุมการใช้สารเคมี อาหาร ยา และเครื่องสำอางในระดับประเทศ ตลอดจนการเข้าไปมีบทบาทในการดำเนินการตามกฎหมาย โดยร่วมเป็นกรรมการในกระทรวงต่างๆ จากผลงานวิจัยของสมาชิก นักวิชาการ สู่การปฏิบัติในภาคประชาชน รวมทั้งบทบาททางวิชาการซึ่งเป็นที่ยอมรับจากระดับประเทศ สู่ระดับภูมิภาค และนานาชาติในปัจจุบัน

ในนามของคณะกรรมการจัดการประชุมพิษวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒ ขอขอบคุณวิทยากร ผู้เข้าร่วมประชุม และผู้สนับสนุนการจัดประชุมครั้งนี้ทุกภาคส่วน และหวังว่าการประชุมวิชาการพิษวิทยาแห่งชาติ จะเป็นประโยชน์กับทุกท่าน และเกิดเครือข่ายที่เข้มแข็งขององค์กรต่างๆ และหวังว่าความร่วมมือนี้จะขยายผลไปกว้างขวาง ดำเนินงานร่วมงานกันในด้านต่างๆ ทั้งระดับปัจเจกบุคคลและระดับองค์กร ต่อไปในอนาคต

นายกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย

พ.ศ. ๒๕๕๑ - ๒๕๕๒



สาส์นจากนายกสมาคมพิษวิทยาคลินิกแห่งประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา ทำให้มีความเจริญเติบโตของภาคอุตสาหกรรม ภาคเกษตรกรรม และการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยี สิ่งเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการใช้สารเคมีหลายชนิด หลายรูปแบบ ทำให้ประชาชนต้องเกี่ยวข้องกับสารเคมีต่างๆ มากขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ไม่ว่าจะเป็นการอุปโภค บริโภค การประกอบอาชีพ และจากสภาวะแวดล้อมรอบตัว ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของประชาชนมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นปัญหาอันตรายจากสารเคมีที่ใช้ในการประกอบอาชีพในชีวิตประจำวัน หรือปนเปื้อนมาในอาหารและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้อาจมีปัญหาก่อเกิดจากสารพิษในธรรมชาติ เช่น เห็ดพิษ พืชพิษ พิษจากแมลงและสัตว์มีพิษ ได้แก่ งูพิษ ปลาปักเป้า แมงดาทะเล เป็นต้น และพิษจากมลภาวะของสิ่งแวดล้อมจากอุตสาหกรรม สิ่งเหล่านี้สามารถทำให้เกิดอันตรายและภาวะเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง

ปัญหาดังกล่าว เป็นปัญหาที่ท้าทายของพิษวิทยาในปัจจุบันและอนาคตอย่างยิ่ง ในด้านหนึ่งอุตสาหกรรมสมัยใหม่ ทำให้เกิดมลภาวะไม่ว่าจะเกิดจากกระบวนการผลิต กากของเสีย แต่ขณะเดียวกันอีกด้านหนึ่งการที่จะไม่ยอมรับอุตสาหกรรมก็จะให้มีผลกระทบกับความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ และความเป็นอยู่ของประชาชน ดังนั้นการแก้ปัญหาดังกล่าวจะต้องมีความสมดุลทั้งสองด้าน และบนพื้นฐานทางวิชาการและความคุ้มค่า ซึ่งจะต้องบูรณาการพิษวิทยาทั้งด้านพื้นฐานและด้านคลินิก

การประชุมร่วมประจำปีของสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย และสมาคมพิษวิทยาคลินิกแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 2 ในปีนี้ก็จะเป็นการต่อยอดการพัฒนาพิษวิทยาแบบสหสาขาและเป็นประโยชน์ต่อประเทศโดยรวม

ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมิง เก่าเจริญ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมิง เก่าเจริญ)

นายกสมาคมพิษวิทยาคลินิกแห่งประเทศไทย



สาส์นจากอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ร่วมสนับสนุนการประชุมพิษวิทยาแห่งชาติครั้งที่ 2 (The second national conference in toxicology 2nd NCT) ของสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย เพื่อเป็นการสนับสนุนการสร้างเครือข่ายการพัฒนาพิษวิทยาแบบสหสาขาที่จะเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินการด้านการเฝ้าระวังดูแลผลกระทบต่อสุขภาพประชาชนตรงกับการปฏิบัติงานสำคัญหนึ่งของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือการตรวจวิเคราะห์และวิจัยเพื่อประเมินความเสี่ยงและเตือนภัยสุขภาพ ในด้านโรค และ ผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ เช่น อาหาร ยา วัสดุและเครื่องมือแพทย์ วัตถุอันตราย ชีววัตถุ และเครื่องสำอาง และการชันสูตรโรค ทั้งด้านคิดเชื่อและไม่คิดเชื่อ โดยเป็นการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการที่เป็นเครือข่ายครอบคลุมพื้นที่ทั่วประเทศ มีระบบคุณภาพมาตรฐานสากล

อย่างไรก็ตามผลดำเนินการจะส่งถึงประชาชนได้จะต้องอาศัยการดำเนินการร่วมกันในหลายหน่วยงาน เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมควบคุมโรค กรมอนามัย มกช กรมวิชาการเกษตร กรมการปกครองส่วนท้องถิ่น สมาคมคุ้มครองผู้บริโภค และหน่วยงานวิชาการ เช่น มหาวิทยาลัยต่างๆ ซึ่งจะต้องประสานในการที่จะสามารถนำผลการประเมินไปใช้บริหารจัดการความเสี่ยงได้จริงและมีความคุ้มค่าตลอดจนตรงความต้องการของผู้ใช้หรือได้รับการยอมรับของทุกภาคส่วน เป็นประเด็นท้าทายที่ต้องอาศัยความร่วมมือของนักวิชาการสาขาต่างๆ ตลอดจนหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และต้องดำเนินการเป็นเครือข่ายอย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุม ตรงความต้องการ และใช้ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานสากล

ขออวยพรให้การประชุมพิษวิทยาแห่งชาติครั้งที่ 2 ของสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย ประสบผลสำเร็จตามจุดหมายทุกประการ

(นายจักรธรรม ธรรมศักดิ์)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



Message.....



ชมรมพันธุพิษแห่งประเทศไทย

Thai Environmental Mutagen Society

As the vice-president of Thai Society of Toxicology (TST), and the president of Thai Environmental Mutagen Society (TEMS), it gives me much honor and pleasure to convey my hearty welcome to all distinguished speakers, guests and participants on coming to the 2nd National Conference in Toxicology at Miracle Grand Convention, Bangkok.

It is good news that many organizations expressed their passion to organize this 2nd NCT. Besides TST, the additional organizers include the Thai Society of Clinical Toxicology, TEMS, Department of Medical Science, Ministry of Public Health and Center of Research and Technology Development in Livestock Production, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. The commitment of this annual meeting is to bring together the best minds and latest knowledge in various aspects of toxicology for achieving excellence in education and research of the country.

Environmental mutagens are known to be the genotoxic substances that can bring about the negative effects to human health, ecosystems and food chains. They therefore must be in a great concern to be avoided and protected. TEMS has been established in 1979 from the leading of Professor Dr. Sumin Samutakupta in gathering the members whom attended The 1st Southeast Asian Workshop on Detection of Environmental Mutagens, Carcinogens and Teratogens (EMCAT Workshop). The society has run a number of activities locally and internationally since then. Regarding to the mission and vision of the society for stronger operation, we proposed to jointly work with TST, TSCT especially in organizing the conference. TEMS is now a member of Asian Association of Environmental Mutagen Societies (AAEMS) and International Association of Environmental Mutagen Societies (IAEMS). From December 15 to 18 of next year, TEMS in cooperation with National Cancer Institute (NCI) and Faculty of Pharmacy, Mahidol University will organize The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM) in Bangkok - Pattaya.

While joining the 2nd NCT, hope the experience from this Conference will bring you more brilliant ideas and result in more linkages with each others. Besides, will look forward enthusiastically to your participation and support to our conferences always. Thank you.

Thai Environmental Mutagen Society

President



สาส์นจากผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี การผลิตปศุสัตว์



ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ ประกอบด้วย 3 โครงการ คือ โครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนม และกระบือปลัก (เริ่มดำเนินงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527) โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ (เริ่มดำเนินงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521) และโครงการการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอาหารและการเกษตรโดยนิวเคลียร์เทคโนโลยี (เริ่มดำเนินงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529) ซึ่งงานวิจัยหลักเพื่อสร้างองค์ความรู้และใช้เทคโนโลยีให้เหมาะสมกับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2551 ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ ได้เข้าร่วมในโครงการศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตวแพทย์ ซึ่งอยู่ภายใต้โครงการแผนพัฒนาวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบด้วย 3 กลุ่มงาน คือ กลุ่มงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางระบบสืบพันธุ์และเซลล์ต้นกำเนิด กลุ่มงานด้านอนุพันธุศาสตร์ และกลุ่มงานด้านพิษวิทยาและโภชนศาสตร์ ซึ่งการดำเนินงานวิจัยเพื่อประยุกต์องค์ความรู้และนำมาผสมผสานปรับใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างครบวงจร

การได้เป็นเจ้าภาพร่วมจัดประชุมวิชาการ “การประชุมพิษวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 2” หัวข้อ “ความท้าทายทางพิษวิทยาในศตวรรษที่ 21” จึงเป็นการพัฒนาเครือข่ายความร่วมมือในงานวิจัยแบบบูรณาการของสหศาสตร์ ซึ่งจะเกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อวงวิชาการโดยรวม รวมทั้งเกิดแนวทางการค้นคว้าวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เผยแพร่ได้อย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้นต่อไป

ในนามของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย สมาคมพิษวิทยาคลินิก ชมรมพันธุพิษแห่งประเทศไทย และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้โอกาสได้เข้าร่วมจัดประชุมวิชาการในครั้งนี้ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเกิดเครือข่ายความร่วมมือด้านวิชาการเพื่อเสริมสร้างประโยชน์ให้กับประเทศชาติได้อย่างยั่งยืนต่อไป

Onnong Pinnawit

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อนงค์ บินทวิหค)

ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์

วันพฤหัสบดีที่ 17 ธันวาคม 2552

8.30-9.00 ลงทะเบียน

9.00-9.30 **พิธีเปิด** ห้องเมจิก 3

ศ. นพ. สมิง เก้าเจริญ กล่าวต้อนรับ
นายกสมาคมพิษวิทยาคลินิก

ดร. สมล ปวิตรานนท์ กล่าวรายงาน
ที่ปรึกษาสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย และผู้ทรงคุณวุฒิ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รศ. ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต ประธาน
สมาชิกวุฒิสภา, รองประธานคณะกรรมการการสาธารณสุข วุฒิสภา
และนายกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย

9.30-10.15 **Keynote: เหตุเกิดที่มาบาดาพุด** ห้องเมจิก 3

รศ. พญ. พรพันธุ์ นุกเระรัตน์
สมาชิกวุฒิสภา, กรรมการในคณะกรรมการการสาธารณสุข วุฒิสภา
ประธาน: **รศ. ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต**

10.15-10.30 อาหารว่าง และชมโปสเตอร์วิชาการ

10.30-12.00 **Symposium 1: Global Warming and Emerging Issues in Toxicology** ห้องเจมินี

Food - borne Poisonings
รศ. นพ. วินัย วนานุกูล
คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

Toxic Gas from Fermentation
รศ. พญ. สุดา วรรณประสาธ
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Marine Envenomations and Poisonings
ผศ. นพ. สัมมน โจมฉาย
ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

ประธาน: **ผศ. นพ. สัมมน โจมฉาย**

Symposium 2 : คุณภาพและความปลอดภัยของยาแผนโบราณ ห้องเมจิก 3

คุณภาพและความปลอดภัยของยาแผนโบราณ: ปัญหาการใช้ยาแผนโบราณ
ภญ. วิมล สุวรรณเกษาวงษ์
ศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยผลิตภัณฑ์สุขภาพ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

กระบวนการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ
ภก. ธนิต ตรีธนพันธ์
กลุ่มยาแผนไทย ยาจากสมุนไพร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

แนวทางพัฒนายาแผนโบราณ
ภญ. ดร. อัญชลี จุฑาพุทธิ
กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

ประธาน: **ภญ. ปรางค์ ขวลิตรำ**
สถาบันวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

12.00-13.00 อาหารกลางวัน และชมโปสเตอร์วิชาการ

13.00-13.30	ประชุมใหญ่สามัญประจำปี พ.ศ. 2552 สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย	ห้องเมจิก 3
	ประธาน: รศ. ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต	
	ประชุมใหญ่สามัญประจำปี พ.ศ. 2552 สมาคมพิษวิทยาคลินิกแห่งประเทศไทย	ห้องเจมินี่
	ประธาน: ศ. นพ. สมิง เก้าเจริญ	
13.30-15.00	Symposium 3 : อาหารกับการป้องกันมะเร็ง	ห้องเมจิก 3
	บทบาทของอาหาร โภชนาการ การออกกำลังกายกับการป้องกันมะเร็งในมุมมองของผู้เชี่ยวชาญทั่วโลก ผศ. ดร. ชนิพรรณ บุตรยี่ สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล	
	พืช ผัก สมุนไพรไทย ด้านมะเร็ง กับวัฒนธรรมการบริโภคที่ต้องเปลี่ยนแปลง ดร. พรทิพา พิษา กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ	
	ศักยภาพด้านมะเร็งของตำรับอาหารไทย ผศ. ดร. สมศรี เจริญเกียรติกุล สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล	
	ประธาน: ผศ. ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์	
15.00-15.15	อาหารว่าง	
15.15-16.45	Symposium 4 : Progress in Nanotechnology	ห้องเมจิก 3
	Nanotoxicology: A Safety Evaluation of Nanomaterials ดร. รวิวรรณ มณีรัตนโชติ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ	
	Nanosafety in Thailand ดร. ศิรศักดิ์ เทพาคำ ผู้อำนวยการฝ่ายถ่ายทอดเทคโนโลยีและพัฒนาธุรกิจ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ	
	Challenge: Development of Regulation and Control of Nanomaterial Safety in Consumer Products ดร. อรุณ คงพานิช สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา	
	ประธาน: ดร. สุมล ปิตรานนท์	
	Symposium 5 : Controversies in Pesticide Poisoning	ห้องเจมินี่
	Treatment of Paraquat Poisoning ผศ. นพ. สัมมน โฉมฉาย ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล	
	Treatment of Organophosphate Poisoning รศ. นพ. วินัย วนานุกูล คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล	
	ประธาน: รศ. นพ. วินัย วนานุกูล	

วันศุกร์ที่ 18 ธันวาคม 2552

9.00-10.00	Plenary Lecture 1 : พิษวิทยากับ พ.ร.บ.ความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. 2551	ห้องเมจิก 3
	คุณสุวิทย์ วิจิตรโสภาค สำนักงานคุ้มครองผู้บริโภค ประธาน: รศ. ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต อาหารว่าง	
10.00-10.15		
10.15-12.00	Oral Presentation	ห้องเมจิก 3
	ประธาน: ดร. จินตนา ศิริวรราชย์ ประธานร่วม: ดร. รจนา ชุณหะวัณ	
	Symposium 6 : Controversies in Mercury Poisoning	ห้องเจมินี
	Mercury the Culprit? ผศ. นพ. สุชัย สุเทพารักษ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย The Clinical Significance of Mercury and its Chelation in Pediatrics รศ. พญ. จุฬารัตน์ โฉมฉาย ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล Safety of Amalgam ผศ. พญ. ดร. ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประธาน: ผศ. นพ. สุชัย สุเทพารักษ์	
12.00-13.00	อาหารกลางวัน	
13.00-14.00	การนำเสนอโปสเตอร์วิชาการ (On site presentation)	
14.00-15.00	Symposium 7 : Toxicogenomics	ห้องเมจิก 3
	Genetic Epidemiology of Breast Cancer in Thai Women ดร. ศุภพร แสงกระจ่าง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ Pharmacogenomics and its Applications อ. พญ. ดร. สรณันท์ จันทรางศุ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประธาน: ดร. ศุภพร แสงกระจ่าง	
	Special Lecture : Controversies in the Management of Snakebites	ห้องเจมินี
	ผศ. นพ. สุชัย สุเทพารักษ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประธาน: รศ. นพ. วินัย วนานุกูล	
15.00-15.15	อาหารว่าง	
15.15-16.15	Plenary Lecture 2 : Emerging Food Safety Problems	ห้องเมจิก 3
	รศ. ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต นายกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย ประธาน: รศ. ดร. วิสิฐ จະวะลิต ผู้อำนวยการสถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล	
16.15-16.30	พิธีปิด	ห้องเมจิก 3
	รศ. ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต นายกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย	

เหตุเกิดที่มาบตาพุด

รศ. พญ. พรพันธุ์ บุญยรัตพันธุ์

สมาชิกวุฒิสภา, กรรมการในคณะกรรมการการสาธารณสุข วุฒิสภา

บทคัดย่อ

มาบตาพุดเป็นพื้นที่นิคมอุตสาหกรรม ตั้งอยู่บริเวณอำเภอเมืองเป็นหนึ่งใน 5 นิคมอุตสาหกรรมของจังหวัดระยอง ตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 5 เป็นต้นมา เพื่อพัฒนาพื้นที่ดังกล่าวให้เป็นฐานเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศ การพัฒนาพื้นที่ได้เริ่มมาตั้งแต่ พ.ศ. 2524 จนถึงปัจจุบัน มีโรงงานอุตสาหกรรมมากกว่า 1,700 โรง กระจายอยู่ในนิคมอุตสาหกรรม ลักษณะของอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ที่เป็นปิโตรเคมี อุตสาหกรรมเหล็ก ปิโตรเลียม อุตสาหกรรมยานยนต์และชิ้นส่วน การพัฒนานี้ถึงแม้จะทำให้ GDP ของระยองมีการขยายตัวสูงกว่าอัตราการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศ รวมทั้งรายได้เฉลี่ยต่อหัวของประชากรในพื้นที่ด้วยเช่นกัน แต่ก่อให้เกิดปัญหามากมายแก่ประชาชนในพื้นที่ที่เคยทำการเกษตรเป็นหลักมาดั้งเดิม ปัญหาเหล่านั้นมีทั้ง ปัญหาสิ่งแวดล้อม ปัญหาที่ดิน การใช้ประโยชน์ ผังเมือง การขาดแคลนน้ำและคุณภาพน้ำดื่ม น้ำใช้ ปัญหาสังคม ปัญหาการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศและชายฝั่ง และปัญหาสุขภาพอนามัยของประชาชน

เหตุเกิดที่มาบตาพุดเป็นเพียงส่วนหนึ่งของปรากฏการณ์ผลกระทบต่อสุขภาพอนามัย และคุณภาพชีวิตของประชาชนไทย อันเนื่องมาจากมลพิษในสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการพัฒนาอุตสาหกรรม โดยให้ความสำคัญต่อการลงทุนในด้านการพิทักษ์คุณภาพสิ่งแวดล้อมน้อยเกินไป และยังไม่แสดงถึงความย่อหย่อนประสิทธิภาพ ในการติดตามและควบคุมการดำเนินการผลิตของโรงงานต่างๆ ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่ปลอดภัยของหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องด้วย

Global Warming and Emerging Issues in Toxicology: Food-borne Poisonings

Winai Wananukul

Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

It is postulated that global warming accelerates insect's life cycle and population. Some insects will destroy crops which are essential for human. This will exert pressure on man to use pesticides. Thus, adverse effects from using insecticides are concomitantly increased. This article will address the health effects from pesticide exposure and poisoning. It is predicted that acute insecticide poisoning will inevitably increase. Insecticides are composed of the old and the new chemicals. The old ones are exemplified by organochlorine (OC), organophosphorus (OP) and carbamate, whereas the new generation insecticides include pyrethroid, abamectin and neonicotinoid. The new generation is supposed to have less toxicity than the old one. According to the evidence, OCs are categorized teratogen and carcinogen rating 2B. They are as classified as endocrine disruptors and persistent organic pollutants. It is a commitment worldwide for banning the OCs out of the market. For OP insecticides, they are associated with neuropsychiatric disorder which is called "chronic organophosphate induced neuropsychiatric disorder" (COPND), but there is no strong evidence to suggest that they are carcinogens or teratogens. Some evidences suggest that pyrethroids may cause some chronic effects such as polyneuropathy, organic brain syndrome and autonomic dysfunction. Carcinogenic and teratogenic effects are not established in chronic pyrethroid exposure. Avermectin can cross placenta, however, no human data to show its teratogenic effect. No carcinogenic effect is observed in long term animal study. The human data of neonicotinoids are limited.

Toxic Gas from Fermentation

Suda Vannaprasaht

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ABSTRACT

The today situation of global warming may increase risk of toxic gases from fermentation. These toxic gases are divided into three groups: simple asphyxiates, chemical asphyxiates and irritant gases. Simple asphyxiates are gases that can displace oxygen from ambient air leading to oxygen fraction of lower than 21%. Common simple asphyxiates are methane, carbon dioxide, nitrogen gas. Asphyxia is manifested primarily by central nervous system and cardiovascular system dysfunction. CNS effects from asphyxia are nausea, vomiting, dizziness, agitation, and loss of consciousness. Moreover, cardiovascular manifestations are dysrhythmias, hypotension, heart failure and myocardial infarction. Management is removing from source place and oxygen therapy.

Decay of sulfur containing protein in some industry such as fish sauce or fish fermentation, can produce hydrogen sulfide (H_2S). H_2S is cellular toxic gas as it inhibits cytochrome oxidase, thereby interrupt oxidative phosphorylation. This mechanism is similar to cyanide poisoning but its toxicity is more potent than cyanide. As a result, H_2S cause cellular hypoxia and anaerobic metabolism. The main clinical manifestation of H_2S is rapid conscious loss after inhalation of rotten egg odor. The initial treatment is to remove the patient to fresh air environment and oxygen therapy. 3% sodium nitrite is administered to induce methemoglobin. H_2S has higher affinity to methemoglobin than cytochrome oxidase and then forming sulfhemoglobin. Unlike cyanide poisoning, sodium thiosulfate is not useful in the treatment of H_2S intoxication.

Silo filler disease is pulmonary injury from nitrogen dioxide and its polymers. Nitrogen dioxide (NO_2) is produced from agricultural silo. NO_2 is transformed to nitric acid which causes lung injury. Because of its low water solubility, nitric acid usually affect lower airway. However, if high concentration is inhaled, it may cause acute bronchitis and pulmonary edema. Management is supportive to correct hypoxia, ventilation failure and secondary infection.

Global Warming and Emerging Issues in Toxicology: Marine Envenomations and Intoxications

ผศ.นพ. สัมมน โฉมฉาย

ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ในปัจจุบันมีปัญหการเกิดพิษในทะเลบางประการที่มีสมมุติฐานว่าน่าจะมีสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในสภาวะอากาศของโลก ปัญหาสองเรื่องที่มีผลกระทบมาก และมีการศึกษามาก ได้แก่ ปัญหา Harmful algal blooms และการเปลี่ยนแปลงในจำนวนและการกระจายตัวของแมงกะพรุน¹ ในที่นี้จะอภิปรายถึงปัญหาที่มีความสำคัญทางพิษวิทยาคลินิก และเกี่ยวข้องกับประเทศไทยโดยตรงเท่านั้น

Harmful algal blooms (HABs) หมายถึงปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ ที่มีการเพิ่มจำนวนของสาหร่าย (algae) จนเกิดผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ ระบบนิเวศน์ และสิ่งแวดล้อม ในภาพรวมเหตุปัจจัยที่เชื่อว่าจะทำให้เกิดการเพิ่มของปัญหา HABs และแมงกะพรุนมีความคล้ายคลึงกันได้แก่²

การขนส่งน้ำทะเลระหว่างภูมิภาคต่างๆ ของโลก โดยใช้น้ำมันเพื่อถ่วงเป็นอับเฉาเรือให้เรือได้สมดุล

การปล่อยสารเคมีโดยเฉพาะสารที่มีธาตุไนโตรเจน และฟอสฟอรัสลงในน้ำทะเลจากการทำเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมบริเวณใกล้ชายฝั่งทะเล ซึ่งธาตุเหล่านี้ เป็นปัจจัยเอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายและแพลงตอนซึ่งเป็นอาหารของแมงกะพรุน

การที่ภูมิอากาศมีอุณหภูมิสูงขึ้นอาจเป็นปัจจัยเอื้อต่อการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายและแพลงตอนด้วยการเปลี่ยนแปลงของกระแสน้ำและการเพิ่มความขุ่นของน้ำทะเล

ประมาณการว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยจากภาวะพิษที่เกี่ยวข้องกับ HABs ถึงปีละประมาณ 60,000 ราย และมีอัตราการเสียชีวิตประมาณร้อยละ 1.5 ของกรณีป่วย หลักฐานที่ช่วยยืนยันว่า HABs มีขนาดของปัญหาเพิ่มขึ้น ได้แก่³

การเพิ่มขึ้นของจำนวนการเกิดปรากฏการณ์ซีปลาวาฬ (red tide) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของสาหร่ายขนาดเล็กที่รวมตัวเป็นกลุ่มก้อนมากจนทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของน้ำทะเล ในปรากฏการณ์เหล่านี้มักมีผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ตามมา เช่น มีสัตว์ทะเลตายพร้อมกันเป็นจำนวนมากๆ โดยการเพิ่มขึ้นของปรากฏการณ์นี้ มีทั้งการเพิ่มในด้านความถี่และมีเหตุการณ์เกิดขึ้นในภูมิภาคของโลกที่ไม่เคยมีเหตุการณ์เหล่านี้อีกด้วย

การเกิดโรคหรือกลุ่มอาการใหม่ๆ จาก HABs หรือมีการระบาดของโรคจาก HABs ที่ไม่เคยพบในบางภูมิภาคของโลก เช่น ก่อนปี ค.ศ. 1970 ไม่เคยพบปัญหา paralytic shell fish poisoning (PSP) ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่หลังปี ค.ศ. 1970 กลับเริ่มมีการพบโรคนี้ที่บรูไน และมีความถี่ของการระบาดของเพิ่มขึ้นของ PSP ในประเทศต่างๆ เช่น มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ จนกลายเป็นโรคประจำถิ่นในปัจจุบัน ในประเทศไทยเคยมีปัญหา PSP หนึ่งครั้งในปีค.ศ.1983 โดยเกิดเหตุที่อำเภอปราณบุรี จังหวัด

ประจวบคีรีขันธ์โดยพบผู้ป่วย 53 รายและเสียชีวิต 1 ราย⁴

สำหรับปัญหาแมงกะพรุนเพิ่มขึ้นนั้นในทศวรรษหลัง ปีค.ศ. 2000 มีการรายงานปรากฏการณ์ที่มีการพบแมงกะพรุนอยู่รวมเป็นกลุ่มจำนวนมาก (jellyfish bloom) จากหลายบริเวณของโลก เช่น มหาสมุทรแอตแลนติก แปซิฟิก และอินเดีย ในทะเลบอลติก ทะเลแคสเปียน และทะเลดำ จนทำให้เกิดความเสียหายทั้งทางสุขภาพ เศรษฐกิจ และระบบนิเวศ⁵ ปัญหาทางด้านสุขภาพที่ชัดเจน ได้แก่ การพบปัญหา box jelly fish (*Chironex fleckeri*) และ Irukandji jellyfish (*Carukia barnesi*) ซึ่งแต่เดิมเป็นปัญหาประจำถิ่นใน

บริเวณประเทศออสเตรเลีย⁶ และเซเชลล์ แต่ในปัจจุบันกลับมีรายงานปัญหาดังกล่าวจากหลายแห่ง เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น ฮาวาย ปาปัวนิวกินี และอ่าวเม็กซิโก⁵ สำหรับในประเทศไทยเคยมีการรายงานกรณีป่วยจากแมงกะพรุนทั้งสองชนิดมาแล้ว^{7,8} ด้วยเหตุผลที่มีการเปลี่ยนแปลงในจำนวน และการกระจายของสิ่งมีชีวิตที่เป็นภัยคุกคามดังกล่าวข้างต้น นักพิษวิทยาและบุคลากรทางสาธารณสุขในประเทศไทยจึงควรมีความรู้ และความคุ้นเคยพอที่จะวินิจฉัยและนึกถึงกลุ่มอาการที่อาจเกิดจาก Harmful algal blooms และจากแมงกะพรุนทั้งสองชนิดได้ดังสรุปใน Table 1^{6, 9-22}

Table 1 Important toxic syndromes related to harmful algal blooms and jellyfish envenomations

	Causes	Clinical manifestations
Amnesic shellfish poisoning	Toxins: Domoic acid Organisms: Algae genus <i>Pseudo-nitzschia</i> , - Exposure and vectors: Consumption of contaminated bivalve shellfish: mussels, oysters, clams and scallops	Onset: Within 15-38 hours after ingestion Nausea, vomiting, severe diarrhea Headache, delirium, loss of short-term memory, myoclonus, seizures and coma
Azaspiracid shellfish poisoning	Toxins: Azaspiracids Organisms: <i>Prorocentrum</i> Exposure and vectors: Consumption of contaminated bivalve shellfish: mussels, oysters, clams and scallops	Onset: Within 24 hours after ingestion Nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, headache fever and chill
Diarrhetic shellfish poisoning	Toxins: Okadaic acid, Dinophys toxin, Pectenotoxin group Organisms: Dinoflagellates: <i>Dinophysis</i> spp. and <i>Prorocentrum</i> spp. Exposure and vectors: Consumption of contaminated bivalve shellfish: mussels, oysters, clams and scallops	Onset: Within 24 hours after ingestion Nausea, vomiting, colicky abdominal pain and severe diarrhea
Neurotoxic shellfish poisoning	Toxins: Brevetoxins Organisms: Dinoflagellate <i>Karenia brevis</i> , <i>Karenia</i> spp., <i>Chatonella</i> spp., <i>Fibrocapsa japonica</i> Exposure and vectors: Consumption of contaminated bivalve shellfish: mussels, oysters, clams and scallops	Onset: Within 24 hours after ingestion Abdominal pain, nausea, diarrhea, headache, bradycardia and paresthesia, sense of temperature reversal, myalgia, vertigo, ataxia and floating sensation

Table 1 Important toxic syndromes related to harmful algal blooms and jellyfish envenomations (continued)

	Causes	Clinical manifestations
Paralytic shellfish poisoning	Toxins: Paralytic shellfish toxins (Saxitoxins) Organisms: Dinoflagellates: <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> , <i>Pyrodinium</i> spp, <i>Alexandrium</i> spp, and <i>Gonyaulax</i> spp. Exposure and vectors: Consumption of contaminated bivalve shellfish: mussels, oysters, clams and scallops	Onset: Within 24 hours after ingestion Paresthesia and hyperesthesia of face, mouth and tongue and extremities, nausea, vomiting, abdominal pain, dyspnea, sense of dissociation, paralysis
Ciguatera fish poisoning	Toxins: Ciguatoxin Organisms: Dinoflagellate <i>Gambierdiscus toxicus</i> Exposure and vectors: Consumption of contaminated deep sea reef fish: grouper, red snapper, barracuda	Onset: Within 6 hours after ingestion Vomiting, diarrhea, headache, paresthesia of the mouth and extremities, ataxia, blurred vision, photophobia, hot/ cold reversal, extreme pruritus, hypotension and bradycardia
Cyanobacterial poisoning	Toxins: Anatoxin-a, microcystin, Nodularin Organisms: cyanobacterial algae (<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i>) Exposure: Drinking contaminated water	Onset: Within 24 hours after ingestion Nausea, vomiting, diarrhea, elevation of liver enzyme
	Toxins: Lyngbyatoxin Organisms: cyanobacterial algae <i>Lyngbya</i> spp. Exposure: Swimming in contaminated water	Irritation of skin, eyes, nose and skin rash
Aerosolized Florida red tide respiratory syndrome	Toxins: Brevetoxins Organisms: Dinoflagellate <i>Karenia brevis</i> Exposure: Inhalation of aerosolized brevetoxins produced during the red tide bloom blown by wind to coastal areas	Acute exacerbation of asthma
Box jellyfish envenomation	Stinging by jellyfish: <i>Chironex fleckeri</i> , <i>Chiropsalmus quadrigatus</i> and <i>Chiropsalmus quadrumanus</i>	Immediate progressive pain with urticarial rash at contact site In severe cases: dermal necrosis, ladder-pattern skin burn, loss of consciousness, ARDS and cardiac arrest
Irukandji syndrome	Stinging by jellyfish: <i>Carukia barnesi</i> , <i>Carybdea alata</i> , <i>Malo maxima</i> , and <i>Carybdea xaymacana</i>	Initial: Mild redness and mild pain at the site of contact After a delay of 5 to 50 minutes (mean 30 minutes) severe pain, typically severe lower back pain, spreading to the limbs, abdomen and chest Manifestations of catecholamine excess: tachycardia, hypertension, diaphoresis, piloerection and restlessness Severe cases: heart failure, pulmonary edema, intracerebral hemorrhage

REFERENCES

1. Fleming LE, Broad K, Clement A, *et al.* Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 2006; 53: 545-60.
2. Paul VJ. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *Adv Exp Med Biol* 2008; 619:239-57.
3. Erdner DL, Dyble J, Parsons ML, *et al.* Centers for Oceans and Human Health: a unified approach to the challenge of harmful algal blooms. *Environ Health* 2008; 7 Suppl 2: S2.
4. Kodama M, Ogata T, Fukuyo Y, *et al.* Protogonyaulax coarctata, a toxic dinoflagellate found in the Gulf of Thailand. *Toxicon* 1988; 26: 707-12.
5. Richardson AJ, Bakun A, Hays GC, *et al.* The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends Ecol Evol* 2009; 24: 312-22.
6. Tibballs J. Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon* 2006; 48: 830-59.
7. de Pender AM, Winkel KD, Ligthelm RJ. A probable case of Irukandji syndrome in Thailand. *J Travel Med* 2006; 13: 240-3.
8. Suntrarachun S, Roselieb M, Wilde H, *et al.* A fatal jellyfish encounter in the Gulf of Siam. *J Travel Med* 2001; 8: 150-1.
9. Bailey PM, Little M, Jelinek GA, *et al.* Jellyfish envenoming syndromes: unknown toxic mechanisms and unproven therapies. *Med J Aust* 2003; 178: 34-7.
10. Brett MM. Food poisoning associated with biotoxins in fish and shellfish. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16: 461-5.
11. Friedman MA, Levin BE. Neurobehavioral effects of harmful algal bloom (HAB) toxins: a critical review. *J Int Neuropsychol Soc* 2005; 11: 331-8.
12. Greenland P, Hutchinson D, Park T. Irukandji syndrome: what nurses need to know. *Nurs Health Sci* 2006; 8: 66-70.
13. Isbister GK, Kiernan MC. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol* 2005; 4: 219-28.
14. Lehane L. Paralytic shellfish poisoning: a potential public health problem. *Med J Aust* 2001; 175: 29-31.
15. Nickson CP, Waugh EB, Jacups SP, *et al.* Irukandji syndrome case series from Australia's Tropical Northern Territory. *Ann Emerg Med* 2009; 54: 395-403.
16. Pulido OM. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Mar Drugs* 2008; 6: 180-219.
17. Sinclair JL, Hall S, Berkman JA, *et al.* Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. *Adv Exp Med Biol* 2008; 619: 45-103.
18. Sobel J, Painter J. Illnesses caused by marine toxins. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1290-6.
19. Twiner MJ, Rehmann N, Hess P, *et al.* Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Mar Drugs* 2008; 6: 39-72.
20. Van Dolah FM. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Perspect* 2000; 108 Suppl 1: 133-41.
21. Wang DZ. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Mar Drugs* 2008; 6: 349-71.
22. Watkins SM, Reich A, Fleming LE, *et al.* Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar Drugs* 2008; 6: 431-55.

คุณภาพและความปลอดภัยของยาแผนโบราณ: ปัญหาการใช้ยาแผนโบราณ

ภญ. วิมล สุวรรณเกษาวงษ์

ศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ปัญหาการใช้ยาแผนโบราณ (ในที่นี้จะรวมถึง ยาจากสมุนไพร) มีทั้งที่เป็นปัญหาคุณภาพผลิตภัณฑ์ และปัญหาความปลอดภัย อันเกิดจากเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ (adverse event) ของผลิตภัณฑ์

ปัญหาคุณภาพ

การตรวจติดตามคุณภาพการผลิตยาจากสมุนไพรของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปัญหาคุณภาพที่พบ คือ

1) **ยาจากสมุนไพรที่มีการขึ้นทะเบียนยา** พบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และโลหะหนักไม่เป็นไปตามมาตรฐาน ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ลงวันที่ 25 มีนาคม 2547 เรื่องหลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ผลการตรวจวิเคราะห์ ในปีงบประมาณ 2551 จำนวน 145 ตัวอย่าง พบผิดมาตรฐานประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 42 ตัวอย่าง (ร้อยละ 29.0) โดยพบ *Clostridium* spp แต่ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp.

การปนเปื้อนโลหะหนัก ผลการตรวจวิเคราะห์ ในปีงบประมาณ 2550 - 2552 รวมจำนวน 169 ตัวอย่าง พบผิดมาตรฐานประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

31 ตัวอย่าง (ร้อยละ 18.3) โลหะหนักที่พบเกินมาตรฐาน ได้แก่ สารหนู ตะกั่ว และ แคดเมียม

2) **ผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่ไม่มีการขึ้นทะเบียนยา** พบปัญหาการปนปลอมยาแผนปัจจุบัน ผลการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2547-2551 จำนวนทั้งสิ้น 963 ตัวอย่าง พบปนปลอมยาแผนปัจจุบัน 253 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20.1) ตัวยาปนปลอมที่พบมากที่สุดคือ ยากลุ่มสเตียรอยด์ (dexamethasone, prednisolone) ยาแผนปัจจุบันชนิดอื่นๆ ที่พบเช่น ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ยาแก้ปวด ยาแก้แพ้ เป็นต้น

ปัญหาความปลอดภัย

จากฐานข้อมูลเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์จากการใช้ผลิตภัณฑ์สุขภาพ ของศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ พบรายงานผู้ป่วยเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาแผนโบราณ และยา/ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร รวม 720 รายงาน (ข้อมูล เดือน ตุลาคม 2552) ส่วนใหญ่พบในเพศหญิง (ร้อยละ 70.1) อายุเฉลี่ย 47 ± 16 ปี ยาที่สงสัยและอาการที่พบสรุปได้ดังนี้

1) ผลิตภัณฑ์/ยาที่สงสัย ที่ได้รับรายงาน มี 24 รายการ (มีทั้งชนิดที่ขึ้นทะเบียนเป็นยา ผลิตภัณฑ์

เสริมอาหาร และผลิตใช้ภายในโรงพยาบาล) แบ่งได้เป็น

- ยาสูตรตำรับยาแผนโบราณ 2 รายการ คือ ยาเขียว และสหัสธารา
- ผลิตภัณฑ์/ ยาจากสมุนไพร 22 รายการ มีทั้งชนิดผสมและเดี่ยว ส่วนใหญ่เป็นราย-การยาจากสมุนไพร ตามบัญชียาหลักแห่งชาติ และรายการยาที่อยู่ในโครงการเฝ้าระวังความปลอดภัยของกรมแพทย์แผนไทย เช่น ขมิ้นชัน ฟ้าทะลาย ใจรว เพชรสังฆาต เถาวัลย์เปรียง มะระ-ขึ้นนก ใบบัวบก เป็นต้น

2) เหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่ได้รับรายงานส่วนใหญ่ (ร้อยละ 94.3) ไม่ร้ายแรง เป็นอาการทางระบบผิวหนังเช่น ผื่น คัน และระบบทางเดินอาหาร เช่น ปวดท้อง ท้องอืด ท้องผูก เป็นต้น สำหรับอาการที่ร้ายแรง เช่น Steven Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis , anaphylactic shock, hepatitis เป็นต้น อาการเหล่านี้เกิดขึ้นในช่วงเวลาหรือภายหลังจากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่สงสัย อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาเชิงวิเคราะห์ยืนยันความสัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์ที่สงสัย

กระบวนการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ

ธนิต ตริธพันธ์

กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

บทคัดย่อ

ยาแผนโบราณ จัดเป็นยาประเภทหนึ่งตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ.2510 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม โดยยาแผนโบราณ หมายถึง ยาที่มีมุ่งหมายสำหรับใช้ในการประกอบโรคศิลปะแผนโบราณ หรือการบำบัดโรคสัตว์ ซึ่งอยู่ในตำรายาแผนโบราณที่รัฐมนตรีประกาศ หรือยาที่รัฐมนตรีประกาศเป็นยาแผนโบราณ หรือยาที่ได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนตำรับยาเป็นยาแผนโบราณ โดยมีกองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นหน่วยงานที่กำกับดูแล ผู้ที่จะยื่นขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณจะต้องเป็นผู้รับอนุญาตผลิตยาแผนโบราณ หรือผู้รับอนุญาตนำเข้าหรือส่งยาแผนโบราณเข้ามาในราชอาณาจักรแล้วแต่กรณี สำหรับการพิจารณาคำขอขึ้นทะเบียนตำรับยาจะมีประเด็นในการพิจารณาคือ ชื่อยา สูตรส่วนประกอบ วิธีทำ สรรพคุณ ขอบ่งใช้ ความปลอดภัย ฉลากและเอกสารกำกับยา โดยมีหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณา คือ องค์ความรู้ตามตำรายาที่รัฐมนตรีประกาศ พระราชบัญญัติยา กฎกระทรวงฯ ประกาศกระทรวงฯ มติกรรมการยา และมติคณะอนุกรรมการที่เกี่ยวข้อง

ขั้นตอนการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ มี 3 ขั้นตอน คือ

1. ขออนุญาตผลิต หรือนำส่งฯ ยาตัวอย่าง
2. ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ตามที่กำหนด
3. ขอขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ

บทบาทของอาหาร โภชนาการ การออกกำลังกายกับการป้องกันมะเร็ง ในมุมมองของผู้เชี่ยวชาญทั่วโลก

ชนิพรรณ บุตรยี่

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่มา

รายงาน The second expert report on Food, Nutrition, Physical activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective จัดทำโดย World Cancer Research Fund ร่วมกับ American Institute for Cancer Research เป็นการรวบรวม ประเมินตัดสินและสรุปรายงานการวิจัยกว่า 7,000 เรื่องที่ทำการศึกษาวิจัยบทบาทความสัมพันธ์ของอาหาร การออกกำลังกาย ภาวะน้ำหนักเกิน และความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งโดยผู้เชี่ยวชาญที่เป็นนักวิชาการที่เป็นที่ยอมรับจากทั่วโลก ทำการรวบรวมข้อมูลจากรายงานการวิจัยโดยใช้เวลาดำเนินการรวบรวม 5 ปี มีการจัดตั้งคณะทำงานเฉพาะกิจที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาอาหาร โภชนาการ กับโรคมะเร็ง ร่วมกันกำหนดรูปแบบการทบทวนรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างเป็นระบบ ทำการรวบรวมรายงานการวิจัย โดยอ้างอิงตามกติกาที่กำหนดขึ้น คณะผู้เชี่ยวชาญทำการประเมินผลงานวิจัยที่รวบรวมทำการตัดสินร่วมกัน สรุปเป็นรายงานและนำเสนอในรูปแบบของข้อแนะนำ (Recommendations) ในการบริโภคเพื่อการป้องกันมะเร็ง โดยรายงานฉบับดังกล่าวมีวัตถุประสงค์ที่จะนำเสนอพบสรุป และข้อแนะนำต่างๆ เผยแพร่แก่ผู้กำหนดนโยบายของรัฐในทุกระดับ องค์การที่เกี่ยวข้องในการกำกับดูแลด้านสาธารณสุข หน่วยงานทางการศึกษาที่จัดการเรียนการสอนตลอดจนงานวิจัยด้านอาหารกับการป้องกัน

มะเร็ง ทั้งนี้ได้แจกจ่ายไปทั่วโลกตั้งแต่พฤศจิกายน พ.ศ. 2550

วิถีชีวิตและแบบแผนการบริโภคมีผลต่อ อุบัติการณ์ของโรคมะเร็ง

อุบัติการณ์ของมะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมมากกว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรม มีการยืนยันผลโดยการศึกษากลุ่มคนที่มีเชื้อชาติเดียวกันแต่ย้ายถิ่นพำนักไปยังประเทศอื่นพบว่าอุบัติการณ์ของการเป็นมะเร็งบางประเภท ได้แก่ กระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เต้านม และต่อมลูกหมาก ที่แตกต่างไปจากคนพื้นถิ่นดั้งเดิมที่ยังคงอยู่ในถิ่นฐานเดิมของตน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่ารูปแบบการบริโภคอาหาร การดื่ม การออกกำลังกาย รวมทั้งส่วนประกอบของร่างกาย (body composition) ที่มีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงจากบรรพบุรุษมาสู่ยุคปัจจุบันล้วนมีผลต่ออุบัติการณ์ของมะเร็ง แบบแผนการบริโภคในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงสู่สังคมเมืองและอุตสาหกรรม การได้มาซึ่งอาหารสะดวกและรวดเร็วมากขึ้น ชนิดของอาหารมักเป็นประเภทที่อุดมไปด้วยพลังงานหรือแคลอรี ไขมัน น้ำมัน น้ำตาล และมีส่วนประกอบของวัตถุเจือปนอาหาร มีการดื่มแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ในขณะที่การบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของรากและหัวของพืชน้อยลง ในขณะเดียวกันวิถีชีวิตที่มีสิ่งอำนวยความสะดวกมากขึ้นมีผลให้การใช้พลังงาน

ในชีวิตประจำวันลดลงมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของคน
 อ้วนมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้สัมพันธ์กับ
 การเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของการเกิดมะเร็งใน
 ภูมิภาคต่างๆ ในโลกคือพบอุบัติการณ์สูงขึ้นของ
 มะเร็งในทางเดินอาหารส่วนบนได้แก่ ช่องปาก คอ
 หอย กล่องเสียง หลอดอาหาร และพบอุบัติการณ์
 สูงขึ้นของมะเร็งโพรงจมูก กระเพาะอาหาร ตับ และ
 ปากมดลูก ในกลุ่มประเทศที่มีรายได้ต่อประชากร
 ระดับต่ำ หรือระดับกลาง เช่น กลุ่มประเทศแถบแอฟ-
 ริกา เอเชีย และลาตินอเมริกา ในขณะที่อุบัติการณ์
 ของมะเร็งบางประเภท เช่น มะเร็งกระเพาะอาหารพบ
 ลดลงในปัจจุบัน ในทางตรงกันข้ามกลุ่มประเทศที่มี
 รายได้ต่อประชากรสูง กลุ่มประเทศอุตสาหกรรม
 หรือคนที่อยู่ในชุมชนเมืองของประเทศที่มีรายได้ต่อ
 ประชากรระดับปานกลางและต่ำ พบอุบัติการณ์ของ
 มะเร็งบางประเภท เช่น ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และ
 มะเร็งประเภทที่มีความสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมน
 (เต้านม รังไข่ เนื้อเยื่อมดลูก และต่อมลูกหมาก) ใน
 อัตราที่สูงขึ้น มะเร็งปอดกลายเป็นมะเร็งที่พบได้
 ทั่วไปในทุกภูมิภาคเนื่องมาจากการสูบบุหรี่หรือการ
 อยู่ในสิ่งแวดล้อมของการได้รับควันบุหรี่

ข้อแนะนำในการป้องกันมะเร็ง

คณะผู้เชี่ยวชาญได้นำหลักฐานงานวิจัยที่
 เชื่อถือมาพิจารณา เพื่อหาข้อสรุปของความสัมพันธ์
 ของอาหารประเภทต่างๆ วิถีชีวิต ภาวะร่างกาย การ
 ออกกำลังกาย สิ่งแวดล้อม กับความเสี่ยงต่อการเกิด
 หรือการป้องกันมะเร็ง โดยสรุปและจัดประเภทของ
 หลักฐานเป็น 4 ระดับดังนี้

Convincing: เป็นที่แน่นอน บ่งชี้ชัดเจน

Probable: มีความเป็นไปได้ค่อนข้างมาก

Limited-suggestive: ยัง ต้อง อาศัย ข้อมูล
 เพิ่มเติมก่อนที่จะสรุป

Substantial effect: หลักฐานยืนยันน้อย ยังสรุป
 ไม่ได้

ตารางที่ 1 แสดงข้อสรุปของความสัมพันธ์ของ
 อาหาร วิถีชีวิต การออกกำลังกาย สิ่งแวดล้อมกับ
 ความเสี่ยงต่อการเกิด หรือการป้องกันมะเร็งต่างๆ ที่มี
 หลักฐานยืนยันว่าเป็นที่แน่นอนบ่งชี้ชัดเจน ส่วน
 ความสัมพันธ์ที่มีหลักฐานยืนยันว่ามีความเป็นไปได้
 ค่อนข้างมากได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ ตารางที่ 3

ข้อมูลที่ถูกจัดทำเป็นข้อแนะนำ (Recom-
 mendations) ที่นำมาเผยแพร่สู่สาธารณะ คือข้อมูลใน
 ส่วนที่มีหลักฐานงานวิจัยที่ระดับความน่าเชื่อถือ
 จัดเป็นประเภทที่แน่นอนบ่งชี้ชัดเจน และมีความเป็นไปได้
 ค่อนข้างมาก ข้อแนะนำที่จัดทำเพื่อเผยแพร่สู่
 สาธารณะแบ่งออกเป็น 8 ข้อ และข้อแนะนำพิเศษอีก
 2 ข้อ ดังต่อไปนี้

ข้อแนะนำที่ 1: ไขมันในร่างกาย (Body fatness)

“ควรมีค่าน้ำหนักตัวอยู่ในเกณฑ์ปกติ”

ค่าดัชนีมวลกายหรือ Body Mass Index (BMI)
 ควรอยู่ระหว่าง 21-23 ทั้งนี้ให้ขึ้นกับเกณฑ์มาตรฐาน
 ของกลุ่มประชากรในภูมิกษณัณนั้นๆ ทั้งนี้ให้แน่ใจว่า
 น้ำหนักตัวในช่วงวัยเด็กและวัยรุ่นจนอายุ 21 ปี อยู่
 ในช่วงค่า BMI เท่ากับ 21 และสามารถรักษาน้ำหนัก
 ตัวให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้หลังจากอายุ 21 ปี เมื่อเข้าสู่
 วัยผู้ใหญ่ให้ระวังน้ำหนักตัวและเส้นรอบเอวที่เพิ่มขึ้น
 ทั้งนี้การรักษาน้ำหนักตัวให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน
 ตลอดช่วงอายุสามารถป้องกันมะเร็งและโรคไม่ติดต่อ
 เรื้อรังต่างๆ ได้แก่ ไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง

ตารางที่ 1 ข้อสรุปของความสัมพันธของอาหาร วิถีชีวิต การออกกำลังกาย สิ่งแวดล้อม กับความเสี่ยงต่อการเกิดหรือการป้องกันมะเร็งต่างๆที่มีหลักฐานยืนยันว่า เป็นที่แน่นอน
ชัดเจน (↑ เพิ่มความเสี่ยง ↓ ลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง)

วิถีชีวิตและการบริโภค	ชนิดของมะเร็ง									
	เต้านม (วัยก่อนหมด ประจำเดือน)	เต้านม (วัยหลังหมด ประจำเดือน)	ปอด	ช่องปาก คอหอย กล่องเสียง	หลอด อาหาร	ตับ	ลำไส้ใหญ่ และ ทวารหนัก	ไต	เนื้อเยื่อ มดลูก	
การดื่มแอลกอฮอล์	↑	↑		↑	↑		↑ *			
ไขมันในร่างกาย		↑			↑		↑	↑		↑
อ้วนลงพุง							↑			
ออฟลาทอกซิน						↑				
เนื้อแดง							↑			
เนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการปรุงแต่ง							↑			
อาร์เซนิกในน้ำดื่ม			↑							
เบต้า-แคโรทีน (ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร)			↑							
การออกกำลังกาย								↓		
การให้นมบุตร	↓		↓							

* เฉพาะในผู้ชาย

ตารางที่ 2 ข้อสรุปของความสัมพันธ์ของอาหาร วิถีชีวิต การออกกำลังกาย สิ่งแวดล้อม กับความเสี่ยงต่อการเกิดหรือการป้องกันมะเร็งกลุ่มระบบทางเดินอาหารและหายใจ
ที่มีหลักฐานยืนยันว่า มีความเป็นไปได้ค่อนข้างมาก (↑ เพิ่มความเสี่ยง, ↓ ลดความเสี่ยง)

วิถีชีวิตและการบริโภค	ชนิดของมะเร็ง						
	โพรงจมูก	กระเพาะอาหาร	ปอด	ช่องปาก-คอหอย กล่องเสียง	หลอดอาหาร	ตับอ่อน	ตับ ลำไส้ใหญ่และ ทวารหนัก
การดื่มแอลกอฮอล์							↑**
อ้วนลงพุง						↑	
ผักใบ		↓		↓	↓		
ผักกลุ่มหอม		↓					
ผลไม้		↓	↓	↓	↓		
อาหารที่มีแคโรทีนอยด์			↓	↓			
อาหารที่มีเบต้า-แคโรทีน					↓		
อาหารที่มีวิตามินซี					↓		
ปลาเค็มตากแห้ง*	↑						
เกลือและอาหารที่หมักเกลือ		↑					
อาหารที่มีโฟเลต						↓	
อาหารที่มีใยอาหาร							↓
กระเทียม							↓
นม							↓
แคลเซียม							↓
(ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร)							↓

* Cantonese-style salted fish หรือปลาเค็มตากแห้ง เป็นกรรมวิธีการหมักปลาโดยใช้เกลือปริมาณน้อยแล้วนำไปตากแดด เป็นอาหารพื้นเมืองของชาวฮั่นทางตอนใต้ ไต้หวัน มาเลเซียและสิงคโปร์

** พบความเสี่ยงที่ไม่ได้ค่อนข้างมากในผู้หญิง ส่วนผู้ชายเป็นทั้งที่แน่นอนบ่งชี้ชัดเจน

ตารางที่ 3 ข้อสรุปของความสัมพันธ์ของอาหาร วิถีชีวิต การออกกำลังกาย สิ่งแวดล้อม กับความเสี่ยงต่อการเกิดหรือการป้องกันมะเร็งเต้านม เนื้อเยื่อบุมดลูก ต่อมลูกหมากและผิวหนังที่มีหลักฐานยืนยันว่า **มีความเป็นไปได้ค่อนข้างมาก** (↑ เพิ่มความเสี่ยง, ↓ ลดความเสี่ยง)

วิถีชีวิตและการบริโภค	ชนิดของมะเร็ง				
	เต้านม (วัยก่อนหมด ประจำเดือน)	เต้านม (วัยหลังหมด ประจำเดือน)	เนื้อเยื่อ บุมดลูก	ต่อมลูกหมาก	ผิวหนัง
การออกกำลังกาย		↓	↓		
น้ำหนักแรกคลอดมากเกินไป	↑				
อ้วนลงพุง		↑	↑		
น้ำหนักเกินในวัยผู้ใหญ่		↑			
อาหารที่มีไลโคปีน				↓	
อาหารที่มีเซเลเนียม				↓	
เซเลเนียม (ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร)				↓	
อาหารที่มีแคลเซียมสูง				↑	
อาร์เซนิกในน้ำดื่ม					↑

โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง และ
โรคเบาหวานชนิดที่ 2

ข้อแนะนำที่ 2: การออกกำลังกาย

(Physical activity)

“ควรออกกำลังกายให้เป็นกิจวัตรประจำวัน”

ออกกำลังกายระดับปานกลาง หรือเดินเร็ว
อย่างน้อยวันละ 30 นาที หากสมรรถภาพดีขึ้นให้เพิ่ม
เป็น 60 นาที หรือออกกำลังกายแบบหนัก 30 นาทีทุก
วัน ลดกิจวัตรที่ทำให้ร่างกายใช้พลังงานน้อย เช่น
การดูโทรทัศน์ การออกกำลังกายสามารถช่วยป้องกัน
ภาวะอ้วน และมะเร็งบางประเภท เช่น มะเร็งลำไส้
ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งเต้านม (โดยเฉพาะหญิงวัย
หมดประจำเดือน) และมะเร็งเนื้อเยื่อบุมดลูก

ข้อแนะนำที่ 3: อาหารและเครื่องดื่มที่มีผลต่อการ
เพิ่มน้ำหนักตัว (Foods and drinks that promote

weight gain)

“จำกัดอาหารที่ให้พลังงานสูงและหลีกเลี่ยงเครื่องดื่ม
ที่มีรสหวาน”

อาหารที่ให้พลังงานสูงระหว่าง 225-275 กิโล-
แคลอรีต่อ 100 กรัม ให้บริโภคแต่ปริมาณน้อย
รวมทั้งให้จำกัดอาหารที่ผ่านกระบวนการที่ให้
พลังงานสูงด้วย ทั้งนี้ไม่รวมอาหารที่ให้พลังงานสูง
แต่ไม่ผ่านกระบวนการประกอบอาหาร เช่น ถั่ว เมล็ด
ธัญพืชและน้ำมันพืชที่นำมาเป็นส่วนประกอบใน
อาหารทั่วไป จำกัดเครื่องดื่มที่เติมน้ำตาลรวมทั้งน้ำ
ผลไม้ หลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารฟาสต์ฟู้ดที่มักให้
พลังงานสูง และปริมาณค่อนข้างมากต่อการบริโภค
ใน 1 ครั้ง

ข้อแนะนำที่ 4: อาหารกลุ่มพืช ผัก (Plant foods)

“ควรบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบหลักจากพืช ผัก”
พืชผักในที่นี้แนะนำเฉพาะกลุ่มพืชที่ไม่ได้ให้

แป้ง (non-starchy vegetables) เท่านั้นได้แก่ ผักใบเขียวต่างๆ บรอกโคลี กระเจียบเขียว มะเขือยาว ผักฮ่องเต้ (bokchoy) เป็นต้น รวมทั้งกลุ่มรากและหัวพืชที่ไม่ได้ให้แป้ง เช่น แครอท แก่นตะวัน (Jerusalem artichokes) ขึ้นฉ่าย และหัวผักกาด ส่วนผลไม้ควรเลือกบริโภคหลากหลายสี ไม่ควรบริโภคพืชที่มีส่วนประกอบจากแป้ง เช่น มันฝรั่ง มันสำปะหลัง มันเทศ ในแต่ละวันควรบริโภคผักและผลไม้ให้หลากหลายรวมแล้วให้ได้ปริมาณ 400 กรัม หากคนในท้องถิ่นใดที่มีการบริโภคผักและหัวพืชที่ให้แป้ง เป็นอาหารพื้นถิ่นเช่น ชาวแอฟริกัน ลาตินอเมริกัน เอเชียแปซิฟิก ก็ให้แน่ใจว่าได้มีการเสริมผักใบ ผลไม้ และถั่วอย่างเพียงพอ

ข้อแนะนำที่ 5: อาหารจากสัตว์ (Animal foods)

“จำกัดการบริโภคเนื้อแดง (red meat) และ

หลีกเลี่ยงการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผ่าน

กระบวนการปรุงแต่ง (processed meat)”

เนื้อแดง (red meat) ได้แก่ เนื้อหมู วัว แกะ และแพะ ผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านกระบวนการปรุงแต่ง (processed meat) หมายถึง เนื้อ ที่ ถูก ผ่าน กระบวนการ รมควัน (smoking) หมักเกลือ (curing or salting) หรือใส่สารกันเสีย (chemical preservatives) แนะนำการบริโภคเนื้อแดงไม่เกิน 500 กรัม ต่อ 1 สัปดาห์ และพยายามหลีกเลี่ยงผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านกระบวนการปรุงแต่ง

มีหลักฐานงานวิจัยมากมายสรุปว่ากลุ่มที่บริโภคอาหารมังสวิรัตมีความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งต่ำส่วนกลุ่มที่นิยมบริโภคเนื้อแดง และผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านกระบวนการปรุงแต่งให้ผลที่เป็นที่ แน่นอนบ่งชี้ชัดเจนต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และ

ทวารหนัก ส่วนการบริโภคเนื้อสัตว์ติดมันจะมีผลคือให้พลังงานสูงส่งผลให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น

ข้อแนะนำที่ 6: เครื่องดื่มแอลกอฮอล์

(Alcoholic drinks)

“จำกัดการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์”

หากดื่ม กำหนดให้ไม่เกินวันละ 2 ดริงค์สำหรับผู้ชายและไม่เกินวันละ 1 ดริงค์สำหรับผู้หญิง ห้ามดื่มในเด็กและหญิงมีครรภ์ [1 ดริงค์มีส่วนประกอบของเอทานอล 15 กรัม หรือโดยประมาณเท่ากับเบียร์ (แอลกอฮอล์ 3-7%) 10 ออนซ์, หรือไวน์ (แอลกอฮอล์ 9-15%) 3-4 ออนซ์, หรือวิสกี้ บรั่นดี รัม วอดก้า (แอลกอฮอล์ 35-50%) 1 ออนซ์] ทั้งนี้ไม่มีข้อแตกต่างของความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น เบียร์ ไวน์ เหล้า และอื่นๆ

คณะผู้เชี่ยวชาญสรุปว่าการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นที่ แน่นอนบ่งชี้ชัดเจนว่าเพิ่มความเสี่ยงของมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ ช่องปาก คอหอย กล่องเสียง หลอดอาหาร มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เต้านม (ทั้งในวัยก่อนและหลังหมดประจำเดือน) และ มีความเป็นไปได้ค่อนข้างมากต่อการเกิดมะเร็งตับ

ข้อแนะนำที่ 7: อาหารที่ผ่านกระบวนการยืดอายุ

การเก็บรักษา (Preservation, processing, preparation)

“จำกัดการบริโภคเกลือ (salt) รวมทั้งอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักเกลือ อาหารรสเค็ม หลีกเลี่ยงถั่วหรือธัญพืชที่ปนเปื้อนอฟลาทอกซิน”

ทั้งนี้ให้จำกัดการบริโภคอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักเกลือโดยการได้รับไม่ควรเกิน 6 กรัม หรือ 2.4 กรัมของโซเดียมต่อวัน เนื่องจากมีหลักฐานยืนยันว่า มีความเป็นไปได้ค่อนข้างมากต่อความเสี่ยงของ

มะเร็งกระเพาะอาหาร กรรมวิธีการยืดอายุการเก็บ โดยไม่ใช่เกลือทำได้โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้ เก็บในตู้เย็น เก็บในช่องแช่แข็ง การทำให้แห้ง การบรรจุขวดหรือกระป๋อง และการหมัก ส่วนอาหารที่มีการปนเปื้อนออฟลาทอกซินพบว่ามีผลเป็นที่แน่นอน บ่งชี้ชัดเจนว่าเพิ่มความเสี่ยงต่อมะเร็งตับ

ข้อแนะนำที่ 8: ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

(Dietary Supplements)

“ควรได้รับสารอาหารอย่างเพียงพอ

โดยบริโภคจากอาหารเท่านั้น”

ไม่แนะนำการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อการป้องกันมะเร็ง แต่ยกเว้นกรณีเจ็บป่วย หรือมีภาวะขาดสารอาหารบางชนิดอาจพิจารณาเสริมเป็นบางกรณี มีหลักฐานงานวิจัยแสดงว่าการได้รับอาหารเสริมในรูปผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีผลทั้งด้านการป้องกัน และส่งเสริมการเกิดมะเร็งบางชนิด เช่น กรณีการเสริมเบต้า-แคโรทีน มีรายงานการวิจัยเป็นที่แน่นอน บ่งชี้ชัดเจนว่าเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปอด ส่วนการเสริมแคลเซียมมีความเป็นไปได้ค่อนข้างมากต่อการลดอัตราเสี่ยงของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ส่วนเซลล์เนียมยังต้องอาศัยข้อมูลเพิ่มเติมก่อนที่จะสรุป ว่ามีผลต่อการลดความเสี่ยงของมะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก แต่ที่น่าสนใจคือ การเสริมเซลล์เนียมมีความเป็นไปได้ค่อนข้างมากต่อการลดความเสี่ยงของมะเร็งต่อมลูกหมาก ข้อแนะนำที่สรุปได้จากกลุ่มผู้เชี่ยวชาญในเรื่องการเสริมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้นผู้เชี่ยวชาญแนะนำให้เสริมในรูปของอาหารที่อุดมไปด้วยสารอาหารจะปลอดภัยกว่า

ข้อแนะนำพิเศษที่ 1: การให้นมบุตร

(Breast Feeding)

“แม่ควรให้น้ำนมแก่ลูกและ

เด็กทารกควรที่จะได้รับน้ำนมแม่”

การให้ทารกได้รับน้ำนมจากแม่สามารถปกป้องได้ทั้งแม่และเด็ก โดยมีหลักฐานงานวิจัยสนับสนุนแบบเป็นที่แน่นอน บ่งชี้ชัดเจน ว่าสามารถลดความเสี่ยงของมะเร็งเต้านมทั้งแบบที่เกิดในขณะวัยมีประจำเดือน หรือมะเร็งเต้านมที่เกิดหลังวัยมีประจำเดือน ส่วนประโยชน์ต่อเด็กคือป้องกันภาวะอ้วนในทารก การติดเชื้อ สร้างระบบภูมิคุ้มกัน และเสริมสร้างความสัมพันธ์ระหว่างแม่กับลูก ทั้งนี้ควรให้นมแม่เพียงอย่างเดียว ตั้งแต่แรกคลอดจนถึง 6 เดือนโดยไม่มีการให้อาหาร หรือเครื่องดื่มใดๆ เลย รวมทั้งน้ำด้วย หลังจาก 6 เดือนไปแล้วจึงให้อาหารเสริมแก่ทารก

ข้อแนะนำพิเศษที่ 2: ผู้ป่วยมะเร็ง

(Cancer Survivors)

“ให้ปฏิบัติตามแนวทางเดียวกับการป้องกันมะเร็ง”

Cancer Survivors คือคนที่ตรวจพบมะเร็งรวมทั้งผู้ป่วยมะเร็งที่อยู่ระหว่างรักษาและผ่านการรักษาแล้ว ผู้ป่วยมะเร็งทุกคนควรได้รับการดูแลด้านโภชนาการจากผู้เชี่ยวชาญด้านโภชนาการ โดยปฏิบัติตามแนวทางเดียวกับการป้องกันมะเร็งทั้งด้านอาหาร โภชนาการ การออกกำลังกาย และการควบคุมน้ำหนักตัว แต่ไม่รวมผู้ป่วยมะเร็งที่กำลังอยู่ระหว่างการรักษาตัวในโรงพยาบาล

กลุ่มผู้เชี่ยวชาญได้ให้ความเห็นว่าการรักษา มะเร็งประสบผลสำเร็จมากขึ้น มีผลให้ผู้ป่วยมีชีวิต นานต่อไปได้อีกจนมีผลต่อการเกิดมะเร็งที่อวัยวะ ส่วนอื่นได้ รวมทั้งการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังอื่นๆ ได้

อีก ดังนั้นจึงควรปฏิบัติตามข้อแนะนำทั้งหมดที่ระบุในรายงานที่จัดทำขึ้นนี้เพื่อลดความเสี่ยงต่อโรคที่กล่าวมานั่นเอง

สรุปและแนวทางการวิจัยในอนาคต

บทบาทของอาหาร โภชนาการ การออกกำลังกายกับการป้องกันมะเร็ง ยังต้องการงานวิจัยมาสนับสนุนอีกมากมาย เช่น ในส่วนข้อมูลที่ถูกจัดระดับ “มีความเป็นไปได้ค่อนข้างมาก” และ “ยังต้องอาศัยข้อมูลเพิ่มเติมก่อนที่จะสรุป” ส่วนข้อมูลที่ถูกจัดระดับ “เป็นที่แน่นอน บ่งชัดเจน” ก็ควรมีการศึกษาต่อในเรื่องของขนาดหรือปริมาณการ

บริโภค ระยะเวลาการได้รับของปัจจัยนั้นๆ ว่าเมื่อใดหรือเท่าใดจึงจะมีผลต่อการเพิ่มความเสี่ยง หรือมีผลในด้านการป้องกันมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, DC: AICR, 2007.

ศักยภาพด้านมะเร็งของตำรับอาหารไทย

ผศ. ดร. สมศรี เจริญเกียรติกุล

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกลักษณ์ และวัฒนธรรมอาหารไทย

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการดำรงชีวิต อาหารไทยดั้งเดิมประกอบด้วย ข้าว ปลา รวมถึงสัตว์อื่นและพืชผักที่อยู่ใกล้ๆ วิธีปรุงอาหารส่วนใหญ่ที่ใช้ก็ง่ายๆ เช่น ปิ้ง/ย่าง ต้ม ตำ(น้ำพริก) และต่อมามีการใช้กะทิ น้ำมัน ในการปรุงเมื่อมีวัฒนธรรมจากชาติอื่นเข้ามา การประกอบอาหารไทยถือว่าเป็นทั้งศาสตร์และศิลป์ “ศาสตร์” คือการปรุงอาหารที่สามารถรักษาคุณภาพของอาหารให้มากที่สุดทั้งในเชิงคุณภาพของอาหารและคุณค่าทางโภชนาการ “ศิลป์” คือความพิถีพิถันในการเลือกสรรเครื่องปรุงที่ใช้ การจัดเตรียมอาหาร ให้มีทั้งรูป รส กลิ่น และสีที่ชวนบริโภค อาหารไทยได้ชื่อว่าเป็นอาหารที่มีรสชาติหลากหลาย ทั้งเปรี้ยว หวาน มัน เค็ม เผ็ด แต่กลมกล่อม เกิดจากภูมิปัญญาในการผสมผสานเครื่องปรุงต่างๆ ให้เหมาะสม ลักษณะเด่นคือ มีกลิ่นหอมจากสมุนไพรและเครื่องเทศ ที่นิยมใช้ของสดมากกว่าของแห้ง นอกจากนั้น อาหารไทยยังมีความหลากหลายของประเภทอาหาร เช่น แกงและต้ม ยำและพล่า เครื่องจิ้ม ผัดและทอด เครื่องเคียงและเบ็ดเตล็ด ความหลากหลายดังกล่าว มีคุณค่าต่อสุขภาพในด้านความสมดุลทางโภชนาการ และคุณประโยชน์จากสารเชิงพันธุภาพที่มีในส่วนประกอบต่างๆ เป็นวัฒนธรรมหนึ่งที่มีความเป็นเอกลักษณ์ของตัวเอง เป็นที่ยอมรับของคนทั่วโลก

การกินอาหารของครอบครัวไทย เป็นกิจกรรม

กลุ่ม รูปแบบการกินเป็นสำหรับไทยถือว่ามีความเหมาะสมต่อสุขภาพ คือกินข้าวเป็นหลักร่วมกับกับข้าวในสำรับ ที่มีอาหารตั้งแต่ 2 - 3 อย่างขึ้นไป หลักการจัดสำรับอาหารไทยมักคำนึงถึงประเภท รสชาติ วัตถุดิบ เนื้อสัมผัส และสีที่หลากหลายน่ารับประทานกันได้ดี ในอดีตการจัดสำรับอาหารให้เข้าชุดกัน เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความอุดมสมบูรณ์และวัฒนธรรมของคนไทย จากความหลากหลายของชนิดอาหารทำให้สามารถสลับเปลี่ยนหมุนเวียนรายการอาหารได้มาก ดังนั้นอาหารไทยในแต่ละมื้อจึงเป็นอาหารที่มีครบทุกหมู่ ให้สารอาหารได้หลากหลายและปริมาณไม่มากเกินไป ทำให้เสี่ยงต่อการได้รับสารอาหารบางอย่างมากเกินไป ต่างจากอาหารตะวันตก

การเปลี่ยนแปลงการกินอาหารกับปัญหาโรคโภชนาการของคนไทย

โลกปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีรวมทั้งการสื่อสารทำให้การเปลี่ยนข่าวสาร และเผยแพร่วัฒนธรรมทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น คนไทยจึงรับและปรับเปลี่ยนวัฒนธรรมตามแบบสากลนิยมมากขึ้น รวมทั้งวัฒนธรรมการกิน อีกทั้งสภาพสังคมแบบครอบครัวเดี่ยวที่ขยายจำนวนเพิ่มขึ้น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงบริโภคนิสัยของคนไทย ที่เน้นความสะดวก รวดเร็วเป็นหลัก เห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของร้านอาหารแบบเร่งด่วน การกินอาหารนอกบ้าน หรือการบริโภคอาหารริมบาทวิถีซึ่งอาจเป็นอาหารปรุงสำเร็จที่ด้อยคุณค่าทางโภชนาการ

หรือมีการปนเปื้อนของสารพิษ เชื้อจุลินทรีย์ ต่างๆ ได้ การเปลี่ยนแปลงนี้นอกจากจะมีผลเสียต่อภาวะสุขภาพแล้ว ยังอาจก่อให้เกิดการสูญเสียเอกลักษณ์ และวัฒนธรรมการกินอาหารของคนไทยได้

ประเทศไทยในระยะเปลี่ยนผ่าน ที่มีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากร ภาวะเศรษฐกิจและสังคม รวมทั้งความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี ส่งผลกระทบต่อปัญหาด้านโภชนาการ และสุขภาพของประชากรไทย และเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและตาย โดยเฉพาะในกลุ่มวัยทำงาน และผู้สูงอายุ ทำให้รัฐสูญเสียในด้านเศรษฐกิจรวมทั้งทรัพยากรบุคคลไปอย่างมาก สาเหตุการตายจากโรคที่สำคัญของคนไทยที่มีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน เป็นต้น สาเหตุเบื้องต้นที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการกินอาหารที่ไม่สมดุล ขาดความหลากหลายของชนิดอาหารที่กินประจำวัน ทำให้เสี่ยงต่อการได้รับสารอาหารบางชนิดมากเกินไป หรือน้อยไป จนเกิดเป็นภาวะทุพโภชนาการที่มีทั้งขาดและเกินร่วมกัน (Double burden of malnutrition) ในบางกลุ่มประชากร หรือแม้แต่ในคนๆ เดียวกันก็ได้ เช่น การได้รับพลังงาน ไขมัน น้ำตาล หรือโซเดียม มากเกินไป ถือว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดภาวะโภชนาการเกิน ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคอ้วน ภาวะไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และมะเร็ง ขณะเดียวกันก็อาจมีการขาดโปรตีน ธาตุเหล็ก หรือแคลเซียม ร่วมด้วย เป็นต้น

บทบาทของอาหารในการป้องกันโรค

จากทฤษฎีที่ว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุในการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญ จึงมีการรณรงค์ให้

บริโภคผัก ผลไม้ มากขึ้น มีรายงานว่าคนที่บริโภคผัก ผลไม้เป็นประจำ จะลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งลำไส้ใหญ่¹ เพราะนอกจากผัก ผลไม้จะเป็นแหล่งที่ดีของวิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายแล้ว ยังมีใยอาหาร สารพฤกษเคมี (สารสังเคราะห์จากพืช) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกมากมาย สารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลง หรือการถูกทำลายของเนื้อเยื่อในร่างกายจากอนุมูลอิสระได้ ทำให้มีการวิจัยถึงบทบาทของพืช ผัก ผลไม้ ในการป้องกันโรค โดยขยายไปถึงการศึกษาคุณสมบัติของสารพฤกษเคมีชนิดต่างๆ ที่พบว่ามียาต้านมะเร็ง เช่น กระเทียม ขิง ถั่วเหลือง และพืชตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น ส่วนผลไม้ นอกจากมีวิตามินซีสูงแล้ว ยังมีปริมาณโฟเลต โพแทสเซียม และใยอาหารประเภทเพคติน รวมทั้งสารพฤกษเคมีอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดมะเร็งและโรคสำคัญอื่นๆ ได้เช่นกัน

คุณค่าโภชนาการอาหารไทย

อาหารหลักของคนไทยคือข้าว ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต พลังงานแรกที่สำคัญของมนุษย์ และยังให้โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุบางส่วน โดยเฉพาะข้าวซ้อมมือ เนื่องจากยังมีวิตามิน และแร่ธาตุสะสมอยู่มาก โดยเฉพาะวิตามินบีหนึ่งซึ่งช่วยป้องกันโรคเหน็บชา ส่วนอาหารร่วมสำหรับ (กับข้าว) ที่คนไทยนิยมกินมีให้เลือกมากมาย และเป็นแหล่งของสารอาหารที่หลากหลายแตกต่างกัน ขึ้นกับตำรับอาหารแต่ละชนิด เนื้อสัตว์หลักที่คนไทยไม่ว่าภาคไหนมักใช้ประกอบอาหารคือ ปลา โปรตีนจากเนื้อปลาเป็นโปรตีนชั้นดี ย่อยง่าย มีไขมันค่อนข้างน้อย และเป็นไขมันที่มีคุณภาพดี นอกจากนั้นยังมีแหล่งของโปรตีนจาก

สัตว์น้ำอื่นๆ สัตว์บก ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว เป็น ต้น อาหารไทยมีลักษณะขึ้นอาหารที่เล็กๆ พอคำ และมักนำไปประกอบร่วมกับอาหารชนิดอื่น ทำให้ กินแต่พอประมาณเท่านั้น ขณะที่อาหารแบบตะวันตกนิยมเนื้อสัตว์ชิ้นใหญ่ ทำให้มีโอกาสได้รับโปรตีน มากเกินไป และได้ไขมันที่มองไม่เห็นเพิ่มมาด้วย นอกเหนือจากไขมันที่เห็นชัดในรูปน้ำมันปรุงอาหาร อาหารไทยหลายชนิดมีการใช้กะทิ เพราะให้รส หวาน มัน และกลิ่นหอมแบบธรรมชาติที่เป็นเอกลักษณ์ไทย เช่น แกงเขียวหวาน แกงเผ็ด ต้มข่า หรือขนมหวาน มีผู้กล่าวว่ากะทิเป็นสาเหตุของความอ้วน โรคไขมันในเลือดสูงนั้น ถ้ารู้จักกินอาหารให้เหมาะสมแล้ว คงไม่ใช่ประเด็นสำคัญ แต่เป็นเพราะพฤติกรรมการกินที่ไม่ถูกต้อง อาหารหลายชนิดไม่ควรกินประจำทุกวัน หรือบ่อยเกินไป เช่น อาหารทอด มัน หวาน ที่มีพลังงานสูง และ น้ำอัดลม เป็นต้น อาหารไทยโดยทั่วไปมีส่วนประกอบของพืชผักค่อนข้างมาก เป็นแหล่งที่ดีของวิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็น

นอกจากรสชาติแล้วอาหารไทยยังเน้นสีสด ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับข้อแนะนำการบริโภคอาหารแบบง่ายๆ ในหลายประเทศที่ให้กินอาหารที่มีอย่างน้อย 5 สีในแต่ละมื้อ สีสดส่วนใหญ่ได้จาก พืชผัก สมุนไพร เครื่องเทศ และผลไม้ ภาพผักเป็นกระเจาที่กินพร้อมกับขนมจีน แกงไตปลา หรือแกงเหลืองของชาวใต้ จานผักสดชนิดต่างๆ ที่มาพร้อมกับลาบ หรือน้ำพริกต่างๆ ในอาหารภาคอื่นๆ นอกจากนั้น ยังมี แกงส้ม แกงเลียง ซึ่งล้วนแต่มีผักเป็นส่วนประกอบหลัก ประเทศไทยมีผลไม้มากมายให้บริโภคตลอดทั้งปี นอกจากให้ความสดชื่น ความอร่อยแล้วยังมีคุณค่าทางโภชนาการ โดยให้ทั้ง

วิตามิน แร่ธาตุและใยอาหาร ทำให้อาหารไทยมีจุดเด่นที่สำคัญ คือมีใยอาหารสูง ช่วยระบบทางเดินอาหารและการขับถ่าย ตลอดจนนำสารตกค้าง สารพิษ และโคเลสเตอรอล ออกจากร่างกาย ช่วยลดการดูดซึมไขมันจากอาหาร มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ผักและผลไม้ ยังมีสารแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการต้านการเกิดโรคบางชนิด อาทิ โรคหัวใจ ไขมันสูง และโรคมะเร็งบางชนิดได้ การกินอาหารเป็นสำหรับคือ ข้าวกับกับข้าวตั้งแต่ 2 - 3 ชนิด/ประเภท ทำให้มีความเป็นไปได้น้อยที่จะกินอาหารแต่ละชนิดในปริมาณมากๆ ของแต่ละมื้อ การสับเปลี่ยนหมุนเวียนรายการอาหาร/ กับข้าวที่เหมาะสมช่วยให้ได้รับสารอาหารต่างๆ ครบถ้วน และเพียงพอต่อความต้องการตามวัย และภาวะต่างๆ ได้ การกินอาหารซ้ำๆ จะทำให้ขาดสารอาหารบางอย่างได้ เพราะไม่มีอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งที่ให้สารอาหารที่ต้องการได้ครบถ้วน

มะเร็งเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อระบบสาธารณสุขของโลก จากรายงานขององค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ปี พ.ศ. 2545 ระบุว่าผู้ป่วยมะเร็งมากกว่า 20 ล้านคนทั่วโลก และการตายด้วยมะเร็งเป็นร้อยละ 12 ของสาเหตุการตายทั้งหมด ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา สำหรับในประเทศไทย จากสถิติสาธารณสุขปี พ.ศ. 2547 พบว่ามะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ของคนไทย คือมีอัตราตาย 81.3 คนต่อประชากรแสนคน ในจำนวนนี้มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นสาเหตุการตายในอันดับที่ 5 ซึ่งนับว่าเป็นมะเร็งที่ค่อนข้างพบได้มากในประเทศไทย สาเหตุที่สำคัญของการเป็นมะเร็งส่วนหนึ่งเกิดจากการกินอาหารที่ไม่เหมาะสม และการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่เกี่ยวข้องกับ

รูปแบบการกินอาหารถึงร้อยละ 80¹

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่ที่จำเป็นต้องได้รับเป็นประจำ การศึกษาด้านอาหารกับการต้านมะเร็งส่วนใหญ่มักศึกษาถึงคุณสมบัติของสารประกอบเดี่ยวๆ หรือสารสกัดจากอาหาร ซึ่งผลที่ได้อาจแตกต่างจากรูปแบบการกินอาหารปกติที่มีสารนั้นอยู่ เช่น Fontham² พบว่าการกินอาหารที่มีวิตามินเอ และเบต้าแคโรทีนสูงสามารถลดการเกิดมะเร็งปอดได้ แต่กลุ่ม Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group³ และ Omenn และคณะ⁴ พบว่าการให้สารสกัดเบต้าแคโรทีนเสริมในกลุ่มผู้สูบบุหรี่กลับเพิ่มการเกิดมะเร็ง ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกันเช่นนี้ อาจมีสาเหตุจากสารประกอบหลายชนิดในอาหารอยู่ร่วมกัน และมีปฏิสัมพันธ์กันตามธรรมชาติของอาหารแต่ละชนิด จึงส่งผลต่อร่างกายแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาคูณสมบัติอาหารในรูปแบบที่กินทั่วไปเพื่อการป้องกันไม่ใช้การรักษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการเลือกกินอาหารของผู้บริโภคเพื่อผลในการป้องกันมะเร็งได้

ศักยภาพของแกงเลียงในการต้านมะเร็งลำไส้

แกงเลียงเป็นอาหารพื้นบ้านของไทย ที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวในด้านกลิ่นรส เนื่องจากประกอบไปด้วยพืชผักสมุนไพรหลายชนิด โดยเฉพาะกลิ่นจากใบแมงลัก และรสเผ็ดจากพริกไทย ด้านคุณค่าทางโภชนาการแกงเลียงจัดเป็นอาหารที่ให้พลังงานต่ำ และมีใยอาหารสูง นอกจากนี้ในแกงเลียงยังมีสารพฤกษเคมีสำคัญ 2 กลุ่มที่มีผลดีต่อสุขภาพ ได้แก่ กลุ่มแคโรทีนอยด์ และกลุ่มฟลาโวนอยด์^{5,6} ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากการนำสารสกัดเอธานอล

และเฮกเซนของแกงเลียงไปทดสอบศักยภาพการต้านการก่อกลายพันธุ์ (antimutagenicity) ในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 and TA100 ผลปรากฏว่าสารสกัดจากแกงเลียงสามารถต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดี⁷ สารสกัดจากแกงเลียงยังมีศักยภาพอื่นๆ ที่น่าสนใจ ได้แก่ การต้านการเกิด ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งที่อาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้เช่นกัน และ ศักยภาพการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ NAD (P)H: quinone reductase (QR)⁸ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมากในตับ ทำหน้าที่กำจัดสารพิษ และสารก่อมะเร็งบางชนิด สอดคล้องกับรายงาน^{9,10} ที่พบว่าแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ NAD(P)H: quinone reductase ในเซลล์เพาะเลี้ยง และในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้การเติม β -carotene และ lutein¹¹ หรือ quercetin¹² ในอาหารเลี้ยงหนู สามารถยับยั้งการเกิด aberrant crypt foci (ACF) ซึ่งเป็นพยาธิสภาพขั้นเริ่มต้นของมะเร็งในลำไส้ใหญ่ของหนูแรท F344 จากการเหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็ง azoxymethane (AOM) และสามารถลดการเกิด ACF ได้ดีกว่า indomethacin ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งลำไส้¹² จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเหนี่ยวนำเอนไซม์กำจัดสารพิษต่างๆ ได้แก่ Glutathione S-transferases (GST), UDP-glucuronyltransferases (UGT) และ QR ในตับและลำไส้ใหญ่ กับการเกิด ACF ในลำไส้ใหญ่ของหนูแรท Sprague-Dawley บ่งชี้ว่าการเกิด ACF ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ QR¹³ จากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวทำให้เกิดแนวคิดที่แกงเลียงน่าจะเป็นอาหารไทยตำรับหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการต้านมะเร็งได้

ดังนั้นการศึกษาศักยภาพด้านมะเร็งของแองเกลียในหนูแรท (Wistar rat) โดยให้แองเกลียแก่หนู 2 ขนาดคือ 1 และ 2 หน่วยบริโภค (เทียบเคียงกับการบริโภคของคน) โดยการป้อนทางปาก (gavage) ร่วมกับอาหารปกติ เทียบกับหนูที่ไม่ได้แองเกลียเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ระหว่างนั้นมีการฉีดสารก่อมะเร็ง azoxymethane 2 ครั้ง ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3¹⁴ พบว่าการให้แองเกลีย 1 และ 2 หน่วยบริโภคสามารถลดการเกิดพยาธิสภาพขั้นต้นของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ หรือ ACF (ประมาณ 45 %) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแองเกลีย (ตารางที่ 1) สำหรับเอนไซม์ NAD(P)H: QR ได้ทดสอบเฉพาะกลุ่มที่ให้แองเกลีย 2 หน่วยบริโภค พบว่าสามารถเพิ่มระดับ QR (ประมาณ 2.7 เท่า) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแองเกลีย และสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของ ACF ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงศักยภาพเบื้องต้นของแองเกลียในการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองที่เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีสรีระและระบบการทำงานของร่างกายใกล้เคียงกับมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากมนุษย์และสัตว์ทดลองยังมีความแตกต่างกันอยู่ในระบบการ

ตารางที่ 1 จำนวน aberrant crypt foci (ACF) ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง¹⁴

กลุ่ม	จำนวน ACF ต่อ หนูแต่ละตัว (Mean $\pm$ SE)
กลุ่ม 1 (ฉีด normal saline)	0
กลุ่ม 2 (ฉีด AOM)	262 $\pm$ 61
กลุ่ม 3 (ฉีด AOM, ได้รับแองเกลีย 1 หน่วย)	145 $\pm$ 30*
กลุ่ม 4 (ฉีด AOM, ได้รับแองเกลีย 2 หน่วย)	137 $\pm$ 28*
กลุ่ม 5 (ฉีด normal saline, ได้รับแองเกลีย 2 หน่วย)	0

ทำงานบางอย่าง และอาจมีการตอบสนองต่อสารบางชนิดแตกต่างกัน จึงควรมีการศึกษาในมนุษย์เพิ่มเติมต่อไป

อย่างไรก็ตาม อาจต้องใช้เวลาหลายปีพิสูจน์ว่าสารอาหารตลอดจนสารสำคัญอื่นๆ เช่น สารพฤกษเคมี ที่มนุษย์ได้รับจากการบริโภคอาหารปกติ มีประโยชน์และปลอดภัยกว่าการได้รับในรูปของสารสกัดหรืออาหารเสริม ซึ่งอาจได้รับมากเกินไปและก่อให้เกิดผลเสียหรืออันตรายได้ในระยะยาว เช่น กรณีศึกษาของ β -carotene^{3,4,11} นอกจากนี้สารสำคัญดังกล่าวที่อยู่รวมกันในอาหารอาจมีปฏิสัมพันธ์กันโดยธรรมชาติอยู่แล้ว การบริโภคเป็นอาหารประจำชาติที่มีมาช้านานจึงควรได้รับการส่งเสริมต่อไป

ศักยภาพของตำรับน้ำพริกแองโดยการทดสอบแบบ *in vitro*

คนไทยรู้ถึงสรรพคุณของเครื่องเทศ และสมุนไพรมานานแล้ว จากภูมิปัญญาการใช้ในอาหารประจำวัน โดยนำมาผสมผสานเข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดกลิ่น รส เฉพาะตัว เช่น น้ำพริกแองต่างๆ สมุนไพรหลายอย่างมีงานวิจัยยืนยันถึงประโยชน์เชิงสุขภาพเพิ่มมากขึ้น แต่ยังไม่มียานวิจัยใดมุ่งศึกษาประโยชน์ในรูปแบบที่บริโภคจริง เช่นการนำสมุนไพรเหล่านี้นำมาผสมรวมกันเป็นน้ำพริกแอง และนำไปทำเป็นอาหารว่ามีคุณค่าหรือไม่ อย่างไร ในระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 จึงมีการศึกษาเป็นครั้งแรก¹⁵ โดยสถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล เริ่มจากน้ำพริกแองต่างๆ ที่ใช้ในตำรับอาหารประเภทแกงกะทิ ได้แก่ น้ำพริกแองเผ็ด แองเขียวหวาน แองพะแนง แองมัสมั่น รวมทั้งนำมาเตรียมเป็นข้าวราดแกงจากน้ำพริกแองแต่ละชนิด ก่อนนำทั้งหมดมาสกัดด้วยน้ำ

สำหรับข้าวราดแกงจะมีการเตรียมเพิ่มเติมในรูปแบบสารละลายที่ผ่านการย่อยในสภาวะจำลอง (Simulated gastro-intestinal digestion) ทั้งสารสกัดด้วยน้ำและสารละลายหลังการย่อย จะนำไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation activity) ในการกำจัดอนุมูลอิสระ α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) และทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis (Apoptosis induction) ในเซลล์ มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้เทคนิค Dual Parameter Flow Cytometry (FACS) ในการจำแนกประเภทของเซลล์ที่มีชีวิตจากเซลล์ที่ตายด้วย apoptosis

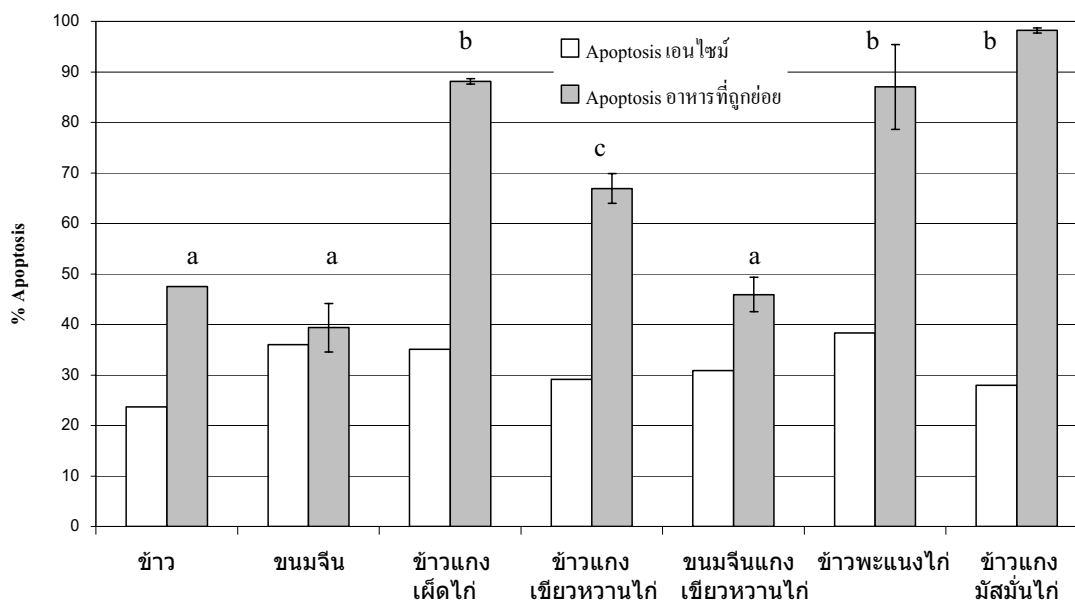
โดยสรุปพบว่า น้ำพริกแกงเขียวหวานมีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้สูงสุด และเป็นน้ำพริกชนิดเดียวที่มีการใช้พริกสด แทนการใช้พริกแห้ง ความสดของวัตถุดิบและชนิดของพริกน่าจะมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่น้ำพริกแกงมัสมั่นแม้ผ่านการใช้ความร้อนในการปรุง ซึ่งอาจทำลายสารต้านอนุมูลอิสระไปบางส่วน แต่จากส่วนประกอบของเครื่องเทศหลายชนิดที่ไม่มีในน้ำพริกแกงอื่น จึงอาจมีส่วนชดเชยหรือเพิ่มการต้านอนุมูลอิสระให้มากขึ้นได้ การนำน้ำพริกแกงมาเตรียมเป็นข้าวราดแกง ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันไป เช่น ข้าวราดแกงพะเนียงไก่ และข้าวราดแกงมัสมั่นไก่ มีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงสุดใกล้เคียงกัน จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ไม่ได้ลดลงตามสัดส่วนของน้ำพริกแกงที่ลดลง เนื่องจากมีการเพิ่มส่วนประกอบอื่นๆ เช่นใบโหระพา มะเขือพวง และพริกชี้ฟ้า ในแกงเผ็ด และแกงเขียวหวาน ใบมะกรูดในแกงพะเนียง หรือถั่ว มันฝรั่ง และหัวหอม

ในแกงมัสมั่น ซึ่งมีส่วนในการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นการเพิ่มคุณค่าทำให้สามารถชดเชยการสูญเสียสารต้านอนุมูลอิสระบางส่วนจากสัดส่วนน้ำพริกแกงที่ลดลง และจากกระบวนการปรุงอาหารโดยใช้ความร้อน ส่วนการทดสอบอาหารหลังการย่อยพบว่า ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระลดลงมาก แสดงว่า การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของอาหารโดยตรงนั้น ไม่ได้บอกการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในภาวะร่างกายเสมอไป เพราะเมื่ออาหารเข้าสู่ร่างกายแล้วอาจมีกระบวนการในร่างกายที่มีผลต่อการคงอยู่ หรือเปลี่ยนไปของประสิทธิภาพ หรือคุณสมบัติต่างๆ ของสารแต่ละชนิด

การศึกษาคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเลือกใช้สารละลายที่ผ่านการย่อยสำหรับทดสอบ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat cells clone E6-1 สารละลายหลังการย่อยของอาหารที่ทำให้เกิด apoptosis สูงสุด ได้แก่ ข้าวแกงมัสมั่นไก่ ข้าวแกงเผ็ดไก่ ข้าวพะเนียงไก่ และข้าวแกงเขียวหวานไก่ ตามลำดับ (รูปที่ 1) แสดงว่าโดยรวมแล้วอาหารที่ผ่านการย่อยมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้

น้ำพริกแกงสำหรับแกงที่ไม่ใช้กะทิ เป็นอีกรูปแบบที่นิยมบริโภคเช่นกัน จึงศึกษาเพิ่มเติมโดยคัดเลือกน้ำพริกแกงที่ได้รับความนิยม ได้แก่ น้ำพริกแกงป่า แกงเลียง แกงส้ม แกงเหลือง รวมถึงการเตรียมเป็นน้ำแกงปรุงสำเร็จ (เติมน้ำต้มยำ 1 ชนิด) นำน้ำพริกแกงแต่ละชนิดมาสกัดด้วยเอทานอล ส่วนน้ำแกงปรุงสำเร็จ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเฉพาะส่วนใสของน้ำแกง (เทียบได้กับการสกัดด้วยน้ำ) สำหรับนำไปทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เช่นกัน แต่

รูปที่ 1 การตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่ถูกย่อยเปรียบเทียบกับผลของสารละลายเอนไซม์ (ต้มแล้ว) ที่ใช้ย่อยอาหารชนิดนั้นๆ a,b,c ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$; ANOVA (Post hoc test: Scheffe)



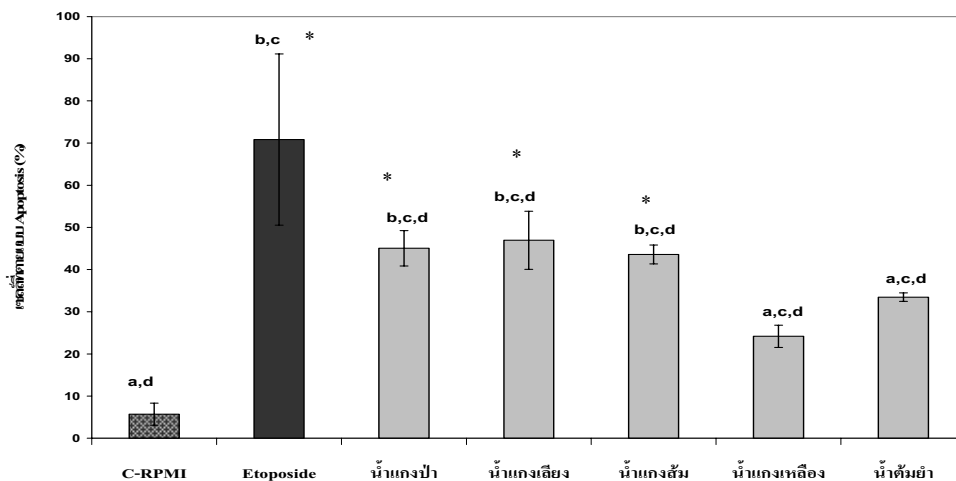
เพิ่มการจำแนกประเภทของเซลล์ที่มีชีวิตจากเซลล์ที่ตายด้วย apoptosis หรือ necrosis¹⁶

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดของน้ำพริกแกงทั้ง 4 ชนิดสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีเทียบเท่ากับ BHA โดยน้ำพริกแกงป่า แกงเลียง และแกงส้ม มีศักยภาพใกล้เคียงกัน รองมาคือน้ำพริกแกงเหลือง การทดสอบน้ำแกงปรุงสำเร็จ 5 ชนิด ได้ผลเช่นเดียวกับที่พบในสารสกัดด้วยเอธานอลของน้ำพริกแกง น้ำแกงส่วนใหญ่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ BHA โดยน้ำต้มยำมีประสิทธิภาพสูงสุด รองมาคือน้ำแกงส้ม น้ำแกงเลียง น้ำแกงเหลือง และน้ำแกงป่า ตามลำดับ สมุนไพรแต่ละชนิดที่นำมาประกอบเป็นน้ำพริกแกงนั้น นอกจากมีวิตามินที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอีแล้วยังมีสารพิษเคมีอื่นๆ ที่ทำให้น้ำพริกแกงแสดงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น พริกมี capsaicinoid, carotenoids,

flavonoids^{17,18} พืชตระกูล allium ได้แก่ หหัวหอม และกระเทียม มี allicin, diallyl disulphide diallyl trisulphide¹⁹ และ flavonoids เช่น quercetin เป็นต้น²⁰

การทดสอบน้ำแกงปรุงสำเร็จ 5 ชนิด ซึ่งเป็นรูปแบบที่บริโภคจริงในชีวิตประจำวัน โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat cells ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมน้ำแกง และเปรียบเทียบอัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis กับกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (C-RPMI) และกลุ่มที่ให้ยา etoposide ซึ่งมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำ apoptosis ในเซลล์พบว่า น้ำแกงป่า น้ำแกงเลียง และน้ำแกงส้ม มีศักยภาพในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ใกล้เคียงกันคือประมาณ 45% และไม่แตกต่างกับการให้ยา etoposide (รูปที่ 2) นอกจากนั้นเมื่อนำน้ำแกงไปบริโภค อาจมีการเติมส่วนผสมของพืชผัก และเนื้อสัตว์เพิ่มตามตำรับอาหารไทยแต่ละชนิด ย่อมเสริมให้ตำรับนั้นๆ สมบูรณ์ยิ่งขึ้นทั้งในด้าน

รูปที่ 2 การตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบ Apoptosis ที่เลี้ยงด้วยน้ำแกง 5 ชนิด เทียบกับประสิทธิภาพของยา Etoposide เข้มข้น 10 ug/ml, C-RPMI คือกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ^β แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (C-RPMI) อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$, พญฺุณชนะที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชนิดของสารสกัดที่ $p < 0.05$ (ANOVA, Post hoc test : Scheffe)

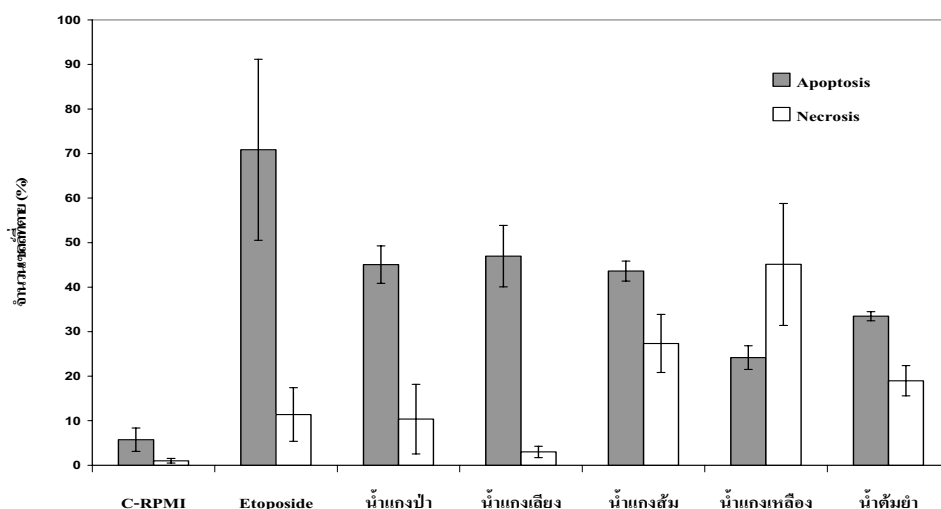


ของสารอาหาร และสารพิษเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ การรักษา หรือกำจัดมะเร็ง คือการทำให้เซลล์มะเร็งตาย โดยทั่วไปการตายของเซลล์แบ่งได้เป็นสองแบบ คือการตายแบบธรรมชาติ (apoptosis) ซึ่งไม่เกิดผลเสีย หรือกระทบต่อเซลล์อื่นในร่างกาย การตายอีกแบบคือ necrosis มีผลข้างเคียงทำให้เกิดการอักเสบ (inflammation) ของเซลล์ปกติ จึงมีความพยายามค้นหาสารที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis มากกว่า necrosis เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนการตายของเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 3) พบว่าน้ำแกงทุกชนิดเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis มากกว่า necrosis ยกเว้นน้ำแกงเหลือง สำหรับน้ำแกงเลียงเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ได้สูงกว่า necrosis ถึง 15 เท่า ซึ่งดีกว่ายา etoposide ประมาณ 2 เท่า สมุนไพรสำคัญในอาหารที่น่าจะส่งผลดังกล่าวคือ กระเทียมที่มี allicin²¹ และ ajoene²² สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยกระตุ้นการ

ทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis เช่นเดียวกับสาร 1-acetoxychavicol acetate ในข่า²³ และ capsaicinoids²⁴ ในพริกที่พบว่าสามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งได้ นอกจากสมุนไพรหลักสามชนิดนี้แล้วสมุนไพรอื่นๆ ที่มีอาจส่งผลร่วมกันต่อการเกิด apoptosis ได้

เนื่องจากมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในโลก จึงมีความพยายามอย่างมากในการวิจัยเพื่อหาสารสำคัญจากธรรมชาติ เพื่อใช้รักษามะเร็งผ่านทางกระบวนการ apoptosis ซึ่งเป็นวิธีที่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้สนใจศึกษาพืชสมุนไพรมากมายหลายชนิดที่มีคุณสมบัติดังกล่าว การศึกษาเบื้องต้นในตัวอย่างตำรับอาหารไทย เช่น น้ำพริกแกง และผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากน้ำพริกแกงต่างๆ โดยเฉพาะแกงเลียง ที่ล้วนประกอบด้วยเครื่องเทศ สมุนไพรหลายชนิด ที่มีรายงานวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำ apoptosis เมื่อนำมารวมหรือผสมกันเป็นตำรับอาหารไทยที่ผ่านขั้นตอนการปรุงก่อนบริโภคในชีวิตประจำวันแล้ว ยังมีฤทธิ์ในการ

รูปที่ 3 สัดส่วนการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ Apoptosis และ Necrosis ของน้ำแกง 5 ชนิด เทียบกับประสิทธิภาพของยา Etoposide เข้มข้น 10 ug/ml, กลุ่มควบคุมคือเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (C-RPMI)



เหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ จึงถือว่ามีความสำคัญในการต้านมะเร็ง นอกจากตำรับอาหารไทยดังกล่าวแล้ว มั่นใจว่ายังมีอาหารไทยอีกมากมายที่น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการป้องกันโรคต่างๆ ได้เช่นกัน หากรู้จักการบริโภคอาหารไทยประเภทต่างๆ อย่างเหมาะสม และสม่ำเสมอย่อมเป็นผลดีต่อสุขภาพ ดังนั้นการศึกษาวิจัยทางด้านอาหารและโภชนาการ ควรเน้นการศึกษาในรูปของอาหารโดยรวม (whole food) จะเป็นประโยชน์มากกว่าการศึกษาสารประกอบเดี่ยว หรือสารสกัดที่จำเป็นสำหรับการวิจัยเพื่อนำมาใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมมากกว่า

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Diet nutrition, nutrition and the prevention of chronic disease. Geneva: The Organization; 2003. WHO technical report series no. 916.
2. Fontham ETH. Protective dietary factors and lung cancer. *Int J Epidemiol* 1990;19: 32-42.
3. Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Pre-

vention Study Group, The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330: 1029-35.

4. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of Beta-Carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1150-5.
5. สมศรี เจริญเกียรติกุล, วชิร ดิษยบุตร, อติตดา บุญประเดิม, และคณะ. การพัฒนาสารอาหารไทยเพื่อสุขภาพ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2548.
6. สมศรี เจริญเกียรติกุล, วชิร ดิษยบุตร, เย็นใจ ลีธะฐาน, และคณะ. การศึกษาปริมาณพลาโนนอยด์ในอาหารไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2550.
7. Plaingam W. Antimutagenicity of ethanol and hexane extracts from some food that the Thais consumption on nitrite treated 1- aminopyrene using Ames assay. [MS Thesis in nutrition] Nakhon Pathom: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 2006.
8. สมศรี เจริญเกียรติกุล, จุรีพร จิตจำนุญโชคชัย, วชิร ดิษยบุตร, และคณะ. การศึกษาคุณสมบัติเชิงสุขภาพ

- ของอาหารไทย ต่อระบบการทำงานบางอย่างของร่างกายในหลอดทดลอง (*in vitro*). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2549.
9. Yannai S, Day AJ, Williamson G, *et al.* Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers of quinone reductase in murine hepatoma cell lines. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 623-30.
 10. Astorg P, Gradelet S, Leclerc J, *et al.* Effects of provitamin A or non-provitamin A carotenoids on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in mice. *Nutr Cancer* 1997; 27: 245-9.
 11. Raju J, Swamy MV, Cooma I, *et al.* Low doses of beta-carotene and lutein inhibit AOM-induced rat colonic ACF formation but high doses augment ACF incidence. *Int J Cancer* 2005; 113: 798-802.
 12. Volate S, Davenport D, Muga S, *et al.* Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements. *Carcinogenesis* 2005; 26:1450-6.
 13. Begleiter A, Sivananthan K, Curphey T J, *et al.* Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12; 566-72.
 14. สมศรี เจริญเกียรติกุล, สุลัดดา พงษ์อุทธา, จุรีพร จิตจำรูญโชคชัย, และคณะ. ผลของแกงเลียงต่อการสร้างเอนไซม์ NAD(P)H Quinone reductase ในตับและการยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2550
 15. สมศรี เจริญเกียรติกุล, วชิร ดิษยบุตร, นภา ศิวรังสรรค์, และคณะ. การศึกษาคุณค่าด้านสุขภาพของน้ำพริกแกงและอาหารไทยโดยใช้การทดลองแบบ *in vitro*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว), 2549.
 16. สมศรี เจริญเกียรติกุล, วชิร ดิษยบุตร, ธาดา สืบหลินวงศ์. การศึกษาคุณค่าด้านสุขภาพของน้ำพริกแกงชนิดไม่มีกะทิ และผลิตภัณฑ์โดยใช้การทดลองแบบ *in vitro*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว), 2550.
 17. Rosa A, Deiana M, Casu V, *et al.* Antioxidant activity of capsinoids. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7396-401.
 18. Materska M, Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1750-6.
 19. Kim SM, Kubota K, Kobayashi A. Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* (Japan) 1997; 61: 1482-5.
 20. Nuutila AM, Puupponen-Pimia R, Aarni M, *et al.* Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem* 2003; 81:485-93.
 21. Oommen S, Anto RJ, Srinivas G, *et al.* Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2004; 485: 97-103.
 22. Hassan HT. Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukemia agent for AML therapy, *Leuk Res* 2004; 28: 667-71.
 23. Ito K, Nakazato T, Murakami A, *et al.* Induction of Apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate through a mitochondrial- and FAS-mediated Dual Mechanism. *Clin Cancer Res* 2004;10: 2120-30.
 24. Sánchez AM, Sánchez MG, Malagarie-Cazenave S, *et al.* Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and Inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis* 2006; 11: 89-99.

พืช ผัก สมุนไพรไทยต้านมะเร็ง กับวัฒนธรรมการบริโภคที่ต้องเปลี่ยนแปลง

ดร. พรทิพา พิชา

กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของมนุษย์ ด้วยเหตุที่อาหารเป็นสาเหตุ 1 ใน 3 ของการเกิดโรคมะเร็ง มนุษย์จึงพยายามสืบค้น ศึกษา และวิจัยสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งพร้อม ๆ กับการค้นคว้าหาอาหารต้านมะเร็ง

เมื่อมนุษย์พบว่าพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรจำนวนมากมีสารสำคัญป้องกันมะเร็งได้ จึงตื่นตัวในความรู้ใหม่ (Novel Knowledge) แต่ในทางปฏิบัติยังไม่สามารถลดอุบัติการณ์ของโรคมะเร็ง (Cancer Incidence) ได้ การป้องกันมะเร็ง (Cancer Prevention) ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากมนุษย์ขาดการจัดการกับความรู้ที่ได้ (Knowledge Management) ยังไม่มีพลัง และยังไม่มีศักยภาพของการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม (The Power of Change) การเปลี่ยนแปลงที่กล่าวถึงนี้ นับสำคัญก็คือ การเปลี่ยนแปลงนิสัยการบริโภคพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรนั่นเอง

การสืบค้นข้อมูลรอบตัวเราว่ามีพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรไทยชนิดใดบ้าง ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้นไม่ยาก แต่การเข้าถึงพฤติกรรมการบริโภค และการนำมาใช้ให้เกิดผลตามข้อมูลจากการวิจัยนั้นยากยิ่งกว่า เมื่อนักวิชาการและนักวิจัยจำนวนมากได้มีโอกาสมาประชุม แลกเปลี่ยนเรียนรู้กัน จึงน่าจะมีการระดมสมอง วางแผนและนโยบาย สร้างกลยุทธ์ในการจัดการกับสารก่อมะเร็งให้น้อยลง และสร้างกิจกรรมที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวัฒนธรรมการบริโภคให้เกิดความสำเร็จในการป้องกันมะเร็ง กล่าวคือ สร้างปัจจัยสู่ความสำเร็จ (Key Success Factor) ให้เกิดตัวชี้วัดแห่งผลสำเร็จ (Key Performance Indicator) ซึ่งเป็นเป้าหมายสูงสุดของการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็ง นั่นคือ มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งน้อยลง มีอัตราการตายของคนไทยจากโรคมะเร็งลดลง และมีผู้รอดชีวิตจากโรคมะเร็งที่มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น ซึ่งเราจะปฏิเสธไม่ได้ว่า พืชสมุนไพร ผัก และผลไม้ไทย มีบทบาทอย่างสำคัญยิ่ง หากเราสามารถเปลี่ยนแปลงวัฒนธรรมการบริโภคได้

Nanotoxicology: A Safety Evaluation of Nanomaterials

Rawiwan Maniratanachote

National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand

Overview

Nanomaterials are incorporated into various categories of consumer products, including cosmetics, textiles, electronics, food and medicines. The increase in demand of nanomaterials in these manufacturers is leading to the increase in their bulk production. Thus, safety of these materials to human health and the environment becomes concerning issues. Because of their very small size and higher surface area per mass, nanomaterials often behave differently from their bulk counterparts. Most of them have greater chemical and biological activities as well as toxicological effects. The term of nanotoxicology, therefore, has been emerged. Additionally, nanomaterials can be internalized into the cells of living organisms in which they might interact with the intracellular components. This work collected some studies on toxicological effects of three high frequent used nanomaterials including silver, titanium dioxide and carbon nanotubes.

Silver

Silver nanoparticles are potent and broad-spectrum antibacterial agents with activity against diverse species within both Gram-positive and Gram-negative bacteria.¹ They have been applied in diverse consumer products, such as clothes, socks and laboratory gowns, as well as in medical products, such as surgical gowns and dressing bandages, which are claimed to have the ability to inhibit bacterial growth.

In humans, it is well known that long-term ingestion of silver compounds can cause irreversible skin discoloration or Argyria.² In the case of silver nanoparticles, an investigation reported that they can be penetrated through a human skin model.³ They are toxic to many mammalian cultured cells such as peripheral blood mononuclear cells, BRL3A rat liver cells and germ line stem cells.⁴⁻⁶ In addition, among several metal nanoparticles (silver, molybdenum and alumi-

num), silver was found to be the most toxic to the cells.⁶ In rats, inhalation of silver nanoparticles caused adverse effects to the liver, kidney and lungs as well as the silver being observed to accumulate in several tissues.^{7,8}

Furthermore, silver nanoparticles also exerted toxic effects on aquatic organisms by reducing the algal photosynthetic yield and inducing abnormalities in Zebrafish embryos.^{9,10} Recently, it was reported that silver nanoparticles are released into the aquatic environment during the washing process of silver-treated fabrics.¹¹ Therefore, the ultimate release of silver nanoparticles from commercial products during their life cycle into the environment might present a potential risk to the ecological system.

Titanium dioxide

Titanium dioxide (TiO₂) is a naturally occurring mineral and commonly found in three crystalline forms: rutile, anatase and brookite. Anatase

crystalline form is the most effective photocatalytic activity. This photocatalytic activity of TiO_2 can decompose both gram positive and gram negative bacteria.¹² Nano-sized TiO_2 particles have a higher degree of antibacterial effects and are of considerable industrial interest. Thus, safety of this material and health implications become the point of concern.

Sterns et al. reported that TiO_2 nanoparticles can be internalized into the A549 cells.¹³ In *in vitro* studies, there are large variations in biological effects of TiO_2 nanoparticles among cell types and experimental designs. For instance, they caused an increase in the cytokine interleukin-8 production without significant difference in human dermal microvascular endothelial cell viability.¹⁴ However, in another study, TiO_2 nanoparticles potentially induced DNA fragmentation and apoptotic cell death in Syrian hamster embryo fibroblasts.¹⁵ In addition, there are several *in vitro* studies on toxic effects of TiO_2 nanoparticles with non-cytotoxic UV-irradiation. The cell viability was decreased significantly after being exposed to UV-activated TiO_2 nanoparticles.^{16,17} The cytotoxicity was likely from reactive species generated from the photocatalysis of TiO_2 .

An inhalation study in rats, mice and hamsters revealed that subchronic exposure to aerosol of 10 mg/m^3 TiO_2 nanoparticles caused lung burdens which increased in a dose-dependent manner.¹⁸ The development of pulmonary inflammation, however, was found in rats and mice but not hamsters.¹⁸ Moreover, pulmonary toxicity of TiO_2 was also dependent on their crystalline phase, surface chemistry, particle overloading.¹⁹⁻²¹

Carbon nanotubes

Carbon nanotubes (CNTs) mainly exist in two different forms including single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs).^{22,23} These nanomaterials have

unique electrical, mechanical and thermal properties which have been applied in various technologies such as electronic, computer, aerospace as well as medicines.

Effects of CNTs have been studied in various organs including lung, skin as well as immune cells.²⁴⁻²⁶ Among these organs, lung is considered to be less protected. In addition, unprocessed CNTs are very light and easy to become airborne. Bundle of CNTs could be internalized into human lung epithelial cells and appeared inside mitochondria.²⁷ Once the particles are presented in the lung, they will be trapped and interact with the biological environments.

In rodent models, intratracheal instillation of CNTs to the animals caused a dose-dependent formation of pulmonary granuloma and inflammation.²⁸⁻³⁰ The onset of lung abnormalities in SWCNTs treated mice can be detected in 7 days after just single exposure and persisted as long as 90 days. Carbon black and quartz, negative and positive controls, were less toxic to the animal than SWCNTs.²⁸

Normally, human skin consists of several layers and so provides a good protective barrier. Monteiro-Riviere et al. reported some *in vitro* toxic effects and irritation response of MWCNTs in human epidermal keratinocytes at relatively high concentrations.²⁵

Summary

Although, from previous studies, nanomaterials have possibility to generate toxic effects to living organisms, there is no clear evidence that they can be a serious problem. In some experimental designs, nanomaterials were used at too much higher concentration than that from real exposure. Nevertheless, proactive approaches of safety inspection and evaluation are still necessary. In addition, understanding of nanotoxicology

can also help to facilitate safe use of nanomaterials.

References

- Kim JS, Kuk E, Yu KN, *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 2007; 3: 95-101.
- Greene RM, Su WP. Argyria. *Am Fam Physician* 1987; 36: 151-4.
- Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, *et al.* Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 2009; 255: 33-7.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, *et al.* In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro* 2005; 19: 975-83.
- Shin SH, Ye MK, Kim HS, *et al.* The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Inter Immunopharmacol* 2007; 7: 1813-8.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, *et al.* In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Tox Sci* 2005; 88: 412-9.
- Kim YS, Kim JS, Cho HS, *et al.* Twenty-eight day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2008; 20: 575-83.
- Sung JH, Ji JH, Park JD, *et al.* Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 2009; 108: 452-61.
- Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, *et al.* In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryo. *ASC Nano* 2007; 1: 133-43.
- Navarro E, Piccapictra F, Wagner B, *et al.* Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 8959-64.
- Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 4133-9.
- Jang H, Kim S. Effect of particle size and phase contribution of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. *J Nanopart Res* 2001; 3: 141-7.
- Stearns EC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 108-15.
- Peters K, Unger R, Kirkpatrick J, *et al.* Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci: Mater Med* 2004; 15: 321-5.
- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, *et al.* Evidence that ultra fine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 797-800.
- Uchino T, Tokunaga H, Ando M, *et al.* Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicol in Vitro* 2002; 16: 629-35.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, *et al.* Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxic and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2006; 92: 174-85.
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, *et al.* Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 2004; 77: 347-57.
- Rehn B, Seiler F, Rehn S, *et al.* Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189: 84-95.
- Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, *et al.* Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particles formulations: Impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol Sci* 2005; 88: 514-24.
- Warheit DB, Koke RA, Finlay C, *et al.* Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 2007; 171: 99-110.

22. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991; 354: 56-8.
23. Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 1993; 363: 603-5.
24. Pulskamp K, Diabate S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett* 2007; 168: 58-74.
25. Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, *et al.* Multi-walled carbon nanotubes interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett* 2005; 155: 377-84.
26. Bottini M, Bruckner S, Nika K, *et al.* Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* 2006; 160: 121-6.
27. Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assay. *Nano Lett* 2006; 6: 1261-8.
28. Lam CW, James JT, McCluskey R, *et al.* Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* 2004; 77: 126-34.
29. Muller J, Decordier I, Hoet PH, *et al.* Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 427-33.
30. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, *et al.* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L698-708.

Challenge: Development of Regulation and Control of Nanomaterial Safety in Consumer Products

อรรถ ศ กงพานิช

ศูนย์พัฒนานโยบายแห่งชาติด้านสารเคมี สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

นาโนเทคโนโลยี มีการเติบโตในอัตราที่สูง และใช้เงินจำนวนมหาศาลในการพัฒนาและมีศักยภาพในการตอบสนองความต้องการของสังคมโลกปัจจุบัน อาทิเช่น ในเรื่องพลังงานน้ำ อาหาร และผลิตภัณฑ์หลากหลายที่ใช้ในชีวิตประจำวัน โดยมีการคาดการณ์ว่าภายในปี ค.ศ. 2015 มูลค่าทางการตลาดของสินค้านาโนเทคโนโลยี ทั่วโลกจะมียอดขายต่อปีสูงถึง 3 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ จากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน พบว่า ความเสี่ยงเกิดจากวัสดุนาโนที่ปลดปล่อยโดยไม่ตั้งใจ โดยทั่วไปกำหนดว่าวัสดุนาโนมีขนาดประมาณ 1-100 นาโนเมตร จากการที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ทำให้มีพื้นที่ผิวสูง และอาจทำให้มีคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์เปลี่ยนไปจากสารเดิม ดังนั้นจึงอาจก่ออันตรายต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบทางเดินหายใจ รวมทั้งมีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม การวิจัยในปัจจุบัน ยังคงเน้นอยู่ที่การพัฒนาเทคโนโลยีและผลิตภัณฑ์นาโน มีการวิจัยเป็นส่วนน้อยที่ประเมินผลกระทบเชิงลบของวัสดุและผลิตภัณฑ์นาโน รวมทั้งมลพิษ/กากของเสียที่เกี่ยวข้อง

สืบเนื่องจากความกังวลเรื่องผลกระทบของวัสดุและผลิตภัณฑ์นาโนต่อสุขภาพของผู้ทำงาน ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ประเทศที่พัฒนาแล้วในกลุ่ม OECD และองค์ระหว่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ISO เริ่มต้นตัวและให้ความสำคัญกับประเด็นความปลอดภัยของการใช้นาโน (Nano Safety) นำไปสู่การพัฒนาแนวปฏิบัติที่ดีในการทำงานกับวัสดุนาโนอย่างปลอดภัย การกำหนดมาตรฐานของวัสดุนาโนประเภทต่างๆ ตลอดจนการพัฒนากรอบควบคุม อาทิ เช่น กลุ่มประเทศ EU มีควบคุมผ่านกฎหมาย REACH เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เวทีความร่วมมือระหว่างประเทศว่าด้วยการบริหารจัดการความปลอดภัยด้านสารเคมี เช่น IFCS และ SAICM ยังคงชี้ให้เห็นถึงประเด็นท้าทายที่สำคัญ คือการสร้างความรู้ความตระหนักที่ถูกต้องเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์และความเสี่ยงของวัสดุและผลิตภัณฑ์นาโน เพื่อให้ทุกภาคส่วนเกิดกระบวนการตัดสินใจอย่างรู้และเข้าใจ รวมทั้งการพัฒนาระบบการกำกับดูแลความปลอดภัยด้านนาโนทั้งในระดับประเทศ และในระดับโลก

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ศูนย์พัฒนานโยบายแห่งชาติด้านสารเคมี ในฐานะฝ่ายเลขานุการของคณะกรรมการแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนายุทธศาสตร์การจัดการสารเคมี เล็งเห็นความสำคัญของประเด็นท้าทายดังกล่าว จึงเร่งเตรียมความพร้อมและสร้างกระบวนการมีส่วนร่วมของหน่วยงานในภาครัฐ ภาคธุรกิจ ภาควิชาการ และภาคประชาชน เพื่อพัฒนาเรื่อง Nano Safety ในส่วนของผลิตภัณฑ์สำหรับผู้บริโภค ตั้งแต่การสร้างความรู้ความเข้าใจ การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของวัสดุและผลิตภัณฑ์นาโน การจัดทำแนวทางป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากอนุภาคนาโนตามหลักการป้องกันไว้ก่อน (Precautionary principle) การพัฒนา Code of Conduct ที่เกี่ยวข้อง การประเมินความเสี่ยง การพัฒนาระบบการแสดงผลการตรวจ การควบคุมการโฆษณา ตลอดจนถึงการพัฒนาระบบการกำกับดูแล เพื่าระวังความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นาโนต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมต่อไป

Controversies in Pesticide Poisonings: Treatment of Paraquat Poisoning

ผศ.นพ. สัมมน โฉมฉาย

ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาวะพิษจากยาปราบวัชพืชพาราควอต เป็นภาวะพิษที่พบได้บ่อยในประเทศเกษตรกรรม และเป็นภาวะพิษที่มีอัตราการตายสูง ดังมีสถิติจากการศึกษาต่างๆ อาจพบอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 80^{1,2} และมีการรายงานว่าภาวะพิษพาราควอตเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตมากเป็นอันดับที่ 2 ในประเทศไทย การสัมผัสพาราควอตที่ทำให้เกิดภาวะพิษอาจเกิดได้จากการกิน และทางผิวหนังซึ่งได้มีการรายงานการเกิดภาวะพิษรุนแรงและการเสียชีวิต³⁻⁵

การดูดซึมพาราควอตจากทางเดินอาหารเกิดเป็นส่วนใหญ่ที่ลำไส้เล็ก Jejunum โดยการดูดซึมเกิดขึ้นได้เร็ว แต่ไม่สมบูรณ์ (bioavailability ในสัตว์ทดลองประมาณ 5 - 30%) เมื่อพาราควอตถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตแล้ว จะมีการกระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไต ปอด และตับอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้พาราควอทยังถูกกำจัดทางไตอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเกิดภาวะพิษต่อไตซึ่งนำไปสู่ไตวายเฉียบพลัน และทำให้อัตราการกำจัดพาราควอตจากร่างกายทางปัสสาวะลดลงอย่างรวดเร็ว ในบริเวณที่มีการสัมผัสพาราควอต เช่น ผิวน้ำ และเยื่อบุทางเดินอาหาร พาราควอตทำให้เกิดภาวะกักตุนต่อเนื้อเยื่อด้วย

ปอดเป็นอวัยวะที่เป็นเป้าหมายในการเกิดภาวะพิษของพาราควอต ทั้งนี้เนื่องจาก alveolar cell มีกระบวนการ active uptake ของพาราควอต และปอดยังมีระดับออกซิเจนที่สูง ซึ่งเอื้อต่อการเกิด

พิษ ได้แก่ การลดระดับ NADPH ในเซลล์ การสร้าง free oxygen radical และการเกิด lipid peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ในปอด และกระบวนการอักเสบในระยะแรก ซึ่งเรียกว่า destructive phase ต่อมาเกิดการเกิด fibrosis ในระยะ proliferative phase ซึ่งทำให้ปอดเสียความสามารถในการแลกเปลี่ยนออกซิเจน

ในทางคลินิกภาวะพิษจากพาราควอตสามารถแบ่งระดับความรุนแรงได้เป็นสามกลุ่ม⁴ คือ

กลุ่มที่ 1 Mild poisoning ได้แก่ กลุ่มที่กินพาราควอตในขนาดไม่เกิน 20 mg/kg ซึ่งภาวะนี้ทำให้เกิดอาการในระบบทางเดินอาหาร เช่น อาเจียน และท้องเสีย ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีอัตราการรอดชีวิต 100%

กลุ่มที่ 2 Moderate to severe poisoning ได้แก่ กลุ่มที่กินพาราควอตในขนาด 20-40 mg/kg โดยอาการที่เกิด ได้แก่ อาการอาเจียน ท้องเสีย กลืนเจ็บ ไตวายเฉียบพลัน ตับอักเสบ และ ปอดอักเสบ และการเกิด lung fibrosis ซึ่งทำให้เกิดการเสียชีวิตจากภาวะ progressive hypoxia ในช่วงเวลา 4 - 5 สัปดาห์หลังการสัมผัสพาราควอต อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยในกลุ่มนี้บางส่วนอาจรอดชีวิตได้ จากการติดตามการติดตาม pulmonary function test และ high resolution CT scan พบว่าการเปลี่ยนแปลงในปอดอาจกลับสู่สภาพปกติอย่างค่อยเป็นค่อยไปในระยะเวลา 3 - 12 เดือนหลังเกิดภาวะพิษ

กลุ่มที่ 3 Acute fulminant poisoning เกิดจากการกินพาราควอตตั้งแต่ 40 mg/kg ขึ้นไป ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีอาการอาเจียน ท้องเสียรุนแรง อาจมีเลือดออก หรือการทะลุในทางเดินอาหาร มีภาวะไตวายเฉียบพลัน และตับอักเสบ ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอัตราการเสียชีวิต 100% โดยเกิดในช่วงวันที่ 1 ถึง 4 หลังการสัมผัสพาราควอต สาเหตุของการเสียชีวิตคือภาวะไตวายเฉียบพลัน การไหลเวียนโลหิตและการหายใจล้มเหลว โดยในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาใดที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการพยากรณ์โรคในกลุ่มนี้ได้

ดังนั้นประเด็นสำคัญในการดูแลรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพาราควอต ได้แก่ การจำแนกผู้ป่วยที่ได้รับพิษอย่างมีนัยสำคัญจนอาจเสียชีวิตได้ แต่หากได้รับการรักษาที่เหมาะสมอาจรอดชีวิตได้ ซึ่งน่าจะ ได้แก่ การพยายามคัดแยกผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 เพื่อให้การรักษา โดยจากการศึกษาต่างๆ พบว่าวิธีการพยากรณ์โรคที่มีความแม่นยำที่สุด ได้แก่ การตรวจระดับพาราควอตในพลาสมา และในปัสสาวะ

การตรวจระดับในพลาสมา มีความแม่นยำสูงในการทำนายการเสียชีวิต จากภาวะพิษจากพาราควอต ยกตัวอย่าง เช่น Proudfoot's Nomogram⁶ ซึ่งพิจารณาระดับพาราควอตในพลาสมาและระยะเวลาเก็บตัวอย่างเลือดหลังการกินพาราควอต โดยพบว่า ผู้ที่มีระดับพาราควอตอยู่เหนือเส้นที่ผ่านจุด 2.0, 0.6, 0.3, 0.16 และ 0.1 mg/ml ที่เวลา 4, 6, 10, 16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ มีโอกาสเสียชีวิตโดยเครื่องมือนี้มีความไว ความจำเพาะ และ positive predictive value ประมาณ 79, 89 และ 92% ตามลำดับ⁷ อย่างไรก็ตาม เครื่องมือนี้สามารถใช้พยากรณ์โรคได้เฉพาะในผู้ที่มีการตรวจระดับพารา-

ควอตในระยะเวลา 4 – 24 ชั่วโมงหลังการสัมผัสพาราควอต ในกรณีที่ต้องการพยากรณ์โรคจากระดับพาราควอตในช่วงเวลานานกว่า 24 ชั่วโมง อาจใช้เครื่องมือชนิดอื่น เช่น Severity Index for Paraquat Poisoning (SIPP)⁸ ซึ่งมีระดับความแม่นยำในการทำนายการเสียชีวิตใกล้เคียงกับ Proudfoot's Nomogram กล่าวคือ Sawada's SIPP มีค่าความไว ความจำเพาะ และ positive predictive value = 57, 96 และ 96% ตามลำดับ⁷ อย่างไรก็ตาม มีโรงพยาบาลน้อยแห่งมีขีดความสามารถที่จะตรวจ หรือส่งตรวจระดับพาราควอตในพลาสมาได้ จึงเป็นอุปสรรคในการใช้ระดับพาราควอต ในการช่วยตัดสินใจดูแลผู้ป่วยอย่างทันท่วงที

การตรวจพาราควอตในปัสสาวะโดยวิธี Sodium dithionite test ซึ่งเป็นการตรวจแบบ semi-quantitative หรือ qualitative ที่ให้ผลบวก เมื่อระดับความเข้มข้นของพาราควอตในปัสสาวะอย่างน้อย 1 µg/ml และมีความไวสูงในการคัดกรองผู้ป่วยที่เป็น mild poisoning (ความไวประมาณ 100%)⁹ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยการตรวจพาราควอตในพลาสมาด้วยวิธี Sodium dithionite แบบ qualitative test ที่ให้ผลบวกที่ความเข้มข้น 2.0 mg/ml ขึ้นไป พบว่าการตรวจนี้มีความแม่นยำดีในการพยากรณ์การเสียชีวิต (ความไว ความจำเพาะ และ positive predictive value = 66.9, 100 และ 100% ตามลำดับ)¹⁰ เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี Sodium dithionite เป็นวิธีตรวจที่ง่าย และสามารถทำได้ในโรงพยาบาลขนาดเล็ก หรือห้องฉุกเฉิน วิธีนี้จึงอาจมีความเหมาะสมมากกว่าในการช่วยตัดสินใจเรื่องการดูแลรักษาผู้ป่วย โดยได้มีการเสนอให้มีการใช้การตรวจแบบ qualitative ของทั้ง

ในปัสสาวะและในพลาสมาในการตัดสินใจ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางคลินิกอื่นๆ เป็นปัจจัยพยากรณ์โรคในผู้ป่วยภาวะพิษจากพาราควอตอีกหลายชนิด เช่น ระดับ serum creatinine, aminotransferase, amylase, pH, potassium, leucocyte count และ Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II score เป็นต้น

นอกเหนือจากการพยากรณ์โรคเพื่วางแผนการรักษา วิธีการดูแลรักษาผู้ป่วยภาวะพิษจากพาราควอตสามารถสรุป ได้ดังนี้

1. การลดการดูดซึมพาราควอตจากทางเดินอาหาร
2. การรักษาประคับประคองตามอาการ เช่น การดูแลอุณหภูมิ และอิเล็กโทรไลต์ การรักษาอาการเจ็บในทางเดินอาหาร และกลืนลำบาก
3. การเร่งการขับสารพาราควอตจากร่างกาย
4. การรักษาจำเพาะด้วยยาต้านพิษ

แนวทางการรักษาผู้ป่วยภาวะพิษพาราควอตที่มีการโต้แย้งมากที่สุดมีสองประเด็น ได้แก่

1. การเร่งการขับสารพิษจากร่างกาย (Enhanced elimination) หมายถึงการเพิ่ม clearance ของพาราควอตจากร่างกายจากการกำจัดปกติทางไต ซึ่งสามารถทำได้โดยวิธี charcoal hemoperfusion และ continuous arteriovenous hemofiltration มีการศึกษาว่า วิธีทั้งสองอาจช่วยเพิ่มการกำจัดพาราควอตจากร่างกาย และพบว่า charcoal hemoperfusion ช่วยลดอัตราการเสียชีวิตในสัตว์ทดลอง^{11,12} อย่างไรก็ตามไม่มีการศึกษาใด สามารถแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทางคลินิกในการรอดชีวิตที่ดีกว่าสำหรับผู้ที่ได้รับการรักษาเหล่านี้ ทั้งนี้จะอธิบาย

ได้ ในกรณีที่ผู้ป่วยสามารถกำจัดพาราควอตออกจากร่างกายได้ ในขณะที่ผู้ป่วยยังไม่เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน และการที่ระดับพาราควอตในปอดสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและทำให้เกิดภาวะพิษในที่สุด

2. การรักษาจำเพาะด้วยยาต้านพิษ การรักษาภาวะพิษพาราควอตที่มีการศึกษาวิจัย และมีองค์ความรู้มากพอจะทำให้เกิดข้อถกเถียง ได้แก่ การรักษาด้วย immunosuppressive therapy โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษาที่มี cyclophosphamide เป็นองค์ประกอบ กลไกการรักษาด้วยวิธีดังกล่าว ได้แก่ การยับยั้งกระบวนการอักเสบ ที่ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปอดและเกิด lung fibrosis หลักฐานทางการแพทย์ส่วนใหญ่ของการศึกษานี้ ประกอบด้วยการรายงาน case series และ non-randomized controlled study ซึ่งเป็นข้อโต้แย้งที่สำคัญว่าอาจมีอคติในการรายงานผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการศึกษาแบบ meta-analysis พบว่ามีการลดอัตราการเสียชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการรักษาด้วย immunosuppressive therapy จากการศึกษาแบบ non-randomized controlled study² นอกจากนี้ยังมีการศึกษาแบบ prospective randomized controlled trial ในผู้ป่วยภาวะพิษพาราควอตที่มีระดับพาราควอตที่น่าจะทำให้มีอัตราเสียชีวิตอยู่ในช่วง 50 - 90% จำนวน 23 ราย โดยมีผู้ป่วยกลุ่มควบคุม 7 รายได้รับการรักษาด้วย activated charcoal, hemoperfusion, pulse cyclophosphamide 2 วัน, pulse methylprednisolone 3 วัน และ dexamethasone จนกว่า PaO₂ จะได้อย่างน้อย 80 mmHg ในขณะที่กลุ่มการรักษา ได้รับการรักษาเหมือนกลุ่มควบคุม และเพิ่มการรักษาซ้ำด้วย pulse cyclophosphamide และ pulse methylprednisolone

หากว่าผู้ป่วยมี PaO_2 น้อยกว่า 60 mmHg ในระหว่างการรักษา ผลการรักษาดังกล่าวพบว่า กลุ่มที่รักษามีอัตราการเสียชีวิตน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹³ การศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าการเสียชีวิตจากพาราควอตน่าจะเกิดจากกระบวนการอักเสบซึ่งสามารถควบคุมได้ด้วย pulse cyclophosphamide และ pulse methylprednisolone

การศึกษาแบบ retrospective study ที่แสดงให้เห็นว่า odds ratios อาจลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในผู้ป่วยภาวะพิษจากพาราควอตที่ได้รับการรักษาด้วย immunosuppressive therapy และมีการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาว ซึ่งอาจเป็นดัชนีแสดงภาวะการกดระบบภูมิคุ้มกัน¹⁴ หลักฐานทั้งทางตรงและทางอ้อมเหล่านี้เป็นเครื่องสนับสนุนการรักษาภาวะพิษพาราควอตด้วย immunosuppressive therapy อย่างไรก็ตามการยืนยันด้วย randomized controlled trial น่าจะเป็นหลักฐานสนับสนุนที่ดีที่สุดสำหรับการรักษาดังกล่าวซึ่งการศึกษานี้กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

จากข้อโต้แย้งทั้งหลายเบื้องต้น อาจสรุปได้ว่าในปัจจุบัน ยังไม่มีหลักฐานทางการแพทย์ที่ชี้ชัดไปในทางหนึ่งทางใดว่า แนวทางการรักษาที่ดีที่สุดสำหรับผู้ป่วยภาวะพิษพาราควอตเป็นอย่างไร ดังนั้นการดูแลรักษาผู้ป่วย จึงเป็นการตัดสินใจร่วมกันของแพทย์ ผู้ป่วย และครอบครัวของผู้ป่วยบนพื้นฐานของข้อมูลเท่าที่มีอยู่

เอกสารอ้างอิง

1. Afzali S, Gholyaf M. The effectiveness of combined treatment with methylprednisolone and cyclophosphamide in oral paraquat poisoning. *Arch Iran Med* 2008 ;11: 387-91.
2. Agarwal R, Srinivas R, Aggarwal AN, *et al.* Immunosuppressive therapy in lung injury due to paraquat poisoning: a meta-analysis. *Singapore Med J* 2007; 48: 1000-5.
3. Douze JM, van Heyst AN, van Dijk A, *et al.* Paraquat poisoning in man. *Arch Toxicol* 1975; 34:129-36.
4. Vale JA, Meredith TJ, Buckley BM. Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum Toxicol* 1987; 6: 41-7.
5. Smith JG. Paraquat poisoning by skin absorption: a review. *Hum Toxicol* 1988; 7: 15-9.
6. Proudfoot AT, Stewart MS, Levitt T, *et al.* Paraquat poisoning: significance of plasma-paraquat concentrations. *Lancet* 1979; 2: 330-2.
7. Senarathna L, Eddleston M, Wilks MF, *et al.* Prediction of outcome after paraquat poisoning by measurement of the plasma paraquat concentration. *QJM* 2009;102: 251-9.
8. Sawada Y, Yamamoto I, Hirokane T, *et al.* Severity index of paraquat poisoning. *Lancet* 1988; 1: 1333.
9. Scherrmann JM, Houze P, Bismuth C, *et al.* Prognostic value of plasma and urine paraquat concentration. *Hum Toxicol* 1987; 6: 91-3.
10. Koo JR, Yoon JW, Han SJ, *et al.* Rapid analysis of plasma paraquat using sodium dithionite as a predictor of outcome in acute paraquat poisoning. *Am J Med Sci* 2009; 338: 373-7.
11. Suzuki K, Takasu N, Okabe T, *et al.* Effect of aggressive haemoperfusion on the clinical course of patients with paraquat poisoning. *Hum Exp Toxicol* 1993; 12: 323-7.

12. Yang TS, Chang YL, Yen CK. Haemoperfusion treatment in pigs experimentally intoxicated by paraquat. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 709-15.
13. Lin JL, Lin-Tan DT, Chen KH, *et al.* Repeated pulse of methylprednisolone and cyclophosphamide with continuous dexamethasone therapy for patients with severe paraquat poisoning. *Crit Care Med* 2006; 34: 368-73.
14. Chomchai S. Clinical parameters associated with outcomes of paraquat poisoning in patients treated with 14-day cyclophosphamide and dexamethasone regimen. *J Chinese Med Assoc* 2009; 72: S20-1.

Controversies in Insecticide Poisoning

Winai Wananukul

Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University

ABSTRACT

Organophosphorus (OP) insecticide poisoning is a major poisoning in Thailand and developing countries. It causes high morbidity and mortality rate among the insecticide poisoning. Although it is an old insecticide, mechanisms of poisoning and appropriate management still remain unclear. Some points of these controversies are raised for discussion.

It has been observed that the clinical manifestation and severity of OP poisoning vary from cases to cases. Is it explained simply by the dose of exposure? In fact, OP is a group of chemicals whose chemical structures are mainly derivatives of phosphoric acid or thiophosphoric acid and will be called “oxon” and “thion” OP. Thion OP is an inactive form, where as its metabolite (oxon) OP is the active form. Thion is also more fat distribution than oxon. This difference has contributed for the varieties of effects of OP poisoning.

Oxime therapy is the most controversial issue. Theoretically, oxime reactivates acetylcholinesterase (ACh) enzyme which is irreversibly inhibited by OP. Therefore, it would be beneficial for acute OP poisoning. Unfortunately, meta-analysis of the clinical studies in the past did not conclusively demonstrate their beneficial effects. Chemically, most of OPs are either dimethyl or diethyl. Recent studies have shown that dimethyl OPs caused aging of the enzyme more rapidly than diethyl OPs. Thus, oximes would have beneficial effect to diethyl OP poisoning than dimethyl OP poisoning. However, some studies show this discrepancy of the treatment. The most recent randomized control trial of pralidoxime therapy on OP poisoning showed the different outcomes between the 2 groups of OP, but it did not demonstrate the beneficial effects over placebo. Surprisingly, the outcome is worse than placebo. The reason for these findings has not been elucidated yet. Conclusion: different OP causes different clinical severity and outcome. Mechanism of OP poisoning may not only be inhibition of ACh. Oxime therapy needs more extensive studies.

พิษวิทยากับพระราชบัญญัติความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. ๒๕๕๑

สุวิทย์ วิจิตรโสภา

ผู้อำนวยการส่วนขายตรงและตลาดแบบตรง สำนักงานคุ้มครองผู้บริโภค

พระราชบัญญัติความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. ๒๕๕๑

(Product liability: PL Law)

เหตุผลในการตราพระราชบัญญัตินี้คือ โดยที่สินค้าในปัจจุบันไม่อาจจะผลิตภายในประเทศหรือนำเข้า มีกระบวนการผลิต ที่ใช้ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสูงขึ้นเป็นลำดับ การที่ผู้บริโภคจะตรวจพบว่าสินค้าไม่ปลอดภัยกระทำได้นยาก เมื่อผู้บริโภคนำสินค้าที่ไม่ปลอดภัยไปใช้อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อชีวิตร่างกาย สุขภาพอนามัย จิตใจ หรือทรัพย์สินของผู้บริโภคหรือบุคคลอื่นได้ แต่การฟ้องคดีในปัจจุบันเพื่อเรียกค่าเสียหายมีความยุ่งยาก เนื่องจากภาระในการพิสูจน์ถึงความจงใจ หรือประมาทเลินเล่อในการกระทำผิดของผู้ผลิต หรือผู้นำเข้า ตกเป็นหน้าที่ของผู้ได้รับความเสียหายตามหลักกฎหมายทั่วไป เพราะยังไม่มีกฎหมายให้ความคุ้มครองผู้บริโภคที่ได้รับความเสียหายที่เกิดจากสินค้าโดยมีการกำหนดหน้าที่ความรับผิดชอบในความเสียหายของผู้ผลิตหรือผู้เกี่ยวข้องไว้โดยตรง จึงสมควรให้มีกฎหมายว่าด้วยความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย โดยนำหลักความรับผิดโดยเคร่งครัดมาใช้ อันจะมีผลให้ผู้เสียหายไม่ต้องพิสูจน์ถึงความไม่ปลอดภัยของสินค้า ตลอดจนได้รับการชดเชยค่าเสียหายที่เป็นธรรม

สาระสำคัญของพระราชบัญญัตินี้ คือ

๑. กำหนดให้ผู้ประกอบการต้องรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัยและสินค้านั้นได้มีการขายแล้ว ไม่ว่าความเสียหายนั้นจะเกิดจากการกระทำโดยจงใจหรือประมาทเลินเล่อของผู้ประกอบการหรือไม่ก็ตาม

๒. ผู้เสียหาย หรือผู้มีสิทธิฟ้องคดีแทนเพียงแต่พิสูจน์ว่าผู้เสียหายได้รับความเสียหายจากสินค้าของผู้ประกอบการ และการใช้หรือการเก็บรักษาสินค้านั้นเป็นไปตามปกติธรรมดาเท่านั้น เพื่อให้ผู้ประกอบการต้องรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย โดยไม่ต้องพิสูจน์ว่าความเสียหายเกิดจากการกระทำของผู้ประกอบการแต่อย่างใด

๓. ศาลมีอำนาจกำหนดค่าสินไหมทดแทนเพื่อความเสียหายต่อจิตใจให้แก่ผู้บริโภค/ผู้เสียหาย

๔. ศาลมีอำนาจสั่งให้ผู้ประกอบการจ่ายค่าสินไหมทดแทนเพื่อการลงโทษเพิ่มขึ้นจากจำนวนค่าสินไหมทดแทนที่แท้จริงที่ศาลกำหนดให้ตามที่ศาลเห็นสมควร แต่ไม่เกินสองเท่าของค่าสินไหมทดแทนที่แท้จริงนั้น เมื่อข้อเท็จจริงปรากฏว่าผู้ประกอบการรู้อยู่แล้วว่าสินค้านั้นเป็นสินค้าที่ไม่ปลอดภัย หรือมิได้รู้เพราะความประมาทเลินเล่ออย่างร้ายแรง หรือรู้ภายหลังจากการผลิตแต่ไม่ดำเนินการใด ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหาย

๕. กำหนดอายุความในการใช้สิทธิเรียกร้องค่าเสียหายอันเกิดจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัยไว้แตกต่างจากประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ โดยให้ใช้สิทธิภายในสามปี นับแต่วันที่ผู้เสียหายรู้ถึงความเสียหายและรู้ตัวผู้ประกอบการที่ต้องรับผิดชอบ หรือภายในสิบปี นับแต่วันที่มีการขายสินค้านั้น ถ้าเป็นกรณีความเสียหายเกิดขึ้นโดยผลของสารที่สะสมอยู่ในร่างกายของผู้เสียหายหรือเป็นกรณีที่ต้องใช้เวลาในการแสดงอาการ อายุความสามปีนับเหมือนกัน แต่ถ้าอายุความสิบปี ให้นับแต่วันที่รู้ถึงความเสียหาย

๖. การฟ้องคดีให้ได้รับการยกเว้นค่าฤชาธรรมเนียมทั้งปวง และเปิดโอกาสให้คณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค สมาคมและมูลนิธิซึ่งคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภครับรองตามกฎหมายว่าด้วยการคุ้มครองผู้บริโภคเป็นผู้ฟ้องคดีเรียกค่าเสียหายแทนผู้บริโภคได้

คำแนะนำผู้บริโภคและผู้ประกอบการ ในการปฏิบัติตามกฎหมายว่าด้วยความรับผิดชอบต่อ ความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย และกฎหมายว่าด้วยวิธีพิจารณาคดีผู้บริโภค

คำแนะนำสำหรับผู้บริโภค

๑. เมื่อผู้บริโภคได้รับความเสียหายจากการบริโภคสินค้าสามารถใช้สิทธิเรียกร้องค่าเสียหายได้ ๒ ช่องทาง คือ

- ยื่นเรื่องร้องเรียนพร้อมแนบเอกสารหลักฐานที่เกี่ยวข้องได้ที่สำนักงานคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภคหรือร้องเรียนผ่านสายด่วน ๑๑๖๖ หรือ
- ยื่นฟ้องคดีเพื่อเรียกค่าเสียหายต่อศาลในเขตศาลที่จำเลยมีภูมิลำเนาหรือที่มูลคดีเกิด การ

ฟ้องคดีฟ้องง่ายฟ้องโดยวากาก็ได้ ฟ้องโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ไม่ต้องใช้ทนายความ การพิจารณาคดีเป็นไปด้วยความสะดวกรวดเร็วเป็นธรรม

๒. ในการซื้อสินค้าผู้บริโภคที่จะใช้สิทธิเรียกร้องต้องเก็บใบเสร็จรับเงิน รวมทั้งเอกสารหลักฐานที่เกี่ยวข้องกับสินค้า กล่องผลิตภัณฑ์ ฉลาก แผ่นพับ ใบปลิว เอกสารโฆษณา คำรับรอง ใบรับประกัน เพื่อใช้เป็นหลักฐานในการฟ้องคดี

๓. ก่อนซื้อสินค้าผู้บริโภคควรระมัดระวังโดยตรวจสอบการแสดงฉลาก ปริมาณ อย่าหลงเชื่อคำโฆษณาโดยไม่พิจารณาให้รอบคอบ รวมทั้งหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับความน่าเชื่อถือในแหล่งกำเนิดคุณภาพ ความปลอดภัยหากไม่แน่ใจควรปรึกษาผู้ที่มีความรู้หรือหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบ เพื่อเป็นการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นในภายหลัง

คำแนะนำสำหรับผู้ประกอบการ

๑. ผู้ประกอบการต้องผลิต นำเข้า หรือขายสินค้าให้มีคุณภาพ มาตรฐาน และปลอดภัย โดยคำนึงถึงหลักความสุจริตและความรับผิดชอบต่อผู้บริโภคเป็นสำคัญ

๒. ผู้ประกอบการต้องให้ข้อมูลเกี่ยวกับสินค้าให้ถูกต้อง ครบถ้วนทั้งในส่วนของแสดงฉลากและการโฆษณา โดยระบุข้อมูลในฉลากหรือโฆษณาให้ถูกต้อง ครบถ้วนและชัดเจนตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด

๓. ผู้ประกอบการต้องทบทวนการแสดงข้อความในฉลากหรือโฆษณาว่าเป็นไปตามหลักเกณฑ์ที่หน่วยงานของรัฐกำหนด รวมทั้งคำเตือนต่างๆ ว่าถูกต้อง ชัดเจนแล้วหรือไม่ หากยังไม่ถูกต้องและชัดเจนก็ต้องดำเนินการให้ถูกต้องและชัดเจนเพื่อเป็นการป้องกันความเสียหายที่มีต่อผู้บริโภค อีกทั้งเพื่อป้องกัน

ความรับผิดชอบในความเสียหายที่จะเกิดขึ้นอีกด้วย

๔. ผู้ประกอบการอาจดำเนินการประกันภัยสินค้าที่ตนผลิตหรือนำเข้า เพื่อโอนความเสี่ยงภัยให้กับผู้รับประกันภัย

๕. ผู้ประกอบการควรมีการตั้งศูนย์เจรจาไกล่เกลี่ยภายในสถานประกอบการเพื่อรับเรื่องร้องเรียนหรือการเรียกร้องค่าเสียหายในชั้นต้นระหว่างผู้บริโภคกับผู้ประกอบการ

พระราชบัญญัติวิธีพิจารณาคดีผู้บริโภค

พ.ศ. ๒๕๕๑

กฎหมายคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภคทุกขั้นตอนของการดำเนินคดีผู้บริโภคดังนี้

- (๑) ขั้นตอนก่อนฟ้องคดีต่อศาล
- (๒) ขั้นตอนขณะคดีอยู่ในระหว่างการพิจารณาของศาล
- (๓) ขั้นตอนเมื่อศาลทำคำพิพากษาชี้ขาดตัดสินคดี
- (๔) ขั้นตอนการอุทธรณ์ฎีกา
- (๕) ขั้นตอนในชั้นบังคับคดี

(๑) ขั้นตอนก่อนฟ้องคดีต่อศาล

๑. การคุ้มครองผู้บริโภคเกี่ยวกับการทำเอกสารสัญญา (ม.๑๐)

๑.๑ กรณีนิติกรรมที่ต้องมีหลักฐานเป็นหนังสือห้ามมิให้นำมาใช้บังคับแก่ผู้บริโภค

๑.๒ กรณีเป็นสัญญาที่ต้องทำตามแบบ mẫuผู้บริโภคมิได้ทำตามแบบ แต่ผู้บริโภคได้วางมัดจำหรือชำระหนี้บางส่วนแล้ว ให้ผู้บริโภคมีอำนาจฟ้องบังคับเป็นสัญญาได้

๑.๓ การห้ามนำ ป.วิ.พ. มาตรา ๙๔ มาใช้บังคับแก่ผู้บริโภค

๒. การควบคุมจริยธรรมของผู้ประกอบธุรกิจ โดยผู้ประกอบธุรกิจต้องกระทำโดยสุจริต (ม. ๑๒)

๓. การบัญญัติให้ข้อตกลงนอกสัญญาเป็นส่วนหนึ่งของสัญญา เช่น ประกาศ โฆษณา คำรับรอง (ม.๑๑)

๔. การคุ้มครองผู้บริโภคในปัญหาเรื่องอายุความ

๔.๑ อายุความกรณีความเสียหายเพิ่งปรากฏหรือแสดงอาการในภายหลัง (ม.๑๓)

๔.๒ อายุความสะดุดหยุดอยู่ในระหว่างการเจรจาเกี่ยวกับค่าเสียหาย (ม.๑๔)

๕. การให้สิทธิผู้บริโภคขอคุ้มครองชั่วคราวก่อนยื่นฟ้องคดี (ม.๕๖ ถึง ม.๖๒)

(๒) ขั้นตอนคดีอยู่ในระหว่างการพิจารณาของศาล

๑. กระบวนพิจารณาที่ **สะดวก** แก่ผู้บริโภคในการฟ้องร้องหรือดำเนินคดี

๑.๑ ผู้บริโภคฟ้องคดีได้เอง หรือให้

คณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค สมาคมที่คณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภครับรอง มีอำนาจฟ้องคดีแทนผู้บริโภค (ม.๑๙วรรคหนึ่ง)

๑.๒ กำหนดให้ผู้ประกอบธุรกิจต้องยื่นฟ้องผู้บริโภคต่อศาลที่ผู้บริโภคมีภูมิลำเนาอยู่ในเขตศาลได้เพียงแต่แห่งเดียว (ม.๑๗)

๒. กระบวนพิจารณาที่ **ประหยัด** ค่าใช้จ่ายของผู้บริโภค

๒.๑ ยกเว้นค่าฤชาธรรมเนียมทั้งปวงให้แก่ผู้บริโภค (ม.๑๘)

๒.๒ ออกข้อกำหนดให้เจ้าพนักงานคดี

ช่วยเหลือผู้บริโภค

๒.๓ การส่งเอกสารและคำคู่ความทำได้ง่ายขึ้น
ตามข้อกำหนดของประธานศาลฎีกา
(ม.๑๖)

๒.๔ ผู้บริโภคสามารถดำเนินคดีด้วยตนเองได้
โดยไม่จำเป็นต้องว่าจ้างทนายความ

๓. กระบวนพิจารณาที่ **รวดเร็ว**

๓.๑ ศาลต้องกำหนดวันนัดพิจารณาโดยเร็ว
(ม.๒๔)

๓.๒ เป็นกระบวนพิจารณาที่รวดเร็วตัดสินตอน
ที่ยุ่งยากซับซ้อนของวิธีพิจารณาสამัญญ
ออกโดยสิ้นเชิง (ม.๒๔ ถึง ม.๓๗)

๓.๓ ศาลต้องนั่งพิจารณาคดีโดยเนื่อง หากมี
เหตุจำเป็นให้เลื่อนคดีได้ไม่เกิน ๑๕ วัน
(ม.๓๕)

๔. กระบวนพิจารณาที่ **ง่าย**

๔.๑ คู่ความอาจยื่นคำฟ้องหรือคำให้การต่อผู้
คดีเป็นหนังสือหรือด้วยวาจาก็ได้ (ม.๒๐
และ ม.๒๖)

๔.๒ คลายความเคร่งครัดหรือกฎเกณฑ์ที่เป็น
เทคนิควิธีการของกฎหมาย วิธีพิจารณา
ความออกหมด

๔.๒.๑ อำนาจศาลในการแก้ไขการ
ดำเนินคดีโดยผิดระเบียบหรือผิดหลง
(ม.๙)

๔.๒.๒ อำนาจศาลในการย่นหรือขยาย
ระยะเวลา (ม.๑๕)

๔.๓ ศาลเป็นผู้ตรวจสอบค้นหาความจริงด้วย
ตนเอง

๔.๓.๑ ศาลไต่ถามสืบให้คู่ความตกลงกัน
ก่อน

๔.๓.๒ หากคู่ความไม่อาจตกลงกันได้และ
จำเลยยังมีได้ยื่นคำให้การ

- ศาลจัดให้มีการสอบถามคำให้การจำเลย
(ม.๒๖)

- ศาลถามความประสงค์ของคู่ความ
เกี่ยวกับพยานที่จะนำเข้าสู่สืบ (ม.๓๑)

- การกำหนดให้การระการพิสูจน์ข้อเท็จจริงที่
อยู่ในความรู้นั้น

- โดยเฉพาะของผู้ประกอบธุรกิจตกอยู่แก่
คู่ความฝ่ายที่เป็นผู้ประกอบธุรกิจ (ม.๒๙)

- ศาลแจ้งประเด็นข้อพิพาทและกำหนด
หน้าให้นำสืบก่อนหลัง (ม.๓๒)

- ศาลเป็นผู้ซักถามพยานเองเป็นหลัก
(ม.๓๔)

- ศาลมีอำนาจแสวงหาพยานหลักฐานเอง
(ม.๓๓)

- ศาลมีอำนาจให้ผู้ทรงคุณวุฒิหรือ
ผู้เชี่ยวชาญมาให้ความเห็นประกอบการ
พิจารณา (ม.๓๖)

(๓) ขั้นตอนการพิพากษาคดี

๑. ศาลมีอำนาจพิพากษาคดีเกินกว่าคำขอบังคับ
ของโจทก์ (ม.๓๙)

๒. ศาลมีอำนาจกล่าวสงวนสิทธิ์ที่จะแก้ไขคำ
พิพากษาหรือคำสั่งไว้ในคำพิพากษา (ม.๔๐)

๓. ศาลมีอำนาจพิพากษาบังคับให้ผู้ประกอบ
ธุรกิจเปลี่ยนสินค้าใหม่ให้แก่ผู้บริโภค (ม.๔๑)

๔. ศาลมีอำนาจสั่งให้ผู้ประกอบธุรกิจจ่าย
ค่าเสียหายในเชิงลงโทษ (ม.๔๒)

๕. ศาลมีอำนาจพิพากษาหรือสั่งจัดการแก้ไขสินค้า
ที่ได้จำหน่ายไปแล้วหรือหลงเหลืออยู่ในท้องตลาดอัน

อาจเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภคโดยส่วนรวม (ม.๔๓)

๖. ศาลมีอำนาจพิพากษาให้หุ้นส่วนหรือผู้ถือหุ้นหรือบุคคลที่มีอำนาจควบคุมการดำเนินงานของผู้ประกอบธุรกิจที่เป็นนิติบุคคลร่วมรับผิดชอบในหนี้ของผู้ประกอบธุรกิจ (ม.๔๔)

(๔) ขั้นตอนการอุทธรณ์ ฎีกา

๑. กำหนดให้คดีที่มีทุนทรัพย์ที่พิพาทในชั้นอุทธรณ์ไม่เกินห้าหมื่นบาท เป็นคดีที่ต้องห้ามอุทธรณ์ในปัญหาข้อเท็จจริง เว้นแต่ศาลอุทธรณ์จะอนุญาต (ม.๔๗)

๒. กำหนดให้คำพิพากษาหรือคำสั่งของศาลอุทธรณ์เป็นที่สุด (ม.๔๘) เว้นแต่คดีที่มีทุนทรัพย์ที่พิพาทกันเกินชั้นฎีกาเกินสองแสนบาท หรือคดีในปัญหาข้อกฎหมาย

ศาลฎีกาอาจพิจารณาอนุญาตให้ฎีกาได้เมื่อ

(ก) เป็นปัญหาซึ่งเกี่ยวพันกับประโยชน์

สาธารณะ

(ข) เป็นปัญหาสำคัญอื่นที่ศาลฎีกาควรวินิจฉัย

(ม.๕๑ , ๕๒)

(๕) ขั้นตอนชั้นบังคับคดี

๑. เจ้าหนี้ตามคำพิพากษาอาจมีคำขอฝ่ายเดียวขอให้ศาลออกหมายบังคับคดีไปทันทีโดยไม่ต้องออกคำบังคับก่อน ถ้าหากนั้นจะเกิดความเสียหาย หรือไม่อาจบังคับคดีได้ (ม.๖๔)

๒. ถ้าความปรากฏแก่ศาลว่า มีข้อขัดข้องทำให้ไม่อาจดำเนินการบังคับคดีตามคำพิพากษาได้มีความจำเป็นต้องกำหนดวิธีการอย่างหนึ่งอย่างใดเพื่อบังคับให้เป็นไปตามคำพิพากษา ศาลมีอำนาจออกคำสั่งเพื่อแก้ไขข้อขัดข้องดังกล่าวตามความจำเป็นและสมควรเพื่อประโยชน์แก่ความยุติธรรม (ม.๖๕).

Mercury the Culprit?

ผศ. นพ.สุชัย สุเทพารักษ์

สาขาวิชาพิษวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ปรอท (mercury, Hg) เป็นโลหะหนักที่ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท และมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ในครัวเรือนหลายชนิด กล่าวคือเป็นส่วนหนึ่งของชีวิตประจำวัน การแพทย์ได้ศึกษาถึงพิษของปรอทมาเป็นเวลานาน และมีตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากปรอท ทั้งในกรณีเป็นบุคคล และเป็นชุมชน การเป็นพิษของปรอทขึ้นอยู่กับทางเข้าสู่ร่างกาย (route) ระยะเวลาที่ได้รับ (duration) และประเภทของปรอท ได้แก่ โลหะปรอท (metal mercury) สารประกอบอินทรีย์ของปรอท (organic mercury) และสารประกอบอนินทรีย์ของปรอท (inorganic mercury) ซึ่งแต่ละประเภทจะทำให้เกิดรูปแบบการเป็นพิษทางคลินิกได้แตกต่างกัน ปรอทจะมีพิษต่อระบบอวัยวะได้หลายระบบ แต่ระบบที่มีความสำคัญ และมีการศึกษาเป็นอย่างมากคือ ระบบประสาท โดยที่ปรอทมีผลทำลายระบบประสาทส่วนกลาง และในบางรายจะไม่สามารถทำการรักษาได้ ซึ่งความเป็นพิษนี้ทำให้มีมาตรการและการกำกับดูแล ควบคุมปริมาณปรอทในการทำงาน สิ่งแวดล้อม และในชีวิตประจำวัน

ปัจจุบันมีความตื่นตัวในด้านสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภัยต่อสุขภาพที่มาจากสิ่งแวดล้อม ประกอบกับความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี ทำให้การตรวจวิเคราะห์หาสารต่างๆ ที่มีปริมาณน้อย แต่มากกว่าค่าปกติที่ยอมรับได้ ทำได้ง่ายขึ้น ประสิทธิภาพมากขึ้น แต่บุคลากรทางแพทย์ต้องมีความรู้ด้วยว่า การตรวจพบสารบางอย่างในตัวอย่างทางชีววัตถุของมนุษย์ (biological samples) ที่มีค่าสูงกว่าค่าปกติ ในที่นี้คือ การตรวจพบระดับปรอทในเลือด หรือในปัสสาวะที่ได้ค่าสูงกว่าค่าปกติ ไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยนั้นๆ เป็นพิษจากปรอท ต้องอาศัยความเป็นไปได้ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ประวัติการสัมผัสปรอท อาการ และอาการแสดงทางคลินิกประกอบด้วย จึงจะทำการวินิจฉัยได้ถูกต้อง อีกทั้งการนำผู้ป่วยไปรักษา เพื่อขับปรอทออกจากร่างกายโดยไม่มีหลักฐานยืนยันประโยชน์ของการรักษา และอาจจะมีผลข้างเคียงจากการรักษา ย่อมเพิ่มความเสี่ยงให้กับผู้ป่วย บุคลากรผู้เกี่ยวข้องควรตระหนักถึงปัญหานี้เพื่อจะได้ร่วมมือกันแก้ไขและป้องกัน

ความปลอดภัยของอมัลกัม

ผศ.ทพญ.ดร. ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์

ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

อมัลกัมคือวัสดุบูรณะฟันที่เกิดจากการนำผงโลหะหลอมมาผสมกับสารปรอท ทำให้ได้สารประกอบใหม่ที่เรียกว่า silver-mercury compound หรือ gamma 1 (γ_1) เป็นตัวเชื่อม un-reacted alloy core ซึ่งสารประกอบที่ได้นี้มีความเสถียร การสลายโครงสร้างของ γ_1 จนเกิดไอปรอท ต้องใช้ความร้อนสูงเกิน 100 °C ซึ่งไม่พบในชีวิตประจำวัน และไม่เคยมีรายงานว่ามีการกลืนกินปรอทที่มาจากวัสดุอมัลกัม การใช้สารปรอทเพื่อทำเป็นวัสดุบูรณะฟันอมัลกัมนั้น ถ้ากระทำอย่างไม่ถูกต้องตามหลักวิชาจะทำให้มีผลเสียต่อสุขภาพของทันตบุคลากรที่ปฏิบัติงานสัมผัสกับสารเหล่านั้นเกือบทุกวัน และจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และอาจกระทบถึงผู้ป่วยในที่สุด การต่อต้านการใช้อมัลกัมในบางประเทศ เป็นผลมาจากความห่วงใยเรื่องสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม องค์การทางวิชาชีพและทางสุขภาพ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ต่างก็ยืนยันว่าอมัลกัมเป็นวัสดุบูรณะฟันที่ปลอดภัย แข็งแรง ทนทาน ใช้งานง่ายและราคาไม่สูง ทันตแพทย์ควรจัดการกับอมัลกัมอย่างระมัดระวัง และควรปฏิบัติตามข้อกำหนดต่างๆ เกี่ยวกับการใช้สารปรอทอย่างปลอดภัยในงานทันตกรรม เพื่อประโยชน์สุขของผู้ป่วย ตัวทันตแพทย์เองและทันตบุคลากรต่างๆ ตลอดจนไม่สร้างปัญหาให้สิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันมีการตั้งข้อสงสัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของวัสดุบูรณะฟันอมัลกัม โดยกลุ่มผู้ต่อต้านการใช้อมัลกัม อ้างว่าอมัลกัมเป็นวัสดุมีพิษเพราะมีสารปรอทเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง เมื่อมีอมัลกัมในปาก ผู้ป่วยจะได้รับสารปรอทเข้าไปในร่างกายตลอดเวลา โดยอาจอยู่ในรูปของไอปรอท หรือมีการกลืนกินสารปรอทเข้าไป และอาการแสดงพิษของอมัลกัม คืออาการเดียวกับอาการแสดงพิษของสารปรอท ซึ่งมีอาการส่วนใหญ่เกี่ยวกับระบบประสาทส่วนกลาง จึงเป็นหน้าที่ ที่ทันตแพทย์ต้องให้ความรู้ความเข้าใจแก่ผู้ป่วย ทันตบุคลากร รวมทั้งบุคคลทั่วไปในสังคมถึงความปลอดภัยของอมัลกัม

อมัลกัมคือ วัสดุบูรณะฟันที่เกิดจากการนำผงโลหะหลอม (metal alloy) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ เงิน ทองแดง ดีบุก และสังกะสีปริมาณต่ำๆ ผสม (triturate) กับสารปรอท ในอัตราส่วน 1:1 โดยประมาณ โดยการใช้เครื่องปั่น (amalgamator) ทำให้ได้สารประกอบใหม่ที่เรียกว่า silver-mercury compound หรือ gamma 1 (γ_1) ปะปนอยู่กับ un-reacted alloy core ซึ่งสารประกอบนี้มีความเสถียร โดยมีสารประกอบอื่น ได้แก่ Cu-Sn (η') เกิดรวมในปริมาณต่ำเดิมมีการใช้ alloy ที่มีทองแดงปริมาณต่ำ (6% หรือน้อยกว่า) ทำให้เกิดสารข้างเคียงที่เรียกว่า tin-mercury หรือ γ_2 ซึ่งเป็น compound ที่ทำให้อมัลกัม

อาจมีการเสื่อมง่ายจากกระบวนการ corrosion อย่างไรก็ดี ผง alloy ในปัจจุบันมีปริมาณทองแดง สูงถึง 12-30% ไม่พบการเกิด γ_2 แต่พบ η' แทน ซึ่งไม่เกิด corrosion ทำให้โครงสร้างของอมัลกัมค่อนข้างเสถียร นอกจากนี้ ปัจจุบันมีการสนับสนุนให้ใช้อมัลกัมในลักษณะที่เป็น pre-capsulated form นั่นคือ มีการควบคุมปริมาณผง alloy และสารปรอท ในอัตราส่วนที่กำหนดมาคงที่ และเมื่อใช้งานอย่างถูกต้องปรอทจะถูกใช้หมดไปในปฏิกิริยา การเกิดอมัลกัม โดยไม่มีส่วนเกินหลงเหลือออกมาเป็นไอดังที่เข้าใจกัน การสลายโครงสร้างของ silver-mercury compound หรือ γ_1 จนเกิดไอปรอทออกมา ต้องใช้ความร้อนสูงเกิน 100°C ซึ่งไม่พบในชีวิตประจำวัน และไม่เคยมีรายงานว่ามีการกลืนกินปรอทที่มาจากวัสดุอมัลกัม และการดูดซึมสารปรอท (elemental mercury) หรือปรอทในรูปของ inorganic compound โดยระบบทางเดินอาหารมีน้อยมาก ซึ่งตรงข้ามกับปรอทในรูปของ organic compound เช่นที่พบในอาหารจะสามารถถูกดูดซึมเข้าระบบทางเดินอาหารได้เกือบ 100%¹ อย่างไรก็ตาม การใช้สารปรอท เพื่อนำมาทำเป็นวัสดุบูรณะฟันอมัลกัมนั้น ถ้ากระทำอย่างไม่ถูกต้องตามหลักวิชา และไม่ระมัดระวัง จะทำให้มีผลเสียต่อสุขภาพของทันตบุคลากรที่ปฏิบัติงานสัมผัสกับสารเหล่านั้นเกือบทุกวัน และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและอาจกระทบถึงผู้ป่วยในที่สุด

ปรอทเป็นธาตุที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ มีอยู่ในดิน แหล่งน้ำ ซึ่งสามารถเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ การเผาผลาญ fossil fuel ทำให้มีไอปรอทในบรรยากาศ ปรอทถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น นำมาใช้มากที่สุดในการ

อุตสาหกรรมผลิตอุปกรณ์การไฟฟ้า การใช้สารปรอทในอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ เครื่องวัดความดัน ใช้เป็นสาร preservatives ในการทำวัคซีนบางประเภท และนำมาผสมกับ metal alloy เป็นวัสดุบูรณะฟันที่เรียกว่า อมัลกัม เป็นต้น การใช้สารปรอทอย่างไม่ระมัดระวัง ทำให้มีการหลุดร่วของสารปรอทสู่สิ่งแวดล้อม และมีการทิ้งของเสียที่มีสารปรอทลงสู่ระบบน้ำทิ้ง สัตว์ทะเลบางประเภท เช่น หอยและปลาบางชนิด รับสารปรอทและสามารถเปลี่ยนรูปของปรอทให้เป็น organic หรือ methyl mercury ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์เมื่อได้รับในปริมาณมาก เช่นที่พบในเหตุการณ์ Minamata ที่ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประชาชนจำนวนมากได้รับพิษจากสารปรอทที่ถูกทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมลงสู่ทะเล และประชาชนแถบนั้น ได้รับสารปรอทจากการรับประทานอาหารทะเลเป็นเวลานาน

นอกจากนี้การปนเปื้อนของสารปรอทต่อสิ่งแวดล้อมโดยระบบน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม นำไปสู่การปนเปื้อนในระบบของการเลี้ยงพืชและสัตว์ และเข้ามาในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ในที่สุด จะเห็นได้ว่ามีการใช้สารปรอทในหลายอุตสาหกรรมและมีอยู่ด้วยแล้วตามธรรมชาติ เป็นสิ่งที่มนุษย์เกือบจะหลีกเลี่ยงไม่ได้ การใช้สารปรอทในทางทันตกรรมเป็นเพียงไม่ถึง 5% ของสารปรอททั้งหมด (global mercury) ที่หมุนเวียนอยู่ในโลกนี้ มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากเรื่องสารปรอทจากอมัลกัมที่อาจมีผลต่อร่างกายมนุษย์ ไม่ปรากฏพบความสัมพันธ์ของการมีอมัลกัมในช่องปากกับการเจ็บป่วยใดๆ ดังที่มีการกล่าวอ้างและที่สำคัญที่สุด มีการศึกษาในลักษณะของ randomized clinical trials พบว่าในกลุ่มเด็กที่มีอมัลกัมในช่องปาก ไม่พบว่ามียาใดๆ ทั้งสิ้นต่อ

พัฒนาการและสุขภาพของเด็ก เปรียบเทียบกับกลุ่มเด็กที่ไม่มีอมัลกัม²⁻⁸ นอกจากนี้ผลของการศึกษาการวัดปริมาณไอปรอท ในปากของผู้ป่วยที่มีอมัลกัม ไม่สามารถได้ข้อสรุปชัดเจน เนื่องจากวิธีการที่ใช้มีหลายวิธีและอาจไม่ใช่วิธีที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มควบคุม คือผู้ป่วยที่ไม่มีอมัลกัมในช่องปากเลย ก็ตรวจพบไอปรอท ทำให้ผลการศึกษาที่ได้ อาจไม่น่าเชื่อถือ^{6,7} อย่างไรก็ตามทันตแพทย์ที่ไม่ได้ใช้อมัลกัมชนิด pre-capsulated อาจผสมอมัลกัมใช้อย่างไม่ถูกต้องตามหลักการ ทำให้มีสารปรอทส่วนเกินหลงเหลือจากปฏิกิริยา ก็อาจมีการปลดปล่อยไอปรอทออกมาเมื่อมีการบดเคี้ยวอย่างรุนแรง หรือได้รับความร้อนที่ผิววัสดุสูงกว่า 100°C การตรวจวัดปริมาณสารปรอทในเลือดและปัสสาวะ เป็นวิธีการที่เหมาะสม ที่จะตรวจว่ามีการสะสมสารปรอทในร่างกายหรือไม่ โดยการตรวจเลือดเป็นการตรวจการได้รับสารปรอทแบบ short-term หรือ acute exposure ส่วนการตรวจปัสสาวะเป็นการตรวจสารปรอทแบบที่มี long-term หรือ chronic exposure ปริมาณสารปรอทในเลือดที่จัดเป็น toxic dose คือ 200 µg/L ปริมาณสารปรอทในปัสสาวะที่จัดเป็น toxic dose คือ 25-50 µg/g creatinine หรือสูงกว่า ปริมาณไอปรอทที่จัดว่าเป็นปริมาณที่เป็นอันตราย คือ 25 µg/m³ (ตามข้อกำหนดของ WHO) หรือ 50 µg/m³ (ตามข้อกำหนดของ NIOSH, OSHA และกระทรวงมหาดไทย ประเทศไทย) จากการศึกษาพบว่าคนที่ร่างกายมนุษย์จะได้รับปริมาณสารปรอทจากอมัลกัมเข้าไป จนร่างกายแสดงอาการพิษของปรอทนั้น ต้องมีอมัลกัมในปากประมาณ 400-500 ด้าน^{6,7} (มนุษย์มีฟันหลัง 20 ซี่ ถ้าอุดทุกซี่ทุกด้าน จะมีอมัลกัม 100 ด้าน ต่อ 1 ปาก แต่ในความเป็นจริง

คนเรามากมีอมัลกัมสูงสุดไม่เกิน 60 ด้านในปาก)

การต่อต้านการใช้หรือยกเลิกการใช้อมัลกัมในบางประเทศ เป็นผลมาจากความห่วงใยเรื่องสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ญี่ปุ่น เยอรมนี และกลุ่มประเทศสแกนดิเนเวีย แต่มีผู้ที่อยู่ในกลุ่มทางสายการแพทย์และทันตแพทย์ ที่หวังผลประโยชน์จากการใช้อมัลกัม เพื่อขายบริการทางการแพทย์ หรือการบูรณะฟันด้วยวัสดุที่มีราคาแพงกว่า กล่าวอ้างว่าอมัลกัมมีพิษ ต้องไปกำจัดออก ทำให้ประชาชนเกิดความเข้าใจผิด และตื่นตระหนก จนกลายเป็นกระแสความหวาดกลัวอมัลกัม องค์การทางวิชาชีพ และทางสุขภาพ ได้แก่ American Dental Association, Federation Dentaire Internationale (World Dental Federation), Food and Drug Administration (FDA) และ European Commission เป็นต้น ต่างก็ยืนยันว่าอมัลกัมมีความปลอดภัยเมื่อใช้อย่างถูกต้อง^{9,10} นอกจากนี้จาก statement ของ FDA ซึ่งปรากฏใน website ของ FDA เมื่อเดือนกรกฎาคม 2552 ยืนยันว่าอมัลกัมเป็นวัสดุบูรณะฟันที่ปลอดภัย และได้เปลี่ยนสถานะภาพของอมัลกัมเป็น Class II medical device ซึ่งอยู่ในระดับการควบคุมเดียวกับวัสดุบูรณะฟันชนิดเรซินคอมโพสิตซึ่งเป็นวัสดุสีคล้ายฟันที่ได้รับความนิยมสูงมากในปัจจุบัน

ปัญหาจากอมัลกัมในผู้ป่วย มักพบในลักษณะ local reaction ต่อเนื้อเยื่อในช่องปากที่สัมผัสกับวัสดุอมัลกัม ในกรณีที่ผู้ป่วยมีความไวต่อหรือแพ้โลหะ โดยพบลักษณะเป็น white lesion และอาจมีอาการ burning sensation ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ ซึ่งอาการจะหายไปภายในไม่กี่วัน เมื่อรื้ออมัลกัมออกโดยไม่เคยพบว่าคนไข้เหล่านี้มีปัญหาทางระบบอื่นๆ อย่างไรก็ตาม เป็นสิ่งที่พึงตระหนักว่าสารใดๆ ก็ตามใน

โลกนี้ ขนาดหรือ dose ของการใช้จะเป็นตัวระบุความปลอดภัยหรือความมีพิษ สารอื่นๆ ที่ใช้กับร่างกายมนุษย์ก็สามารถตรวจพบร่องรอยของสารเหล่านั้นในร่างกายได้ จัดเป็นเรื่องธรรมดาและร่างกายก็สามารถกำจัดออกได้ ในระยะเวลาอันสมควร สารปรอทในปริมาณต่ำที่ตรวจพบในร่างกาย สามารถถูกกำจัดออกได้ภายใน 35-50 วัน บางคนตรวจพบว่ามีการสะสมปรอทสูงขึ้นในเลือดหรือในปัสสาวะ จะตื่นตระหนก รีบไปรื้ออัมมัลกัมออก กระบวนการรื้ออัมมัลกัมทำให้เกิดความร้อนสูงที่ผิวหนัง และทำให้มีการสลายโครงสร้างของ γ_1 ทำให้ยิ่งตรวจพบว่ามีปริมาณปรอทสูงขึ้นเฉียบพลัน ทำให้ยิ่งตกใจและกล่าวโทษอัมมัลกัม เป็นความเข้าใจผิดอย่างร้ายแรง และทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสที่จะไปตรวจหาที่มาอื่นของสารปรอทที่ได้รับ เช่น อาจมาจากอาหาร น้ำ หรือจากสิ่งแวดล้อมก็เป็นได้ เป็นการไม่สมควรอย่างยิ่งที่มีการกล่าวอ้างโดยกลุ่มต่อต้านอัมมัลกัม ว่าอัมมัลกัมเป็นสารพิษ และพิษของอัมมัลกัมทำให้เกิดอาการทางระบบต่างๆ เช่นเดียวกับที่พบได้จากอาการของการได้รับพิษจากสารปรอท อัมมัลกัมและสารปรอทไม่ใช่สิ่งเดียวกัน และไม่เคยมีรายงานผู้ป่วยว่าเกิดอาการต่างๆ ที่กล่าวถึงจากการที่มีการบูรณะฟันด้วยอัมมัลกัม การให้ข้อมูลที่ผิดตรงตามหลักวิชา และการชี้แนะให้ประชาชนเกิดความเข้าใจผิด อาจนำไปสู่กระแสความตื่นตระหนกได้

อย่างไรก็ดี ผู้ป่วยมีสิทธิ์เต็มที่จะปฏิเสธวัสดุอัมมัลกัมได้ ทันตแพทย์จึงต้องมีความรู้ความสามารถในการนำเสนอทางเลือกอื่นที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วย ตลอดจนสามารถอธิบายข้อดีข้อด้อยต่างๆ ของวัสดุ วิธีการทางเลือกอื่นเหล่านั้นให้ผู้ป่วยได้เข้าใจ ตลอดจนสามารถทำการบูรณะฟันโดยวิธีอื่นๆ

ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน ทางวงการทันตแพทย์โดยการนำของสถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับทันตแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ และผู้ทรงคุณวุฒิจากคณะทันตแพทยศาสตร์ ตระหนักดีถึงอันตรายของสารปรอทที่อาจมีต่อ ทันตบุคลากร ประชาชน และ สิ่งแวดล้อม จึงได้มีการรณรงค์อย่างต่อเนื่องถึงการใช้และการจัดการสารปรอทที่ใช้ในทางทันตกรรมให้ปลอดภัย¹¹ โดยทันตแพทย์สภา ทันตแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทยฯ และสถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีจุดยืนที่ชัดเจนเกี่ยวกับอัมมัลกัมว่า เมื่อใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชา อัมมัลกัมเป็นวัสดุที่มีความปลอดภัย แข็งแรง ใช้งานง่าย และราคาไม่สูง และเป็นวัสดุที่เป็นประโยชน์อย่างสูงในการบูรณะฟันให้แก่ผู้ป่วย

สรุป

อัมมัลกัม เมื่อใช้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาแล้ว จัดเป็นวัสดุที่มีความปลอดภัย แข็งแรงทนทาน ใช้งานง่ายและราคาไม่สูง ทันตแพทย์ควรจัดการกับอัมมัลกัมอย่างระมัดระวัง และควรปฏิบัติตามข้อกำหนดต่างๆ เกี่ยวกับการใช้สารปรอทอย่างปลอดภัยในงานทันตกรรม เพื่อประโยชน์สุขของผู้ป่วย ตัวทันตแพทย์เอง และทันตบุคลากรต่างๆ ตลอดจนไม่สร้างปัญหาให้สิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

1. Bayne SC, Thompson JY. Biomaterials. In: Roberson TH, Heymann HO, Swift EJ, eds. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, 5th ed. St. Louis: Mosby Elsevier,

- 2006:135-233.
2. Barregard L, Trachtenberg F, McKinlay S. Renal effects of dental amalgam in children: The New England children's amalgam trial. *Environ Health Persp* 2008; 116: 394-9.
 3. Bellinger DC, Trachtenberg F, Barregard L. Neuropsychological and renal effects of dental amalgam in children: a randomized clinical trial. *JAMA* 2006; 295: 1775-83.
 4. Bellinger DC, Trachtenberg F, Zhang A, et al. Dental amalgam and psychosocial status: the New England children's amalgam trial. *J Dent Res* 2008; 87: 470-4.
 5. DeRouen TA, Martin MD, Leroux BG, et al. Neurobehavioral effects of amalgam in children: a randomized clinical trial. *JAMA* 2006; 295: 1784-92.
 6. Mackert Jr JR, Berglund A. Mercury exposure from dental amalgam fillings: absorbed dose and the potential for adverse health effects. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8: 410-36.
 7. Roberts HW, Charlton DG. The release of mercury from amalgam restorations and its health effects: A review. *Oper Dent* 2009; 34: 605-14.
 8. Saxe SR et al. Alzheimer's disease, dental amalgam and mercury. *J Am Dent Assoc* 1999; 130: 191-9.
 9. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. European Commission 2007. The safety of dental amalgam and alternative dental restoration materials for patients and users. Available at: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scen_ihr/docs/scen_ihr_o_011.pdf, accessed Nov 2009.
 10. ADA. ADA Council on Scientific Affairs statement on dental amalgam. Available at: <http://www.ada.org/prof/resources/positions/statements/amalgam.asp>, accessed Nov 2009.
 11. กฤษฎา ปัญจวัฒน์, บก. แนวปฏิบัติทางทันตกรรมในการใช้ปรอทอย่างปลอดภัย. นนทบุรี: สถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2551.

Genetic Epidemiology of Breast cancer in Thai women

Suleeporn Sangrajrang

Research Division, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Breast cancer is the first leading cancer among Thai women and the incidence still increasing. Although there are well established risk factors, such as age at first child's birth, nulliparity, and family history of breast cancer, the etiology of breast cancer is still not completely known, particularly in Thailand.

There are many single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human genome that alter the activity of key enzymes. High-throughput molecular method can be used to associate with specific diseases in case-control studies and provide clues to causation. To evaluate the role of genetic polymorphisms of selected gene and gene-environment interactions in breast cancer, we conducted a case-control study with 554 cases and 572 controls. Cases were all new incident breast cancer patients histopathologically diagnosed in the National Cancer Institute in Bangkok and in Khon Kaen University hospital, and Khon Kaen General Hospital during the period of May 2002 - March 2004. Controls were randomly selected from healthy women that visited patients admitted to the same hospitals for diseases than breast or ovarian cancer, who were matched to cases on age (± 5 years) and residence.

Selected genes included are those involved in estrogen synthesis and metabolism (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP17*, *CYP19*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *ESR1*, *PGR*, *ERRG*, *COMT*, *NQO1*, *HSD17B1*, *HSD17B2*, *AhR*), folate and alcohol metabolism (*MTR*, *MTRR*, *MTHFR*, *TYMS*, *ADH1C*, *ALDH2*, *GSTP1*, *NAT1*, *NAT2*, *CYP2E1*, *DRD2*, *DRD3*, *SLC6A4*), DNA repair (*hOGG1*, *APE1*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*). Genetic polymorphism were determined by PCR, PCR-RFLP, light-cycler and 5'-nuclease assay (Taqman). Some SNPs showed significantly different distribution between case and control. For example, we found that *CYP1A2*, *CYP2C19*, *AhR* genotypes were associated with an increased risk of breast cancer, while a protective effect of *CYP17*, *CYP1B1*, *ERRG* genotype were found. For genetic polymorphism of DNA repair enzyme, we found that *APE1* showed a significant protective effect of breast cancer risk. Further more, subgroup analysis based on menopausal status revealed increased breast cancer risk in postmenopausal women and *OGG1* polymorphism. Diplotype analysis of *XRCC1* (codon 194, 280, 399) revealed that CGA/CGA carriers had an increased risk of breast cancer compared with carriers of the wild type CGG/CGG. When the joint effect of *XRCC1*, *APE1* and *OGG1* polymorphism were evaluated, individuals homozygous for two or three risk allele were associated with breast cancer risk.

In conclusion, these results suggest that genetic polymorphisms of some selected penetrance genes in individual susceptibility to breast cancer development in Thai Women.

Pharmacogenomics and Its Applications

Soranun Chantarangsu

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Adverse drug reactions (ADRs) in patients cause more than 2 million hospitalizations including 100,000 deaths per year in the United States. In 2002, ADRs accounted for 6.5% of hospital admissions and 0.15% of subsequent deaths in United Kingdom. In order to improve the efficacy and safety and to understand the disposition and clinical consequences of drugs, pharmacogenetics and pharmacogenomics have undertaken studies on the genetic personalization of drug response. This is because many drug responses appear to be genetically determined and the relationship between genotype and drug response may have a valuable diagnostic value. Identification and characterization of a large number of genetic polymorphisms (biomarkers) in drug metabolizing enzymes and drug transporters in an ethnically diverse group of individuals may provide substantial knowledge about the mechanisms of inter-individual differences in drug response and improve the management of patient care by determining which patients should avoid a specific drug and which patients should take a modified dose of the drug. This strategy could potentially reduce medical costs and improve the process of drug development.

Nevirapine (NVP) is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and is frequently used as one of the basic components in highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection in resource-limited countries because of its efficiency and availability as an affordable generic combined pill. However, it often causes cutaneous adverse drug reactions with an approximate incidence of 15-20%. This study aimed to investigate an association between genetic risk factors and NVP-induced skin rash in 80 HIV patients with NVP-induced skin rash and 80 NVP-tolerant patients by means of candidate genes and genome-wide approaches. As well, the study evaluated a replication sample set (80 NVP-rash cases and 142 tolerant patients).

The candidate gene approach revealed a significant association between *HLA-B*3505* and NVP-induced skin rash with a p-value of 3.8×10^{-9} in a combined data set (OR = 21.79, 95% CI = 5.62-84.03). Using the genome-wide approach, the verification of SNP marker loci identified significant associations of 15 polymorphisms in the *CCHCR1* gene with an equivalent p-value of 1.2×10^{-8} in a combined data set (OR = 4.36, 95% CI = 2.58-7.36). Logistic regression analysis also indicated that *HLA-B*3505* and *CCHCR1* polymorphisms were significantly associated with skin rash with p-values of 0.00155 and 0.0080, respectively. A combination of these novel genetic markers predicts the risk of NVP-induced skin rash with a sensitivity and specificity of 37.8% and 88.4%, respectively.

Our findings supported the importance of this study in identifying common moderate risk alleles in pharmacogenomic studies. As well, the research findings may be useful in the development of a diagnostic test for the prevention of NVP-induced skin rash especially in Thai population.

Controversies in the Management of Snakebites

ผศ.นพ.สุชัย สุเทพารักษ์

สาขาวิชาพิษวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญหาการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดยังคงเป็น ปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทย แม้ว่าในปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะลดจำนวนลง แต่เนื่องจากเป็นปัญหาที่เป็นเหตุฉุกเฉินและผู้ป่วย อาจเสียชีวิต หรือมีความพิการติดตัวหากได้รับการ รักษาที่ไม่ถูก ทำให้แพทย์ทั่วไปมีความกังวลเมื่อ ต้องรักษาผู้ป่วยที่มีปัญหานี้

บทความนี้ไม่ได้เจตนาจะเขียนให้เป็น guideline ของการดูแลผู้ป่วยที่ถูกงูกัด เนื่องจากได้มีการ เขียนไว้แล้ว แต่จะขอเน้นในเรื่องที่มีความเข้าใจไม่ ตรงกันหรือยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

งูพิษที่สำคัญในประเทศไทย

1. Neurotoxin producing snakes

- Cobras and spitting cobras (*Naja kaouthia* and *Naja siamensis*) งูเห่า และงูเห่าพิษ
- King cobra (KC, *Ophiophagus hannah*) งูจงอาง
- Banded krait (BK, *Bungarus fasciatus*) งูสามเหลี่ยม
- Malayan krait (MK, *Bungarus candidus*) งูทับสมิงคลา

2. Hematotoxin producing snakes

- Russell's viper (RV, *Daboia russelli siamensis*) งูแมวเซา
- Malayan pit viper (MPV, *Calloselasma rhodostoma*) งูกะปะ
- Green pit viper (GPV, *Trimeresurus spp.*) งูเขียวหางไหม้

3. Myotoxin producing snakes

- Sea snakes (*Hydrophinae spp.*, *Laticudinae spp.*) งูทะเล

4. Rear fanged snakes

- Mangrove snake (*Boiga dendrophila*) งูปล้องทอง, Keelback snake (*Rhabdophis subminiatus*) งูลายสาบคอแดง

งูพิษที่สำคัญทางการแพทย์ ยังคงเป็นงูที่มีพิษ ต่อระบบประสาท และงูที่มีพิษต่อระบบเลือด โดยที่ ผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดในประเทศไทย 70-80% เป็นงู กะปะและงูเขียวหางไหม้ โดยที่สาเหตุการตายมัก เกิดจากงูที่มีพิษต่อระบบประสาท ได้แก่ งูเห่า และงู ทับสมิงคลา

Tourniquet

การทำ tourniquet ที่ทำกันมานานในการ รักษาผู้ป่วยที่ถูกงูกัด ทั้งๆ ที่ไม่มีข้อมูลยืนยันถึง ประโยชน์ที่ได้รับ แต่ในทางกลับกันมีการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วยที่ถูกงูแมวเซา¹ และงู *Crotalus spp.*² กัดซึ่งเป็นงูที่มีพิษต่อระบบเลือด เมื่อได้รับการปฐมพยาบาลด้วยการทำ tourniquet ไม่ได้ประโยชน์ต่อการ รักษา และยังมีการศึกษาพบว่าการทำ tourniquet ยังทำให้ผลการรักษาเลวลง หรือมีการเสียชีวิตใน ผู้ป่วยที่ถูกงูพิษในกลุ่มนี้กัด³

ในทางตรงกันข้าม แม้ไม่มีรายงานยืนยันถึง ประโยชน์การทำ tourniquet ในผู้ป่วยที่ถูกงูพิษต่อ ระบบประสาทกัด แต่มีรายงานการเกิด sudden ventilatory failure และอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง

เป็นมากขึ้น หลังการคลาย tourniquet ในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่าฟิลิปปินส์ (*Naja philippinensis*) กัด⁴

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลข้างเคียงอันเกิดจากการทำ tourniquet โดยไม่มีประสบการณ์ซึ่งอาจจะรุนแรงได้ กับประโยชน์ที่ยังไม่แน่ชัดของการทำ tourniquet จึงไม่แนะนำให้ทำ tourniquet ในผู้ป่วยที่ถูกงูกัดทุกราย

Pressure immobilization

Pressure immobilization คือการ immobilization ผู้ป่วยพร้อมกับการรัดให้แน่น นิยมทำโดยใช้ elastic bandage ร่วมกับ splint แต่สามารถใช้สิ่งของอื่นทดแทนได้ โดยหลักการแล้วจะคล้ายคลึงกับการทำ splinting ในผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีกระดูกหัก แต่ต้องรัดแน่นกว่ามาก จากการศึกษาในอาสาสมัครใช้ต้องแรงดัน 40-70 มม.ปรอท เมื่อใช้กับแขน และ 55-70 มม.ปรอทเมื่อใช้กับขา⁵

ในการศึกษากับสัตว์พบว่าวิธีการนี้มีประโยชน์และในบางประเทศ เช่น ประเทศออสเตรเลีย ได้แนะนำวิธีการนี้เป็นการปฐมพยาบาลสำหรับผู้ป่วยที่ถูกงูกัด ซึ่งยังเป็นข้อถกเถียง เพราะยังไม่มีการศึกษาถึงวิธีการทำที่เป็นมาตรฐาน⁶ เช่น ขนาดของ bandage ความแน่นของการรัด และมีการศึกษาพบว่า ผู้ปฐมพยาบาลที่ผ่านการอบรมก็ไม่สามารถปฏิบัติวิธีการนี้ได้อย่างถูกต้อง⁷

สำหรับในประเทศไทย วิธีการนี้ยังไม่ค่อยแพร่หลาย และในการทำโดยผู้ไม่มีประสบการณ์อาจจะทำให้เกิดผลเสีย จึงแนะนำให้ทำเฉพาะในผู้ที่เคยมีประสบการณ์เท่านั้น

การปฐมพยาบาลอื่นๆ

การใช้สมุนไพรมาพอก งู ทา เพื่อรักษาการถูกงูพิษกัด ไม่พบว่าได้ประโยชน์ในทางคลินิก แม้ว่าสมุนไพรเหล่านั้นบางชนิด มีผลยับยั้งฤทธิ์ของพิษงูได้

บ้างในหลอดทดลอง ทั้งนี้เพราะการ apply ด้วยการพอก งู ทา ไม่มีผลทาง systemic ที่เพียงพอ

การกรีด ดูด จี้ด้วยไฟฟ้า หรือความร้อน ไม่สามารถยับยั้งการดูดซึมของพิษงูได้ และทำให้มีผลเสียต่อการรักษา

มีแนวคิดที่จะใช้สารที่มีฤทธิ์ proteolysis ฉีดรอบแผลที่ถูกงูกัด เพื่อ neutralize พิษงู แต่ยังไม่มีการศึกษาทางคลินิกที่ดีพอ

บาดแผลจากงูพิษกัด

ในน้ำพิษของงูจะมีสารจำพวก hyaluronidase, phospholipase A₂ และเอนไซม์อีกหลายชนิด ดังนั้นในการที่ถูกงูพิษกัด และปล่อยน้ำพิษเข้าสู่บาดแผลย่อมทำให้แผลนั้นมีการอักเสบไม่มากนักน้อย ดังนั้นเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด แต่แผลไม่มีอาการอักเสบใดเลย น่าจะเชื่อได้ว่า งูที่กัดไม่ได้ปล่อยน้ำพิษ

งูพิษที่สำคัญในประเทศไทยที่ทำให้เสียชีวิตได้แก่ งูทับสมิงคลา และงูสามเหลี่ยม ซึ่งบาดแผลจะไม่มีอาการอักเสบ หรืออักเสบน้อยมาก ดังนั้นการดูบาดแผลอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะตัดสินใจได้ว่า ผู้ป่วยไม่ได้ถูกงูพิษกัด หรือไม่มี systemic envenomation

Serodiagnosis

แพทย์ได้ใช้อาการ และอาการแสดงทางคลินิก ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น เป็นหลักในการวินิจฉัยการถูกงูพิษกัด รวมทั้งชนิดของงูพิษมาโดยตลอด ซึ่งมีความแม่นยำในระดับหนึ่ง แต่ในผู้ป่วยบางรายมีความไม่แน่ชัดทางคลินิก แพทย์มักต้องการการยืนยัน โดยอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาระดับพิษงูในเลือด^{8,9}

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย สามารถตรวจหาระดับพิษงูในเลือดได้^{10,11} โดยทำในงูพิษที่มีความสำคัญและพบบ่อย ได้แก่ งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม งูทับสมิงคลา งูแมวเซา งูกะปะ และงูเขียวหางไหม้เขียว

อ่อน (*Trimeresurus albolabris*) แม้ว่าจะยังไม่ได้เปิดบริการทั่วไป แต่แพทย์และสถานพยาบาลสามารถติดต่อเพื่อขอส่งตรวจได้ แต่การรายงานผลจะใช้เวลานาน

การทำ serodiagnosis โดยทำเป็น rapid test จะมีประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด จึงมีการพิจารณาและดำเนินงานมานาน แต่ยังไม่เป็นที่สำเร็จ เนื่องจากมีปัญหาด้าน specificity และความไม่เสถียรของวัสดุที่ใช้

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะมีประโยชน์ในกรณีที่ผู้ป่วยถูกงูที่มีพิษต่อระบบเลือดกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจ CBC, platelet count และ venous clotting time ซึ่งมีผลต่อการวินิจฉัย การวินิจฉัยแยกชนิดของงู¹² และการบอกความรุนแรง นอกจาก venous clotting time แล้ว การตรวจ thrombin time และ 20-minute whole blood clotting test ต่างก็มีความสัมพันธ์กับระดับของ fibrinogen ในเลือด การตรวจ 20-minute whole blood clotting time สามารถนำใช้แทน venous clotting time ได้¹³ และสามารถกระทำได้ง่ายกว่า ส่วน thrombin time นั้นทำได้ในสถานพยาบาลระดับสูงเท่านั้น

โดยทั่วไปการตรวจ prothrombin time มักจะมีความไวในสภาวะเลือดออกง่ายมากกว่า venous clotting time แต่ในกรณีที่ถูกงูพิษกัด พบว่ากลับมีความไวน้อยกว่า จึงไม่มีความจำเป็นต้องตรวจ prothrombin time

งูแมวเซาหรืองูในกลุ่ม viperinae มีพิษากสภาพการเป็นพิษแตกต่างจากงูกะปะ และงูเห่าหางไหม้หรืองูในกลุ่ม crotalinae โดยที่พิษของงูแมวเซา

สามารถทำให้เกิด Disseminated intravascular coagulation (DIC) ได้ จึงอาจตรวจพบ microangiopathic hemolytic red blood cells ได้ แต่การใช้ d-dimer ซึ่งพบได้ในภาวะ DIC ยังไม่มีข้อมูลที่ดีพอที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยแยกการถูกงูแมวเซากัด จากงูพิษชนิดอื่น แต่การตรวจพบ abnormal renal function สามารถช่วยในการวินิจฉัยได้¹⁴

Antivenoms

การให้ antivenom เป็นการรักษาที่สำคัญของการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัด แม้ว่าจะยังไม่มี clinical trials แต่ก็ยังมีข้อถกเถียงหลายประการ

ข้อบ่งชี้

ข้อบ่งชี้ของการให้ antivenom ในงูที่มีพิษต่อระบบประสาท แม้ว่าจะเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า ไม่จำเป็นต้องให้ทุกราย เพราะงูพิษในกลุ่มนี้บางครั้งจะกัดโดยไม่ได้ปล่อยน้ำพิษ จึงจะให้ก็ต่อเมื่อมีอาการทางประสาทเท่านั้น แต่ไม่ต้องรอจึงเกิด respiratory failure^{15,16} อย่างไรก็ตามในกรณีของงูทับสมิงคลานั้นพบว่าพิษของงูเป็น irreversible pre-synaptic blockade ดังนั้นการให้ antivenom ตั้งแต่ยังไม่มีอาการจะได้ประโยชน์มากกว่า แต่ยังไม่มีความการศึกษาทางคลินิกมาสนับสนุน

ในกรณีของงูเห่าและงูจงอาง ยังมีปัญหาเรื่องของขนาดผลที่มักจะมี necrosis หลังถูกกัด ซึ่งพบว่าใน antivenom ที่ผลิตโดยสภากาชาดไทย มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลายเนื้อเยื่อของพิษงู แต่เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง และเป็นการให้พิษงูพร้อมกับ antivenom ซึ่งเป็นไปไม่ได้ในทางปฏิบัติ ดังนั้นโดยทางทฤษฎี การให้ antivenom ในผู้ป่วยที่ถูกงูเห่า หรืองูจงอางกัดโดยเร็วที่สุด น่าจะลดความรุนแรงของบาดแผลเนื้อตายได้ แต่

ยังไม่มีการศึกษาที่ดีพอ รวมทั้งการให้ยาทางหลอดเลือดดำอาจไม่ใช่วิธีการบริหารยาที่เหมาะสมในกรณีนี้

ข้อบ่งชี้ของการให้ antivenom ในงูที่มีพิษต่อระบบเลือด ได้แก่ข้อใดข้อหนึ่งในต่อไปนี้¹⁷

- prolonged venous clotting time
- systemic bleeding
- severe thrombocytopenia
- impending compartment syndrome

แต่สำหรับการป้องกันหรือการลดความรุนแรงของภาวะ acute renal failure ของพิษงูแมวเซายังไม่มีการศึกษาที่ดีพอในประเทศไทย สำหรับข้อมูลจากประเทศพม่าซึ่งมีงูพิษชนิดนี้ชุกชุม ก็ใช้แนวทางเดียวกับแนวทางปัจจุบันของประเทศไทย

Monospecific VS Polyvalent antivenom

สถานเสาวภา สภากาชาดไทยได้ผลิต mono-specific F(ab)₂ antivenoms สำหรับ งูเห่า (ใช้กับงูเห่าพันพิษได้), งูจงอาง, งูสามเหลี่ยม, งูทับสมิงคลา, งูแมวเซา, งูกะปะ และงูเขียวหางไหม้ (เฉพาะ *Trimeresurus albolabris*) ซึ่งได้ผลในการรักษาดี¹⁷⁻²⁰ แต่แพทย์จะต้องใช้ความสามารถทางคลินิก ในการแยกชนิดของงูพิษเพื่อตัดสินใจให้ antivenom ที่ตรงกับงูพิษ

เนื่องจากปัจจุบันสภากาชาดไทย สามารถผลิต polyvalent antivenom โดยผลิตได้ 2 ชนิด คือ antivenom ต่องูที่มีพิษต่อระบบประสาทรวม งูเห่า งูจงอาง งูสามเหลี่ยม และงูทับสมิงคลา และ antivenom ต่องูที่มีพิษต่อระบบเลือดรวม งูแมวเซา งูกะปะ และงูเขียวหางไหม้ (เฉพาะ *Trimeresurus albolabris*) ซึ่ง antivenom ทั้ง 2 ชนิดนี้เมื่อศึกษาในห้องทดลองถึง neutralizing effect ต่อพิษงูแต่ละ

ชนิดที่กล่าวมา พบว่าเทียบเท่ากับ หรือดีกว่า mono-specific antivenoms แม้ว่ายังไม่มีการศึกษาทางคลินิกขนาดใหญ่มาสนับสนุน แต่แนวโน้มในปัจจุบันในหลายประเทศ รวมทั้ง WHO แนะนำให้มีการใช้ polyvalent antivenoms¹³

การทำ Skin Test

Antivenom ผลิตมาจาก serum ของม้า ดังนั้นจึงมีโอกาสเกิด hypersensitivity reaction ในคนได้ ดังนั้นก่อนให้ทุกครั้ง ต้องถามประวัติผู้ป่วยเกี่ยวกับการแพ้ serum ของม้าเสมอ แต่การทำ skin test พบว่าไม่สามารถทำนาย hypersensitivity reaction ได้ มีการศึกษาพบว่าการทำ skin test มีระดับ sensitivity และ specificity ที่เพียงพอ ในการทำนาย severe hypersensitivity reaction ได้²¹ อีกทั้งเป็นการเสียเวลาโดยไม่จำเป็น และจะเกิดปัญหาต่อการตัดสินใจการรักษาในกรณีที่ให้ผลบวกลง จึงไม่แนะนำให้ทำ skin test แต่แนะนำให้แพทย์เฝ้าระวัง hypersensitivity reactions ในระหว่างการให้ antivenom เสมอแทน

Dose

การแนะนำ dose ของ antivenoms ชนิดต่าง ๆ แม้ยังไม่มีการศึกษาทางคลินิกขนาดใหญ่ แต่มีการศึกษาทางคลินิกมาสนับสนุนบ้าง

ปัจจุบันได้แนะนำให้ antivenom 10 vial ในการรักษาพิษจากงูเห่า และให้ 5 vials ในการรักษาพิษจากงูอื่นๆ ที่มีพิษต่อระบบประสาท

ส่วนงูที่มีพิษต่อระบบเลือด แนะนำให้ 3 - 5 vials โดยที่มีการศึกษาในงูเขียวหางไหม้ที่ใช้ 3 vials

ได้มีการศึกษาปริมาณพิษของงูที่ปล่อยออกมาต่อการฉกกัด 1 ครั้ง ซึ่งเมื่อนำมาพิจารณาความสามารถในการ neutralize พิษของ antivenom แต่ละชนิด ก็พบว่า dose ที่แนะนำตามแนวทางปัจจุบัน

น่าจะได้ประโยชน์

Tetanus prophylaxis

บาดแผลงัด ก็เหมือนบาดแผลจากสัตว์กัดทั่วไป คือสามารถติดเชื้อบาดทะยักได้ แม้ในผู้ป่วยที่ถูกงูพิษกัดจะไม่ค่อยพบการเป็นบาดทะยัก แต่มีรายงานผู้ป่วยจากทั้งในประเทศไทย²² และต่างประเทศ²³ ว่ามีผู้ป่วยเป็นบาดทะยักจากการถูกงูพิษกัด ดังนั้นการป้องกันบาดทะยักจึงเป็นสิ่งจำเป็น แต่การฉีด tetanus antitoxin เข้ากล้ามเนื้อยังเป็นข้อห้ามในผู้ป่วยที่ถูกงูที่มีพิษต่อระบบเลือด ดังนั้นจะฉีดยานี้ก็ต่อเมื่อผู้ป่วยมี hemostasis ในระดับเพียงพอ

เอกสารอ้างอิง

1. Tun-Pe , Tin-Nu-Swe , Myint-Lwin , *et al.* The efficacy of tourniquets as a first-aid measure for Russell's viper bites in Burma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 403-5.
2. Amaral CF, Campolina D, Dias MB, *et al.* Tourniquet ineffectiveness to reduce the severity of envenoming after *Crotalus durissus* snake bite in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Toxicon* 1998; 36: 805-8.
3. Pugh RN, Theakston RD. Fatality following use of a tourniquet after viper bite envenoming. *Ann Trop Med Parasitol* 1987; 81: 77-8.
4. Watt G, Padre L, Tuazon ML, *et al.* Tourniquet application after cobra bite: delay in the onset of neurotoxicity and the dangers of sudden release. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 618-22.
5. Howarth DM, Southee AE, Whyte IM. Lymphatic flow rates and first-aid in simulated peripheral snake or spider envenomation. *Med J Aust* 1994; 161: 695-700.
6. Currie BJ. Treatment of snakebite in Australia: the current evidence base and questions requiring collaborative multicentre prospective studies. *Toxicon* 2006; 48: 941-56.
7. Norris RL, Ngo J, Nolan K, *et al.* Physicians and lay people are unable to apply pressure immobilization properly in a simulated snakebite scenario. *Wilderness Environ Med* 2005; 16: 16-21.
8. Theakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. Micro-ELISA for detection and assaying snake venom and venom-antibody. *Lancet* 1977; ii: 639-41.
9. Ho M, Warrell DA, Looareesuwan S, *et al.* Clinical significance of venom antigen levels in patients envenomed by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 579-87.
10. Rungsiwongse J, Ratanabanangkoon K. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom. *J Immunol Methods* 1991; 136: 37-43.
11. Ratanabanangkoon K, Billings PB, Matangkasombut P. Immunodiagnosis of snake

- venom poisoning. *Asian Pacific J Allerg Immunol* 1987; 5: 187-90.
12. Mahasandana S, Rungruxsirivorn Y, Chantarangkul V. Clinical patterns of bleeding following Russell's viper and green pit viper bites in adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1979; 10: 251-4.
13. WHO/SEARO Guidelines for the clinical management of snake bites in the South-east Asian region. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30 Suppl1: 1-85.
14. Tin-Nu-Swe, Tin-Tun, Myint-Lwin, *et al.* Renal ischaemia, transient glomerular leak and acute renal tubular damage in patients envenomed by Russell's vipers (*Daboia russelii siamensis*) in Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 678-81.
15. Limthongkul S, Pochanugool C, Benyajati C, *et al.* Respiratory muscle fatigue in cobra-bite treated patients. *J Med Assoc Thai* 1987; 70: 626-30.
16. Pochanugool C, Limthongkul S, Wilde H. Management of Thai cobra bites with a single bolus of antivenin. *Wilderness Environ Med* 1997; 8: 20-3.
17. Karnchanachetanee C, Hanvivatvong O, Mahasandana S. Monospecific antivenin therapy in Russell's viper bite. *J Med Assoc Thai* 1994; 77: 293-7.
18. Rojnuckarin P, Mahasandana S, Intragumthornchai T, *et al.* Moderate to severe cases of green pit viper bites in Chulalongkorn Hospital. *Thai J Hematol Transfusion Med* 1996; 6: 199-205.
19. Wongwanich R, Yoksarn P. The management of Malayan pit viper snake bite. *Bull Dep Med Serv* 1985; 10: 783-8.
20. Warrell DA, Looareesuwan S, Theakston DG, *et al.* Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 1235-47.
21. Thiansookon A, Rojnuckarin P. Low incidence of early reactions to horse-derived F(ab')(2) antivenom for snakebites in Thailand. *Acta Trop* 2008; 105: 203-5.
22. Suankratay C, Wilde H, Nunthapisud P, *et al.* Tetanus after white-lipped green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) bite. *Wilderness Environ Med* 2002; 13: 256-61.
23. Habib AG. Tetanus complicating snakebite in northern Nigeria: clinical presentation and public health implications. *Acta Trop* 2003; 85: 87-91.

ปัญหาความปลอดภัยของอาหารที่อุบัติใหม่

รองศาสตราจารย์ ดร. ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต

สถาบันโภชนาการ และสถาบันคลังสมองของชาติ

ปัญหาความปลอดภัยด้านอาหาร (Food Safety) เป็นปัญหาที่สำคัญในทุกประเทศทั่วโลก ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้ว ประเทศกำลังพัฒนา และประเทศที่พัฒนาน้อย ความไม่ปลอดภัยของอาหารสามารถเกิดขึ้นได้ทุกจุดในห่วงโซ่ หรือเส้นทางอาหาร ก่อนถึงปากผู้บริโภค ตั้งแต่การผลิตด้านการเกษตรที่มีการใช้สารเคมี และสารพิษกันมากและตกค้างในผักและผลไม้ในปริมาณมากที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ในขั้นตอนการเก็บรักษาและการขนส่งก็เป็นปัญหาสำคัญที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ตลอดเวลาถ้าไม่ดูแลอาหารให้ดี ในขั้นตอนการแปรรูปอาหารทั้งในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ขนาดกลาง ขนาดย่อม และการแปรรูปในชุมชน มีการใช้สารเคมีชนิดต่างๆ ที่จะทำให้อาหารเก็บได้นานๆ มีสีสวยงามรสชาติดี แต่ผู้แปรรูปอาจยอเยยไม่ค่อยมีความรู้ในการใช้ มีการใช้มากเกินไปจนกำหนดทำให้ผู้บริโภคเสี่ยงอันตราย บางครั้งมีการใช้มากกว่าที่กฎหมายกำหนดเป็นตั้งแต่เกินเล็กน้อยถึงเกินเป็นร้อยๆ เท่า ในขั้นตอนการปรุงอาหารทั้งที่แหล่งขาย และที่บ้านอาจเกิดสารอันตรายสูงได้ เช่น การปิ้งย่างไฟแรง โดยเฉพาะการปรุงอาหารในที่สาธารณะ ริมน้ำ ที่ชุมชน รถเข็นหาบเร่ ในขั้นตอนการบริการขายอาหารก็ยังมีความเสี่ยงได้ เช่น การล้างไม่สะอาด การหันของดิบและของสุกบนเขียงและมีดอันเดียวกัน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีความเสี่ยงอันตรายที่จะอุบัติขึ้นใหม่โดยบางครั้งไม่เคยพบมาก่อนเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น

1. ปัญหาที่เกี่ยวข้องเนื่องมาจากภาวะโลกร้อน

ปัจจุบันภาวะโลกร้อนเนื่องมาจากการเผาผลาญพลังงานและขยะ ปล่อยกก๊าซเรือนกระจก มีผลให้โลกร้อนมากขึ้นทุกปี ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลก ภาวะโลกร้อนขึ้น ฝนตกน้ำท่วม ฝนแล้ง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านต่างๆ รวมถึงก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยด้านอาหารด้วย

1.1 จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเมื่ออุณหภูมิของน้ำทะเลสูงขึ้น อาหารทะเลบางอย่างมีการสะสมสารพิษตั้งแต่การสะสมในแพลงตอน ปลาเล็กมากินแพลงตอน และปลาใหญ่กินปลาเล็ก ทำให้เกิดการสะสมสารพิษในปลาชนิดต่างๆ ได้ และก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษในประชากรของโลกได้เพราะปกติอาหารเป็นพิษนี้เกิดในแถบแปซิฟิกใต้ แคริเบียน และอินเดีย แต่ปัจจุบันเริ่มระบาดในเอเชีย ยุโรป และสหรัฐอเมริกาแล้ว

1.2 เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการกลายพันธุ์ของเชื้อโรคต่างๆ และมีแนวโน้มจะมีความรุนแรงมากขึ้น เช่น ไข้หวัด เกิดกลายพันธุ์เป็นไข้หวัดนกสามารถติดถึงคนได้ถ้าสัมผัสโดยตรง ไข้หวัดหมู มีการผสมกับไข้หวัดใหญ่ และอาจร่วมกับไข้หวัดนกจนกลายเป็นไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ที่กลั้วกันทั่วโลกในขณะนี้ อาจเนื่องจากอุณหภูมิโลกที่สูงขึ้นทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เร็วขึ้น และอาจจะเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายขึ้น

1.3 การเคลื่อนย้ายของสารพิษจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง เช่น สารเคมีที่คงทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมนานๆ ได้แก่ สารในกลุ่มที่เรียกว่า POPs (Persistent Organic Pollutants) รวมถึงกลุ่มสารออร์แกนโนคลอรีนหรือจุลินทรีย์ที่ได้มีการกระจายตัว เคลื่อนตัวไปอยู่ในทั่วโลก ผีเสื้ออยู่ในน้ำแข็ง เมื่อโลกร้อนขึ้น น้ำแข็งละลาย ก็พาสารพิษไหลมาตามน้ำ เข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ และทำให้เกิดอาหารเป็นพิษรุนแรงได้ในอนาคต เชื้อโรคบางอย่างที่หายไปจากประเทศต่าง ๆ นานแล้ว เช่น โรคที่เกิดจากไวรัสบางชนิดอาจจะกลับมาระบาดใหม่ได้เมื่อน้ำแข็งละลาย และเกิดการแพร่กระจายไปในที่ต่างๆ แล้วฟื้นชีวิตขึ้นมาใหม่ได้ (อาจเหมือนในภาพยนตร์เรื่องจูราสิกรปาร์คที่มีผลก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงได้)

2. ปัญหาความปลอดภัยด้านอาหารที่เกิดจากการพัฒนาประเทศ

2.1 การปลอมแปลงอาหาร ปัจจุบันมีข่าวการปลอมปนอาหารเกิดขึ้นเสมอ และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอย่างรุนแรง เช่น เหตุการณ์ใหญ่ที่เกิดการปนสารเมลามีนในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ รวมถึงผลิตภัณฑ์นมผงเด็ก ทำให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินปัสสาวะอย่างรุนแรง และมีเด็กเสียชีวิตจากเรื่องนี้ โดยเฉพาะในประเทศจีน และยังแพร่กระจาย

ไปยังประเทศอื่นๆ อีกด้วย

2.2 ปัญหาการเกิดอาหารเป็นพิษจากการกินหน่อไม้ดิบ ซึ่งเกิดจากการได้รับพิษจากเชื้อ *Clostridium botulinum* ที่สามารถสร้างสารพิษโบทูลินัม (Botulinum toxin) ที่จังหวัดน่าน พบผู้ป่วยหลายร้อยคน แต่โชคดีที่สามารถรักษาได้ทัน ไม่มีคนเสียชีวิต แต่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นเงินจำนวนมาก และต้องขอความช่วยเหลือจากหลายประเทศ

3. สภาวะของการพัฒนาเทคโนโลยีของประเทศและโลก

ตัวอย่างที่พบในเร็วๆ นี้ เช่น ข่าวการปลอมไขในประเทศจีน ซึ่งมีการกระจายข่าวไปทั่ว รวมทั้งประเทศไทยด้วย ซึ่งเป็นเรื่องที่ไม่น่าจะเกิดขึ้น เป็นเพราะการนำเทคนิคที่เป็นความคิดแบบธุรกิจนำ ส่วนความเป็นอันตรายในสิ่งเหล่านี้ต้องเฝ้าระวังกันอย่างใกล้ชิด

ดังนั้นการมีระบบควบคุมดูแลความปลอดภัยด้านอาหารที่สมบูรณ์ ทันสมัย และดำเนินการอย่างต่อเนื่อง มีระบบการประเมินความเสี่ยง การจัดการความเสี่ยงของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการดูแลอาหารปลอดภัย และที่สำคัญยิ่งคือความรู้ และการมีส่วนร่วมของผู้บริโภค ร่วมกับทุกภาคส่วน

Detection of Urinary Kidney Injury Molecule-1 in a Chronic Cadmium Exposed Population, Mae Sot District, Tak Province

Amnart Panyamoon¹, Kowit Nambunmee², Muneko Nishijo³, Witaya Swaddiwudhipong⁴ and Werawan Rungyutthikarn^{1*}

¹ Division of Toxicology, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

² Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

³ Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan.

⁴ Department of Social Medicine, Mae Sot General Hospital, Tak Province, Thailand.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) has been found as an environmental pollutant in Mae Sot district, Tak province. Contaminated Cd in water and rice causes high risk of renal dysfunction among the inhabitants. In order to investigate the effect of Cd induced renal dysfunction, a kidney injury molecule-1 (KIM-1), a recently discovered biomarker for an early detection of renal tubular dysfunction, was measured using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Polyclonal goat anti-KIM-1, horseradish peroxidase labeled streptavidin and its specific substrate were used in the in-house ELISA technique. The method was validated and used to quantitate KIM-1 in the urine of 700 Mae Sot inhabitants in comparison to two conventional renal biomarkers; N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and β_2 -microglobulin (β_2 -MG). The results showed that KIM-1 standard concentrations provided good linearity ($r=0.998$) with limit of detection and quantitation at the concentrations of 33.20 pg/ml and 110.68 pg/ml, respectively. The coefficient variation (CV) for inter-day and intra-day precisions for 3 levels of KIM-1 (200, 800 and 3,000 pg/ml) were at 0.8, 1.2, and 2.1% CV and 0.7, 2.4, and 6.7% CV, respectively. The accuracy of the assay was found with 89-101% recovery. The average $\pm$ SD of the KIM-1 concentrations in urine samples of 700 Mae Sot inhabitants were at 1,347 $\pm$ 1,290 pg/gCr, ranged between 61-15,330 pg/gCr. Using Spearman's rho analysis, a strong positive correlation between KIM-1 and Cd concentrations ($r=0.234$, $P<0.001$) was found. The Cd was also correlated well with the NAG ($r=0.263$, $P<0.001$) and β_2 -MG ($r=0.179$, $P<0.001$). Prevalence of high excretion of renal biomarkers was shown in dose response relationship to Cd concentrations. This finding demonstrated that KIM-1 was a sensitive biomarker for detection of renal dysfunction in population with high Cd exposure.

Keywords: Kidney Injury Molecule-1, ELISA, cadmium, Mae sot, Thailand

* Corresponding author:

Assoc. Prof. Dr. Werawan Rungyutthikarn,
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand,
E-mail: wruangyu@med.cmu.ac.th

INTRODUCTION

The biomarkers for early detection of cadmium (Cd) induced renal dysfunction such as N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), albumin, α_1 - and β_2 -microglobulin had been investigated in several studies and found potentially correlated to Cd exposure.¹⁻⁵ Teeyakasem *et al.* also reported that NAG was an early biomarker which showed a positive correlation with the urinary Cd of Mae Sot inhabitants.⁶ However, quantitation of each biomarker had some limitation; therefore, kidney injury molecule-1 (KIM-1), an isoform of T-cell immunoglobulin (Ig) mucin and a type 1 transmembrane glycoprotein with an ectodomain containing an Ig-like mucin domain discovered in renal tubular epithelial cell was selected to use in this study. KIM-1 is undetectable in healthy kidneys, but the protein is abundantly expressed in proximal tubular cell after nephrotoxic injury and transcript levels for the gene that encodes KIM-1 are strongly upregulated in differentiated proximal tubule epithelial cells in the injured kidney.⁷

Han *et al.*⁸ demonstrated that a soluble released form of human KIM-1 could be detected in the urine of patients with renal failure and might serve as a biomarker for renal proximal tubule injury. Although KIM-1 is a good biomarker of nephrotoxic injury in animal models^{7, 9-11} and in human patients with renal disease,^{8, 12} the urinary KIM-1 in the population living in the contaminated area of Cd has never yet been studied. Therefore, this study was the first report of the potential effect of the KIM-1 on renal dysfunction in the urinary samples of people in Mae Sot district who exposed to Cd chronically from their staple food, mainly rice.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

The study population consisted of 700 inhabitants permanently living in Mae Sot district, Tak

province who had urinary Cd level greater than 5 $\mu\text{g/gCr}$ measured at our previous survey in 2004-2005.¹³ All subjects were advised of the aim and methods of the project before entering the survey. They consented to provide random morning urinary samples and were interviewed for information of demography and health. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

Collection of urine samples

Morning urine samples were collected in polyethylene bottles and immediately tested qualitatively for pH, protein, glucose, occult blood, urobilinogen and ketone body using paper indicator strips (Ames test, Bayer, Germany). Each urine sample was divided into three (3–5 ml) aliquots. In samples with $\text{pH} < 5$, the pH of one aliquot was adjusted to pH 6–8 by 0.5 N sodium hydroxide, to prevent degradation of β_2 -microglobulin. All urinary samples were stored at -20°C before analyses.

Determination of urinary cadmium

Urinary Cd concentrations were analyzed by graphite-furnace atomic absorption spectrometer (Shimadzu Model AAS-6300, Japan). Method validation of the analytical technique was performed and verified using certified standard reference material (The National Institute of Standards, Washington, DC).

Determination of urinary NAG, β_2 -MG and creatinine

The concentration of β_2 -MG was measured by an enzyme immunoassay (GLAZYME β_2 -microglobulin-EIA test kit, Sanyo Chemical Industries Ltd., Japan). The NAG level was determined by a colorimetric assay using an NAG test kit (Shionogi Pharmaceuticals, Japan). Creatinine was

measured by a method based on the Jaffe reaction.¹⁴ Concentrations of all urinary markers were adjusted per gram creatinine (gCr).

Development and validation of an ELISA for quantification of urinary KIM-1

An in-house ELISA was developed to quantify the specific urinary KIM-1. Capture antibody (goat anti-KIM-1) was bound to a microtiter plate to create the solid phase. Unbound antibody was removed by washing the plate and a blocking reagent was added. Following a wash, samples and standards were then incubated with capture antibody. After washing away, biotinylated goat anti-human KIM-1 detection antibody was added. Following a wash to remove unbound detection antibody, a detection reagent (streptavidin-horseradish peroxidase) was added. The plate was washed again before a substrate solution (TMB/hydrogen peroxide) was added and color developed in proportion to the amount of KIM-1. Color development was stopped and the intensity of the color was measured at 450 nm. The urinary KIM-1 concentration was calculated based on the standard curve and expressed in pg/ml. The ELISA technique was validated according to a current bioanalytical recommendation,^{15,16} for sensitivity, linearity, intra- and inter-days precisions, accuracy, stability, dilutional effect of the standard KIM-1 (R&D system, Minneapolis, MN) in the urinary sample. The ruggedness of the method was also validated by varying plate coating temperature, incubation time of antibody and urinary sample and number of plate wash.

Statistical analysis

Data analysis was undertaken using the SPSS version 11.5. Continuous variable regression was performed by Kruskal-Wallis test for a comparison between divided population more than two groups.

Correlations between Cd and renal injury biomarker concentrations were determined by Spearman's rho analysis. Statistical significance was expressed with *p* values less than 0.05.

RESULTS

Study subjects

Seven hundred people living in the Cd polluted area of Mae Sot district, Tak province included in this study comprised of 260 men and 440 women aged between 21-89 years old. No participant had occupational exposure to cadmium. All of them had no clinical symptoms related to Cd toxicity. However, on-site screening examination with urinary strips, 392 people (138 men, 181 women) had positive urinary protein. Two subjects showed positive urinary ketone and glucose. One hundred and five people had urinary pH equal to 5 or lower.

Development and validation of an ELISA technique for KIM-1 quantification

The calibration curve of standard KIM-1 concentrations showed good linearity (Figure 1) at a correlated coefficient (*r*) of 0.9983 with triplicated analyses. KIM-1 concentrations at 200, 800 and 3,000 pg/ml were determined as low, medium and high levels of the urinary KIM-1. The results were shown in Table 1 with 0.71 to 6.87%CV of the intra- and inter-day precisions. The limit of detection and quantification of the method were found at the concentrations of 32.20 and 110.68 pg/ml, respectively. The accuracy of the ELISA was shown in Table 2 with >90% recovery of 3 levels of the standard KIM-1 spiked in urine. Primary and secondary freeze-thaw cycles of the urine had slightly effects on the KIM-1 stability shown with >90% recovery. However, the tertiary and quaternary freeze thaw cycles had more

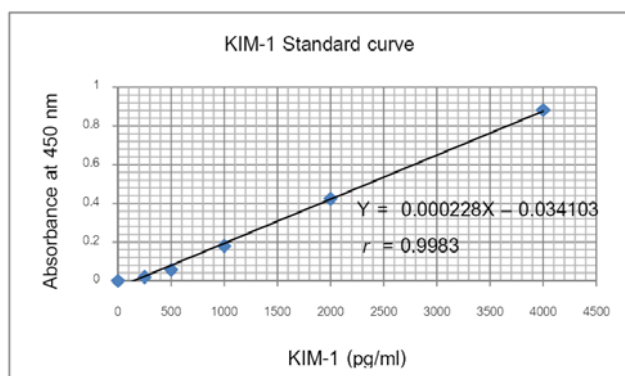


Figure 1 A calibration curve of standard KIM-1 concentrations at 0, 125, 250, 500, 1000, 2000, and 4000 pg/ml determined by the developed ELISA shows good linearity at a correlated coefficient (r) of 0.9983

effects on KIM-1 stability, although the recovery was >80% (Table 2). Storage urine at 4°C for 5 days showed slightly change of KIM-1 concentrations. According to the ruggedness of the method, developmental time of antibody and antigen reaction showed some changes on KIM-1 concentration, therefore, the method needs an exact time for reaction development. In contrast, incubation time, plate coating temperature and number of plate wash had no effect on KIM-1 concentration (data not shown).

Concentrations of Cd, KIM-1, NAG and β_2 -MG in the urine of Mae Sot's inhabitants

The average $\pm$ SD of the KIM-1 in 700 urinary samples of Mae Sot inhabitants was at $1,347.26 \pm 1,290.60$ pg/gCr, ranged between 61-15,330 pg/gCr which was a lot higher than the recommended value of normal people¹² (70-399 pg/gCr), whereas 342 (48.9%) subjects had KIM-1 concentrations more than cutoff level of 988 pg/gCr,¹² indicated an occurrence of renal injury. Average of urinary Cd was 8.20 ± 0.21 μ g/gCr, ranged between 0.83 - 42.41 μ g/gCr. However, 664 subjects (94.8%) had urinary Cd exceeded the WHO maximum tolerable value of 2 μ g/gCr.¹⁷ The conventional renal biomarkers; NAG and β_2 -MG were 7.00 ± 10.19 U/

Table 1 Precision and sensitivity of the developed ELISA technique in this study for KIM-1 quantification

Validation parameters	N	KIM-1 (pg/ml) (Mean ± SD)		%
		Expected	Observed	CV
Precision				
Intra-day Low	10	200	202 ± 14	6.87
Medium	10	800	799 ± 19	2.38
High	10	3000	2,968 ± 21	0.71
Inter-day Low	10	200	204 ± 40	2.14
Medium	10	800	807 ± 90	1.16
High	10	3000	2,999 ± 25	0.83
Sensitivity				
Limit of detection (LOD)			32.20 pg/ml	
Limit of quantitation (LOQ)			110.68 pg/ml	

Table 2 Accuracy, dilutional effect and stability of KIM-1 in the urine quantified by the ELISA

Validated parameters	N	% Recovery (Mean $\pm$ SD)
Accuracy		
Spiked urine level 1	5	91.29 $\pm$ 2.81
Spiked urine level 2	5	96.71 $\pm$ 1.68
Spiked urine level 3	5	99.25 $\pm$ 1.62
Dilutional effect		
Undiluted urine	5	100.00 $\pm$ 1.56
Diluted urine 1:2	5	99.31 $\pm$ 1.47
Diluted urine 1:4	5	101.03 $\pm$ 2.27
Diluted urine 1:8	5	104.72 $\pm$ 4.67
Stability of KIM-1 protein		
Freeze-thaw cycle		
1 st	5	98.94 $\pm$ 1.02
2 nd	5	91.67 $\pm$ 7.61
3 rd	5	85.14 $\pm$ 9.02
4 th	5	83.47 $\pm$ 7.41
Storage at 4°C		
Day 1	5	100.00
Day 2	5	98.68 $\pm$ 0.97
Day 3	5	98.25 $\pm$ 2.11
Day 4	5	95.78 $\pm$ 4.04
Day 5	5	94.33 $\pm$ 4.35

Table 3 Dose response relationship of the urinary Cd (4 levels) and renal dysfunction bio-markers; KIM-1, NAG and β_2 -MG concentrations of the chronic Cd exposure population

Group	Cadmium ($\mu\text{g/gCr}$)	N	KIM-1 (pg/gCr)	NAG (U/gCr)	β_2 -MG ($\mu\text{g/gCr}$)
1	< 2	36	811.50 $\pm$ 556.97	4.78 $\pm$ 2.74	375 $\pm$ 1,262
2	2 – 5	162	1,082.75 $\pm$ 851.88	5.76 $\pm$ 3.49	2,685 $\pm$ 9,880**
3	5 – 10	319	1,299.16 $\pm$ 1089.79**	6.18 $\pm$ 3.88**	2,917 $\pm$ 11,524**
4	>10	183	1,770.64 $\pm$ 1,824.43***	9.96 $\pm$ 18.66***	4,538 $\pm$ 14,078***
Total		700	1,347.26 $\pm$ 1,290.60	6.99 $\pm$ 10.19	3,156 $\pm$ 11,643

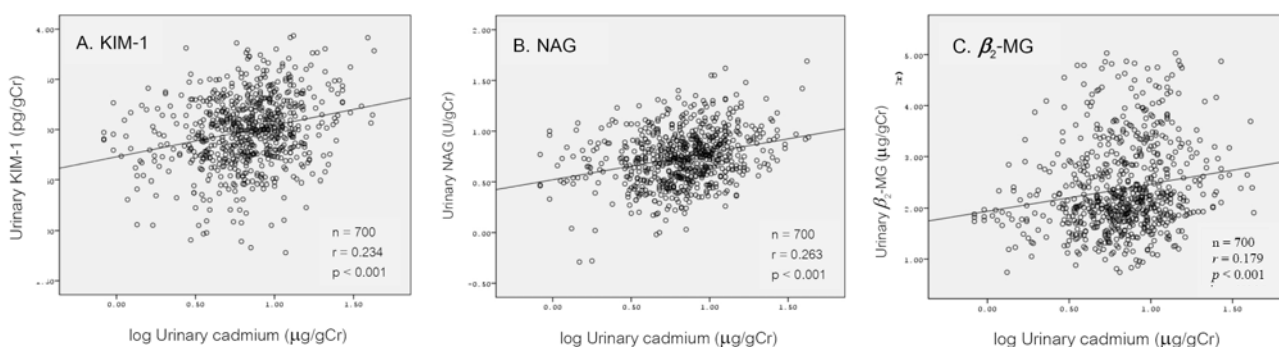
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, analyzed by Mann Whitney U test compared to the group that had urinary Cd concentrations below 2 $\mu\text{g/gCr}$

Table 4 Prevalence of renal tubular dysfunction (high excretion of renal marker over cutoff level) and urinary cadmium concentrations in chronic cadmium exposure population

Urinary Cd ($\mu\text{g/gCr}$)	N	Hyper KIM-1uria			Hyper NAGuria			Hyper β_2 -MGuria		
		-	+	% positive	-	+	% positive	-	+	% positive
< 2	36	27	9	25	32	4	11	34	2	6
2 – 5	162	94	68	42	129	33	20	134	28	17
5 – 10	319	153	166	52	253	66	21	253	66	21
> 10	183	71	112	61	105	78	43	129	54	30

Hyper KIM-1uria = urinary KIM-1 > 988 pg/gCr ,¹² HyperNAGuria = urinary NAG > 9 U/gCr ,⁶

Hyper β_2 -MGuria = urinary β_2 -MG > 1,000 $\mu\text{g/gCr}$ ⁶

**Figure 2** Positive correlation of the urinary Cd in 700 inhabitants who live in Cd polluted area, Mae Sot district, Tak province, and concentrations of renal dysfunction biomarkers; A) kidney injury molecule-1 (KIM-1), B) N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and C) β_2 -microglobulin (β_2 -MG), using Spearman's rho analysis

gCr (0.51-244.32 U/gCr) and $3,156 \pm 11,643$ $\mu\text{g/gCr}$ (5-107,883 $\mu\text{g/gCr}$), respectively. One hundred and eighty one subjects (25.9%) had NAG more than acceptable value of 9 U/gCr,^{6,17} while 150 subjects (21.4%) had β_2 -MG more than 1,000 $\mu\text{g/gCr}$.

Correlation between urinary Cd and KIM-1, NAG and β_2 -MG

Dose response relationship between urinary Cd and KIM-1, NAG and β_2 -MG were shown in Table 3 when the urinary Cd concentrations were grouped into four levels with Cd<2, 2-5, 5-10 and >10 $\mu\text{g/gCr}$. The urinary KIM-1 concentration increased significantly when the urinary Cd was ≥ 5 $\mu\text{g/gCr}$, shown with Spearman's rho correlation coefficient at 0.234 ($P<0.001$). Correlation coefficients between Cd and KIM-1, NAG and β_2 -MG; were at 0.234, 0.263 and 0.179 ($P<0.001$), respectively (Figure 2). Strong positive correlation of KIM-1 with NAG and β_2 -MG was also noticed with the Spearman's rho values of 0.392 and 0.307 ($P<0.001$), respectively (data not shown).

Prevalence of the renal dysfunction as the hyperKIM-1uria, hyperNAGuria and hyper β_2 -MGuria among the subjects were evaluated using cut off values for urinary KIM-1, NAG and β_2 -MG at 988.00 $\mu\text{g/gCr}$, 9.00 U/gCr and 1,000 $\mu\text{g/gCr}$, respectively. Table 4 displays the prevalence of renal dysfunction and Cd concentrations in which hyperKIM-1uria increased with an increase of urinary Cd more prominently than the hyperNAGuria and hyper β_2 -MGuria. This finding indicated that the urinary KIM-1 was a very sensitive biomarker for detection of the renal dysfunction in the population with high Cd exposure.

Discussion

The developed ELISA for quantitating urinary KIM-1 was highly sensitive, with LOD of 33.20 $\mu\text{g/ml}$ and LOQ of 110.68 $\mu\text{g/ml}$. There was no any urinary sample with KIM-1 concentration lower than the LOQ value. The assay accuracy was quite high with approximately 90% recovery. This result indicated that our developed ELISA technique gave a very high sensitivity and specificity for KIM-1 measurement in urine sample.

Three hundred and ninety two subjects out of 700 who had urinary screening test positive for protein were found in accordant with high urinary Cd and renal tubular biomarkers concentrations. In addition, 36 people who had been reported that their urinary Cd was over 5 $\mu\text{g/gCr}$ in our previous survey were found to have urinary Cd lower than 2 $\mu\text{g/gCr}$ in this survey and we used this population as our control group compared to other groups with high Cd levels. One hundred and eighty three subjects (62 men and 121 women) were found with very high urinary Cd >10 $\mu\text{g/gCr}$, indicated that their total Cd intake and/or Cd accumulation in the kidney were so high without any sign and symptoms of renal toxicity.

One of Mae Sot residents had urinary KIM-1 of 15,330 $\mu\text{g/gCr}$, suggested the existence of severe renal tubular dysfunction without awareness. This person was later referred for medical checkup and proper healthcare. The NAG was found correlated well with Cd concentrations but not with the β_2 -MG in accordant to previous finding that it was a sensitive indicator of Cd induced renal dysfunction better than β_2 -MG.¹⁷ However, the prevalence of the hyperNAGuria found in this study was less than hyperKIM-1uria indicated that KIM-1 was a better biomarker for investigation of

Cd-induced renal tubular dysfunction. This might be due to the urinary NAG was measured by colorimetric assay which NAG activity has been found to be inhibited by endogenous urea,¹⁸ besides the ELISA technique of KIM-1 was more specific than the colorimetric assay of NAG.

Among the urinary low molecular weight proteins, β_2 -MG has been reported as the most useful biomarker for investigation of renal tubular dysfunction.^{6,19} However, in this study, urinary β_2 -MG had wide ranges between 5 - 107,883 $\mu\text{g/gCr}$ with two women had β_2 -MG concentrations above 100,000 $\mu\text{g/gCr}$ along with high excretion of KIM-1 and NAG, suggesting that severe renal tubular dysfunction in the study subjects has occurred.

In conclusion, renal dysfunction in Mae Sot inhabitants who chronically exposed to Cd from their daily rice was found with high excretion of urinary proteins; KIM-1, NAG and β_2 -MG. The developed ELISA technique was highly sensitive to detect KIM-1 abnormal excretion.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks to all of the participants who live in Mae Sot district, Tak province for their kind cooperation. The staffs of Mae Sot General Hospital, especially Mrs. Pranee Mahasakpan were thankful for their help on the epidemiological survey and sample collection. All staffs at the Department of Public Health, Kanazawa Medical University were also thankful for their kind technical assistance on Cd analysis. This work was supported by the Faculty of Medicine Endowment Fund, Faculty of Medicine, Chiang Mai University and Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan.

REFERENCES

1. Jung K, Pergande M, Graubau HJ, *et al.* Urine proteins and enzymes as early indicators of renal dysfunction in chronic exposure to cadmium. *Clin Chem* 1993; 39: 757-65.
2. Kawada T. Indicators of renal effects of exposure to cadmium; N-acetyl- β -D-glucosaminidase and others. *Sangyo Eiseigaku Zasshi* 1995; 37: 69-73.
3. Jin T, Nordberg G, Wu X, *et al.* Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzyme as biomarker of renal dysfunction caused by cadmium in a general population. *Environ Res* 1999; 81: 167-73.
4. Jin T, Nordberg M, Dumont X, *et al.* Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposure to cadmium from smelting in China. *Biomaterials* 2002; 15: 397-410.
5. Moriguchi J, Ezaki T, Tsukahara T, *et al.* Comparative evaluation of four urinary tubular dysfunction markers, with special references to the effects of aging and correction for creatinine concentration. *Toxico Lett* 2003; 143: 279-90.
6. Teeyakasem W, Nishijo M, Honda R, *et al.* Monitoring of cadmium toxicity in a Thai population with high-level environmental exposure. *Toxico Lett* 2007; 169: 185-95
7. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, *et al.* Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998; 273: 4135-42.
8. Han WK, Bailly V, Abichandani R, *et al.* Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62: 237-44.
9. Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, *et al.* Expression of kidney injury molecule-1 (KIM-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal

- tubule injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 306-14
10. Vaidya VS, Vamirez V, Ichimura T, *et al.* Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F517-29.
11. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP, *et al.* Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury and chromium. *Toxicol Sci* 2008; 101: 159-70.
12. Shalini C, Farmer T, Kapke GF. Assay validation for KIM-1: human urinary renal dysfunction biomarker. *Int J of Biol Sci* 2009; 5: 128-34.
13. Swaddiwudhipong W, Limpatanachote P, Mahasakpan P, *et al.* Cadmium-exposed population in Mae Sot District, Tak Province: 1. prevalence of high urinary cadmium levels in the adult. *J Med Assoc Thai* 2007; 90: 143-8.
14. Lauhachinda B and Heuseugcharearn A. Clinical chemistry laboratory manual. 3rd ed. Chiang Mai: Nopburi Printing Company, 1998: 173-82.
15. FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001. Available at <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance-ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf.html>, accessed Nov 1, 2009.
16. DeSilva B, Smith W, Weiner R. *et al.* Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res* 2003; 20: 1885-900.
17. WHO/IPCS. Cadmium. Environmental Health Criteria Document 134, IPCS. WHO, Geneva, 1992.
18. Bondiou MT, Bourbouze R, Bernard M. *et al.* Inhibition of A and B *N*-acetyl- β -d-glucosaminidase urinary isoenzymes by urea. *Clin Chim Acta* 1985;149: 67-73.
19. Nordberg GF, Nordberg M. Biological monitoring of cadmium. In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR, eds. *Biological Monitoring of Toxic Metals*. New York: Plenum Publishing, 1988: 151-68.

การตรวจหาคิตินีนจรีโมเลกุล-1 ในปัสสาวะของประชากรที่มีการสัมผัสแคดเมียมแบบเรื้อรัง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

อำนาจ ปัญญามูล¹, โกวิท นามบุญมี², Nishijo Muneko³, วิทยา สวัสดิ์วุฒิพงศ์⁴
และวีระวรรณ เรืองยุทธิกการณ^{1*}

¹ ภาควิชานิติเวชศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, จังหวัดเชียงใหม่, ประเทศไทย

² นักศึกษาวิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, จังหวัดเชียงใหม่, ประเทศไทย

³ Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kanazawa Medical University, Ishikawa, JAPAN

⁴ กลุ่มงานเวชศาสตร์สังคม, โรงพยาบาลแม่สอด, จังหวัดตาก, ประเทศไทย

บทคัดย่อ

แคดเมียมเป็นมลสารที่พบในสิ่งแวดล้อมอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก การปนเปื้อนในน้ำและข้าวเป็นสาเหตุให้ประชากรที่อาศัยในพื้นที่มีความเสี่ยงสูงต่อภาวะไตทำงานผิดปกติ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบประชากรกลุ่มนี้ว่ามีไตทำงานผิดปกติหรือไม่โดยใช้สารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ค้นพบว่าสามารถใช้บ่งชี้ภาวะไตทำงานผิดปกติระยะเริ่มต้นได้คือ คิตินีนจรีโมเลกุล-1 (KIM-1) ด้วยเทคนิค enzyme linked immunoassay (ELISA) โดยใช้ polyclonal goat anti-KIM-1 และ horseradish peroxidase labeled streptavidin ร่วมกับการใช้สับสเตรทที่จำเพาะ ทั้งนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์พร้อมทั้งประเมินพารามิเตอร์ต่างๆ ให้เหมาะสม และนำไปตรวจวัดปริมาณ KIM-1 ในปัสสาวะของประชากรที่อาศัยในอำเภอแม่สอด จำนวน 700 ราย เปรียบเทียบกับสารบ่งชี้ภาวะไตทำงานผิดปกติที่ใช้กันเป็นประจำอีก 2 ชนิดคือ N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) และ β_2 -microglobulin (β_2 -MG) ผลการศึกษาพบว่า กราฟมาตรฐานของ KIM-1 ให้ค่าความเป็นเส้นตรง ($r=0.998$) มีค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 33.20 และ 110.68 pg/ml ตามลำดับ ค่าความแม่นยำในการทดสอบปริมาณ KIM-1 ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (200, 800 และ 3,000 pg/ml) เท่ากับ 0.8, 1.2, 2.1% CV และ 0.7, 2.4, 6.7% CV ตามลำดับ ค่าความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์แสดงเป็นค่า % recovery ได้ค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 89-101 ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของ KIM-1 ในปัสสาวะของประชากรจำนวน 700 คนที่อาศัยในอำเภอแม่สอดคือ $1,347 \pm 1,290$ pg/gCr, มีค่าอยู่ระหว่าง 61 - 15,330 pg/gCr เมื่อวิเคราะห์ด้วย Spearman's rho พบว่าปริมาณ KIM-1 กับแคดเมียมมีความสัมพันธ์เชิงบวก ($r=0.234$, $P<0.001$) เช่นเดียวกับ NAG ($r=0.263$, $P<0.001$) และ β_2 -MG ($r=0.179$, $P<0.001$) ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับแคดเมียม นอกจากนี้พบว่าการขับออกของ renal biomarkers ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณแคดเมียมในปัสสาวะด้วย ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า KIM-1 เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ไวมากต่อการตรวจหาภาวะไตทำงานผิดปกติในประชากรที่มีการสัมผัสแคดเมียมปริมาณสูง

คำสำคัญ : Kidney Injury Molecule-1, ELISA, แคดเมียม, แม่สอด, ประเทศไทย

Effects of Bran Extracts from Thai Molecular Breeding Rices on Growth and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells

**Supanart Srisala¹, Rodjana Chunhabundit^{2*}, Ratchanee Kongkachuichai³,
Bunyada Jittorntrum¹ and Yupin Visetpanit²**

¹ Nutrition Program, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital and Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

² Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³ Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Rice bran, the outer layer of brown rice, contains biologically active compounds which mediate chemopreventive properties. Thus, in the present study, we evaluated the anti-carcinogenic effects of bran extracts from non-pigmented (Sinlek) and pigmented (Riceberry) rices on human promyelocytic leukemia cell line (HL-60 cells). The results showed that the treatment with rice bran extracts for 24 and 72 hours reduced cell viability in a dose- and time-dependent manner. Riceberry rice bran extract showed higher cytotoxic activity, corresponding with the lower IC₅₀ compared to Sinlek variety. The low concentrations of both rice bran extracts which did not affect cell viability were able to inhibit DNA synthesis, whereas the higher selected concentrations that reduced viable cells could induced apoptosis. The apoptotic events were confirmed by chromatin condensation and nuclear fragmentation in cells after AO/EB nuclear staining as well as dose- and time- dependent increase of caspase activity. The findings suggested that bran extracts of new Thai rice varieties exhibited growth inhibitory effects on the human leukemia cells through cytostatic and cytotoxic mechanism. The results also indicated that killing leukemia cells by rice bran extracts partially involved activation of caspases and induction of apoptosis

Keywords: Rice bran; human leukemia cells; cytotoxicity; cytostatic; apoptosis

* Corresponding author:

Rodjana Chunhabundit

Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital

Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

E-mail: rarch@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Cancer is one of the leading causes of death in the world, particularly in developing countries. In Thailand, cancer is one of the major public health problems and the number of new cancer cases of all sites increases from 81,000 in 1999 to approximately 125,000 by the year 2008.¹ Leukemia is the most common hematological malignancy and most common malignancies in Thai children.²

The risk factors of cancer are well established through the non-modifiable risk factors (age and heredity) and modifiable risk factor such as unhealthy diet, excessive energy intake, physical inactivity and tobacco use. Nutritional factor has been associated with the modifiable factor that presumed to account for approximately 35% of cancer deaths.³ Higher consumption of fruits, vegetables as well as whole grains have been associated with reduces risks of numerous cancers.⁴ These foods contain many biologically active chemicals, including nutrients and many nonnutritive constituents that have potential to reduce risk of developing of cancer.⁵ Nowadays, many considerable researches are focused on the identification of the mechanism of action of compounds from dietary sources especially plant-derived substances (phytochemicals), which might prevent or postpone the onset of cancer. Phytochemicals are defined as bioactive non-nutrient plant compounds. It can be classified as carotenoid, phenolics, alkaloids, nitrogen-containing compounds and organosulfur compounds.⁶ Phytochemicals have been reported to interfere with each stage of the carcinogenic process which include initiation, promotion and progression.⁷ *In vitro* cell culture and animal cancer models have been used to evaluate the chemopreventive effects of phytochemicals. Phytochemicals have complementary and overlapping mechanisms of action in preventing initiation and suppressing promotion and pro-

gression of cancer cells.⁸⁻¹¹ Recently, considerable attention has focused on the sequence of events referred to apoptosis and the role which these processes may involve the pathogenesis and treatment of human diseases including cancer.¹² Apoptosis or programmed cell death plays a major role in the development of multicellular organisms and maintaining homeostasis of constant cell numbers in normal mammalian tissues.¹³ Defects in apoptotic pathways are now thought to promote tumor formation, by allowing accumulation of neoplastic cells and by obstructing removal of genetic variants with enhanced malignant potential and promote tumor angiogenesis.¹⁴ Therefore, induction of apoptosis has been recognized as a chemotherapeutic as well as a chemopreventive strategy for cancer control.

Rice, *Oryza sativa*, possesses special dietary importance in Asia. In Thailand, rice is not only the main staple crop but also a primary agricultural export. Rice bran is the outer layer of brown rice, obtained as a by-product of the rice milling industry. Nutrient analysis of rice bran indicates that it is a good source of protein, carbohydrate, unsaturated fatty acid, B-complex vitamins, vitamin E complex (tocopherols and tocotrienols), minerals, and dietary fiber. There are many evidences suggest that the bran layer rather than the rice kernel is the predominant location of biologically active constituents which are the chemopreventive and antitumor properties.¹⁵⁻¹⁷ The bioactives present in rice bran include γ -oryzanol, phytosterol, polyphenols, flavones and proanthocyanidin, inositol and inositol hexaphosphate (IP6).¹⁸ The phytochemical compounds of rice bran have been shown to have a wide range of biological activities, including anti-hyperlipidemia, anti-atherogenesis, anti-platelet aggregation and antioxidant property.¹⁹ Furthermore, rice bran constituents possess antimutagenic,¹⁵ antitumor promoting¹⁷, and

cytotoxic properties.²⁰

Rice is rich in genetic diversity, with a thousand of varieties throughout the world. Furthermore, the unmilled rice has many different colours, including brown, red, purple and black. These colorful rice varieties are prized for their health properties. Nowadays, scientific technologies have made it possible to enhance the nutritional value of rice through modifying the genetic code. In this study, defatted rice bran samples (Sinlek and Riceberry), were obtained from Rice Science Center & Rice Gene Discovery Unit, Kasetsart University, Thailand. Sinlek (white brown rice), that was crossed breeding from Khaw kamdoichang X Chao Hom Nil 313-19-1-1, is the best source of iron and good iron bioavailability. Riceberry (purple brown rice), derived from Khaw kamdoichang X Chao Hom Nil 1000-11-2-26, has high level of antioxidant activity, polyphenol content, and β -carotene. However, preclinical evidence for anti-carcinogenic properties of these new Thai rice cultivars has been limited. Therefore, this study was conducted to assess growth inhibitory effects of bran extracts from pigmented (Riceberry) and nonpigmented (Sinlek) rices in human promyelocytic leukemia cell lines (HL-60). Cell viability, DNA synthesis and apoptosis induction were determined in cell treated with rice bran extracts. The results from this study would shed some light as the knowledge bases that demonstrate the health-promoting of these rice cultivars and provide scientific evidence for future research.

MATERIALS AND METHODS

Rice bran extract

The bran of pigmented (Riceberry) and nonpigmented rice (Sinlek) rice varieties were obtained from Rice Science Center & Rice Gene Discovery Unit, Thailand. Rice bran (100 gm) was extracted

with 70% ethanol (once at 1,000 ml each). The active components were extracted by soaking the rice bran in solvent overnight at ambient temperature, and then, stirring was continued for 10 h. The extracts were filtered through Whatman No. 1 paper. The filtrates were concentrated using rotary evaporation and then lyophilized. The dried crude extracts were re-dissolved with water and were extracted with hexane to remove fat content. The aqueous portion of bran extracts were collected and re-lyophilized. The final dried extracts were stored at -30°C until used.

Identification of active compounds in defatted rice bran

Bioactive compounds in defatted rice bran were quantified by Institute of Nutrition, Mahidol University. The extracts were analyzed for cyanidin, peonidin, vitamin E, β -carotene, and lutein by using HPLC (Water 515 HPLC Pump). Samples were diluted with mobile phase and then the peak area was identified base on RT values with standards of peonidin, vitamin E, β -carotene, and lutein. The cyanidin and peonidin concentration of sample extracts were quantitated from the peak areas relative to standard calibration curve.

Cells and cell culture

Human acute promyelocytic leukemia (APL) cell lines HL-60 were purchased from the Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). Cells were maintained as suspension in RPMI medium 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin (Gibco, USA) at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO_2 . Cells were grown in culture flasks and culture media was changed every two day. Trypsinization and subculture were performed when the cells propagated to the confluent condition.

Cytotoxicity assay

The cytotoxic effect of defatted rice bran extracts on HL-60 cells was determined by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay. The MTT bioassay is a cytotoxicity assay measuring the metabolic activity of the cells. The assay was carried out as previously described with some modifications.²¹ Briefly, cells at the exponential phase were seeded at density of 1×10^4 cells/well in 96-well plates and incubated in media with or without test extracts. After a certain incubation period, culture media was removed and MTT (Chemicon, USA) was then added. The dye was cleaved by active mitochondria enzyme to produce purple formazan crystals. After 2 h incubation, iso-propanol containing 0.04 N HCl were added to each well to dissolve the formazan crystals, and the absorbance was read at 570 nm with an ELISA microplate reader (Bio-tek, USA). Survival of HL-60 cells after treatment with extracts was calculated using the following formula: viable cell number (%) = $[\text{OD}_{570}(\text{treatment well}) / \text{OD}_{570}(\text{control well})] \times 100$. The median inhibitory concentration (IC_{50}) was assessed from the dose response curves.

Determination of DNA synthesis

HL-60 cells (5×10^4 cells/ml) were seeded onto 96-well plates (200 μ l/well) and treated with a range of concentrations of rice bran extract. Actinomycin-D was used as a positive control. After incubated with extract, DNA synthesis of HL-60 cells was assayed using ELISA for BrdU incorporation (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2 h before the end of 24 and 72h treatment period with bran extract, cells were incubated for with 10 μ M BrdU labeling reagent. Cells were then fixed and DNA was partially denatured in FixDenat-solution (30 min). After

30 min, FixDenat solution was removed, anti-BrdU-POD (monoclonal antibody from mouse conjugated with peroxidase) was added and incubation was continued for 90 min. The immune complexes were detected by using tetramethylbenzidine as substrate for 15 min, the reaction was stopped with H_2SO_4 . The absorbance at 450 nm was measured by a micro-plate reader (Bio-tek). The result was present as a percent of BrdU incorporation compared to untreated cells. The cell viability was also determined in each BrdU incorporation assay.

Evaluation of apoptotic cell morphology

HL-60 cells were seeded in 24-well plates (5×10^4 cells/well) and incubated 2 days before being treatment with extract for 24, 48 h. Cells were harvested at different interval after being exposed to different concentrations of extract or without extract and were stained with a combination of the fluorescent DNA-binding dyes acridine orange and ethidium bromide (AO/EB 500 μ g/ml) for 5 min. Afterwards, cells were observed under a fluorescence microscope (Nikon) according to the fluorescence emission and morphological features of chromatin condensation in AO/EB stained nuclei.²² Minimum of 200 total cells were counted per sample, being classified as follows: (a) live cells with normal nuclei (LN: bright green); (b) live cells with apoptotic nuclei (LA: bright green, chromatin that was highly condensed or fragmented); (c) dead cells with normal nuclei (DN: bright orange, chromatin with organized structure); and (d) dead cells with apoptotic nuclei (DA: bright orange, chromatin that was highly condensed or fragmented). Apoptotic index and percentage of necrotic cells were calculated using the following formulae:

$$\% \text{ apoptotic cells (apoptotic index)} = \frac{\text{LA} + \text{DA} \times 100}{\text{LN} + \text{LA} + \text{DN} + \text{DA}}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ necrotic cells} &= \frac{\text{DN} \times 100}{\text{LN} + \text{LA} + \text{DN} + \text{DA}} \\ \% \text{ dead cells} &= \frac{\text{DN} + \text{DA} \times 100}{\text{LN} + \text{LA} + \text{DN} + \text{DA}}\end{aligned}$$

Caspase activity measurement

Caspase activation was measured using a fluorimetric caspase assay kit (Homogeneous caspases assay; Roche Diagnostics, Germany). The experiments were conducted according to the kit instructions. Cells (2×10^4 cells/well) were grown in 96-well plates for 2 days prior to treatment. After treatment, the media was aspirated and added a substrate-containing lysis solution to the cells. After 2 h incubation at 37 °C, caspase-substrate cleavage was measured with a fluorescence microplate reader (Wallac 1420) with excitation wavelength of 485 nm and emission at 535 nm. The data were determined as fluorescence intensity. Higher fluorescence intensity indicated higher caspase activity.

Statistical analysis

All data were presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). Analysis of statistical significance between the control- and rice bran extract-treated groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's Multiple Comparison test for pair wise comparison. The statistically significant difference was defined as $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytotoxic effects of defatted rice bran extract on HL-60 cells

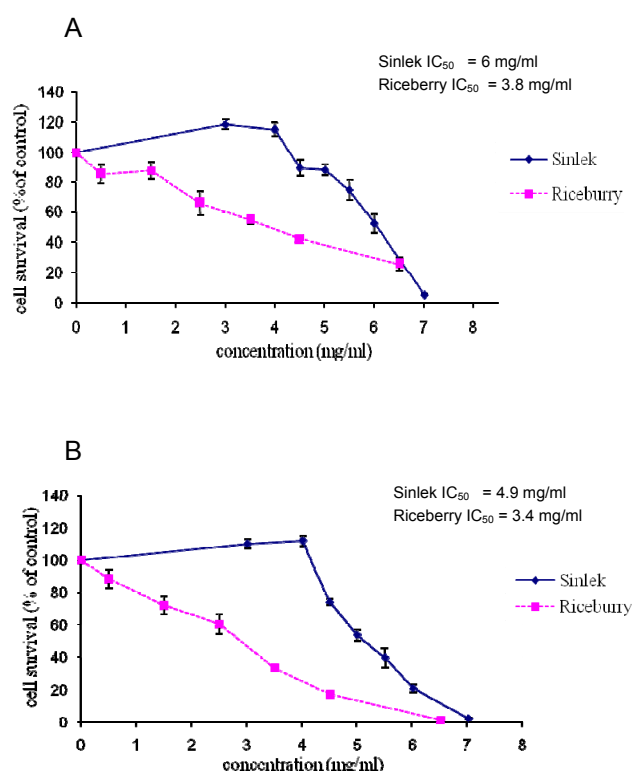
In the present study, the cytotoxic effect of defatted rice bran extracts (Riceberry and Sinlek) on HL-60 cells was characterized by conducting MTT assay. Cells were treated with various concentrations of extract for 24 and 72 h. The viability

of cells was decreased significantly in a dose- and time-dependent manner (Figure 1). Riceberry bran extract showed a lower percentage of viability compared to Sinlek bran extract at all concentrations which corresponds with its lower IC_{50} . Since the lower the IC_{50} value indicated the higher cytotoxic activity of the extract from the pigmented rice. Parado *et al.* demonstrated that the rice bran enzymatic extract has the cytotoxic effect on HL-60 cells with the IC_{50} 2.3 mg/ml (at 72 h). Interestingly, rice bran extract did not exhibit cytotoxicity towards normal peripheral blood lymphocytes.²³

Inhibition of DNA synthesis in HL-60 cells treated with rice bran extract

Cellular proliferation requires the replication of DNA; therefore, DNA synthesis indicated by BrdU incorporation is a parameter by which the rate of

Figure 1. Effect of bran extracts on HL-60 cell viability at 24 h (A) and 72 h (B). Data are reported as the means $\pm$ SEM of three separate experiments.



cell proliferation can be measured. After treatment for 24 or 72 h, both extracts from Sinlek and Riceberry rice bran caused a dose dependent reduction of DNA synthesis in HL-60 cells (Figure 2). For the same dose range (2.5-3.5 mg/ml), more prominent effect resulted from Riceberry variety. To evaluate whether the reduced BrdU incorporation observed in treated cells was due to cytotoxic or a cytostatic effect, the cell viability was concomitantly assayed. At all concentration of both rice bran extracts, % DNA synthesis was less than % viability, particularly at 24 h. The extract of Sinlek inhibited DNA synthesis without loss of cell viability. These results suggested that growth inhibition in HL-60 cells might arise from the cytostatic and cytotoxic effect of rice bran extract. However, the DNA synthesis seemed to be more sensitive to rice bran extract when compared to the vital metabolic activity. This finding was in accordance with data from other cell culture studies.^{24,25}

Apoptosis induction in HL-60 Cells by rice bran extract

In order to evaluate whether the cell death in rice bran extract-treated cells was in part due to the apoptosis or not, the role of this agent trigger cell death by apoptosis was investigated. The methodologies based on AO/EB staining and measurement of caspase activity, respectively for morphological, and biochemical analysis. The results showed that the cell treated with culture media containing 0.1 % DMSO had intact round shape nuclei containing euchromatin (Figure 3A), while cells treated with the test compound had smaller nuclei which exhibited condensed and fragmented chromatin as a hallmark of apoptotic cells (Figure 3B and 3C). After exposure to extracts of both Sinlek and Riceberry rice bran, the percentage of apoptosis was increased significantly in a dose- and time-dependent manner (Figure 4).

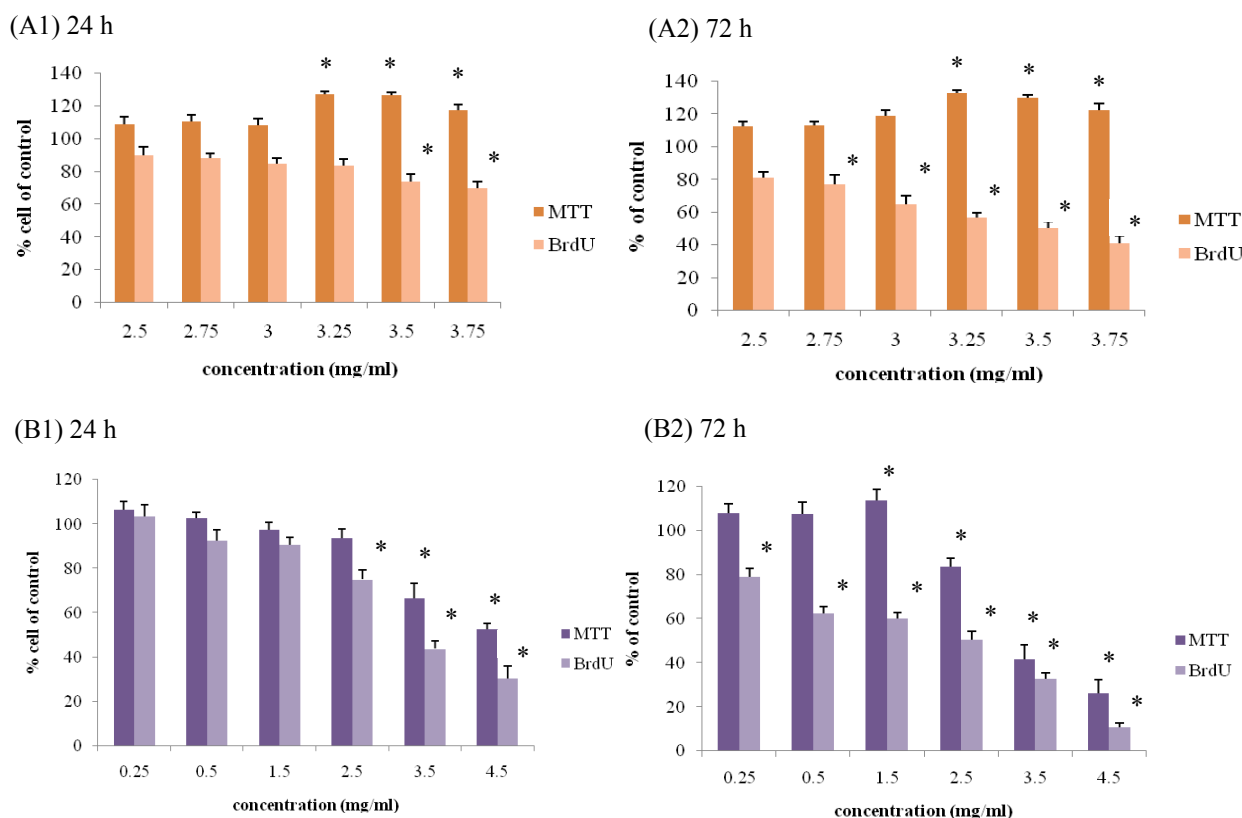


Figure 2. DNA synthesis in HL-60 cells treated for 24 and 72 h with various concentrations of (A1-2) Sinlek (B1-2) Riceberry bran extract. Data are presented as mean values $\pm$ SEM from Three independent experiments. * $P < 0.05$ mean value of treatment compared to control.

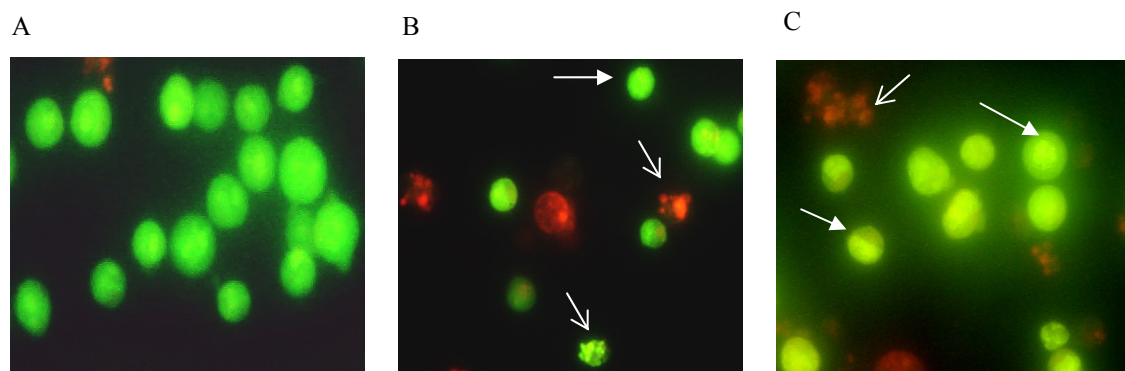


Figure 3. Apoptosis induction by extract of rice bran in HL-60 cells as monitored by AO/EB staining. Cell morphology was observed under fluorescence microscope. The cells with normal morphology were observed in the control group (A); The apoptotic nuclei were demonstrated by chromatin condensation (→) and nuclear fragmentation (→) were observed after 5.5 mg/ml Sinlek (B) and 3.5 mg/ml Riceberry treatment (C) for 48 h (x400)

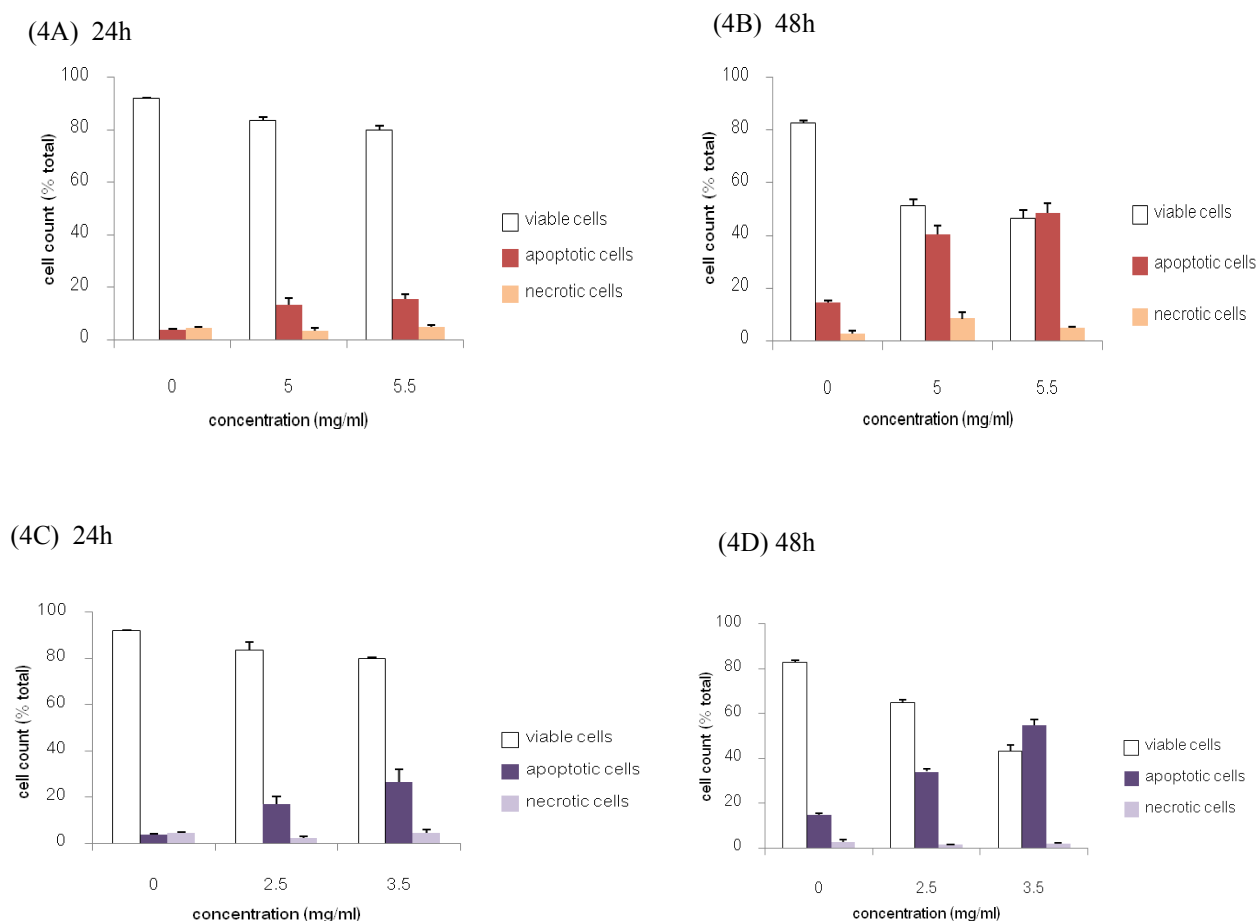


Figure 4. Fraction of viable, apoptotic and necrotic cells in HL-60 cells treated with various concentrations of Sinlek (A1-2) and Riceberry (B1-2) at the indicated times. Results are mean $\pm$ SEM from two independent experiments (n=6)

About 50% of cells became apoptosis within 48 h when bran extract of Sinlek and Riceberry were applied 5.5 and 3.5 mg/ml, respectively (Figure 4B and 4D). The results indicated that pigmented Riceberry bran had higher activity in induction apoptosis than did the extract from non-pigmented Sinlek bran. Furthermore, these experimental conditions did not increase the percentage of necrotic cells in the treated cells as compared to control.

Caspases play an important role in execution of apoptosis. Activation of caspases appears to be directly responsible for many of the morphological and biochemical features of apoptosis.²⁶ Fluorometric assay of caspase activity in HL-60 cells treated with different concentrations of extracts revealed that induction of apoptotic cell death by rice bran extract was through activation of caspases enzyme system. The activity of proteases tended to increase with increasing concentrations of rice bran extracts and duration treatment (Figure 5).

Carcinogenesis is a sequential multistep process, in which numerous molecular mechanisms play different crucial roles. The mechanism by which phytochemicals can modulate cancer risk including blocking initiation and by suppressing the later stages of promotion and progression.²⁷ From the results, it may be suggested that rice bran has a chemopreventive properties through suppressing activity. The one of possible mechanisms involving the *in vitro* anti-carcinogenic effects of rice bran may be due to their potent anti-oxidative properties. Cancer cells can exist under a condition of oxidative stress, as this increases their survival.²⁸ Oxidative stress activates redox signaling that may relate to oncogenic stimulation.²⁹ Mild oxidative has been shown to induce proliferation of human astrocytoma cells.³⁰ It was suggested that antioxidants could suppress cancer by reducing ROS stimulation cell growth, inducing apoptosis, maintaining normal cell

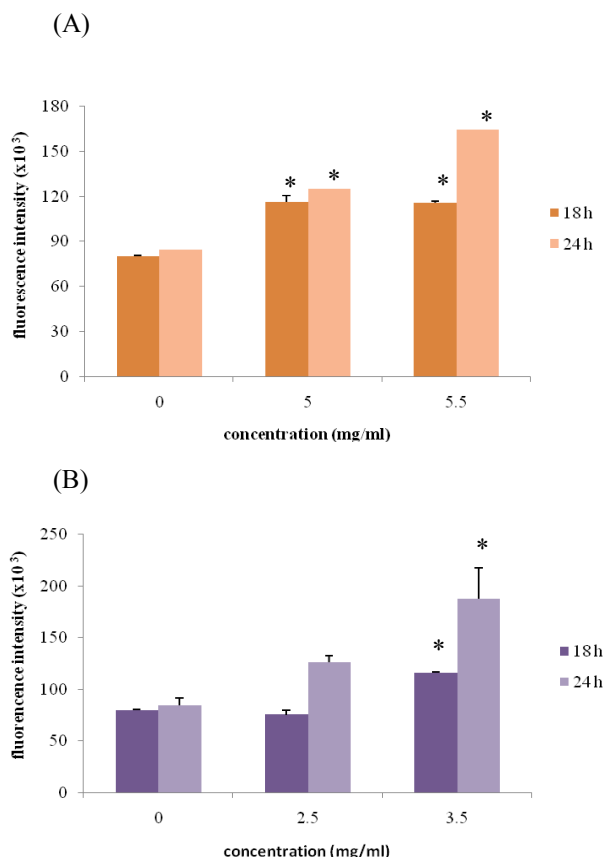


Figure 5. Effect of Sinlek (A) and Riceberry (B) rice bran on caspase activity after treatment with different concentrations of extracts for 18 and 24 hours. The values represented the means $\pm$ SEM (* P <0.05; statistical significance to control)

cycle regulation, inducing phase II detoxification enzyme activity, suppressing tumor invasion and angiogenesis.³¹ Identification of bioactive components showed that Riceberry rice bran extracts enriched with two anthocyanin compounds (cyanidin 150.81 and peonidin 66.76 mg/100g). Anthocyanins are water-soluble plant pigments and representatives of flavonoids which have strong free radical scavenging activities.^{32,33} Anthocyanins also play a crucial role in preventing against mutagenesis and carcinogenesis by inhibit tumor cells proliferation, induce apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells.³⁴ From our results, Riceberry bran extracts exhibited strong antioxidant activity (data not present). The

scavenging free radical activity (DPPH) of Riceberry (pigmented) extract was about 5 times greater than that of Sinlek (non-pigmented) extract. This finding was consistent with a recent report by Nam *et al*³⁵ showing the bran of pigmented rice has greater antioxidant activities than those of non-pigmented cultivar. However, the greater vitamin E content (996.08 µg/100g) was found in Sinlek rice bran extract. Vitamin E shows promise as anticancer agents as it inhibits the expression of mutant tumor suppressor gene p53, cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclin.^{36,37} Several chemopreventive agents that are antioxidants at some concentrations become pro-oxidants at other concentrations.³⁸ Thus, the concentration and environment (redox status) in which they act may be important in promoting or inhibiting cancer cell growth.³⁹

The principal anticancer effects of rice bran consist of cytotoxicity, anti-proliferation, anti-promotion, anti-invasion and induction of apoptosis.⁴⁰⁻⁴⁵ In the present study, the rice bran extracts exhibited growth inhibition to HL-60 cells in a dose- and time-dependent manner. The growth inhibition potential assessed by measuring cell viability, DNA synthesis and apoptotic induction illustrated the greater inhibitory effects from bran of pigmented Riceberry rice compared to non-pigmented Sinlek. The superior effect of pigmented rice may result from two major anthocyanins: cyanidin and peonidin that contained in Riceberry bran. The growth inhibitory activity exerted by rice bran extracts appears to be due to both cytostatic and cytotoxic mechanism, depending on extract concentrations. At lower concentration, bran extracts from both rice varieties induced an appreciable inhibition of proliferation (BrdU incorporation) without any significant loss of cell viability (MTT assay). These results suggested that at low concentration growth arrested via a cytostatic mechanism, whereas at higher concentra-

tions, rice bran extracts induce significant cell death. Induction of apoptosis is an effective strategy for cancer chemoprevention. In the present study, the cells treated with rice bran extracts showed typical characteristics of apoptosis. The caspase activities in HL-60 cells exposed to bran extracts of both Riceberry and Sinlek rice for 24 h were significantly higher than those of the control. When exposure to rice bran extract was continued for another 24 h, the cells with apoptotic morphological features: DNA condense and fragment were predominantly presented. Consistent with cell cytotoxic and anti-cell proliferation assay, Riceberry bran had higher capability to induced apoptosis as compared to Sinlek variety.

Based on the results of this study, the potential anticarcinogenic activities of the extracts of Riceberry and Sinlek rice bran were demonstrated against human leukemia cells. Further study will be needed to clarify the molecular mechanism of rice constituents against cancer cells and *in vivo* studies may be provided to confirm the *in vitro* results.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported with a grant from the National Research Council of Thailand (NRCT).

REFERENCES

1. Sriplung H WS, Sontipong S, Sumitsawan Y, *et al*. Cancer incidence trends in Thailand, 1998-2000. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7(2): 239-44.
2. National Cancer Institute, Thailand. Hospital-Based Cancer Registry. Annual report 2007; 1-56.
3. McCullough ML, Giovannucci EL. Diet and cancer prevention. *Oncogene* 2004; 23: 6349-64.

4. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992; 18: 1-29.
5. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 325-57.
6. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 2004; 134: 3479-85.
7. Sporn MB. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer Res* 1991; 51: 6215-8.
8. Chu YF, Sun J, Wu X, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of vegetables. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 6910-6.
9. Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 116-35.
10. Chen C, Kong AN. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 318-26.
11. Meerana SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci* 2008; 13: 2191-202.
12. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
13. White E. Life, death and pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10:1-5.
14. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-4.
15. Kang MY, Choi YH, Nam SH. Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen mitomycin C. *Agric Chem Biotech* 1996; 39: 424-9.
16. Nam SH, Kang MY. In vitro inhibitory effect of colored rice bran extracts on carcinogenicity. *Agric Chem Biotech* 1997; 40: 307-12.
17. Yasukawa K, Akihisa T, Kimura T, et al. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, and component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 1072-6.
18. Jariwalla RJ. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res* 2001; 27: 17-26.
19. Cicero AFG, Derosa G. Rice bran and its main components: potential role in the management of coronary risk factors. *Curr Topics Nutr Res* 2005; 3: 29-46.
20. Hayashi Y, Nishikawa Y, Mori H, et al. Antitumor activity of (10E,12Z)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid from rice bran. *J Ferment Bioengineer* 1998; 86: 149-53.
21. Liu J, Li Y, Ren W, et al. Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. *Cancer Lett* 2006; 242: 133-140.
22. Duke RC. Methods of Analyzing Chromatin Changes Accompanying Apoptosis of Target Cells in Killer Cell Assays. *Methods Mole Biol* 2004; 282: 43-66.
23. Parrado J, Miramontes E, Jover M, et al. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chem* 2006;98:742-8.
24. Brandi G, Schiavano GF, Zaffaroni N, et al. Mechanisms of Action and Antiproliferative Properties of Brassica oleracea Juice in Human breast Cancer Cell Lines. *J Nutr* 2005; 135: 1503-9.
25. Wang J, Wang X, Jiang S, et al. Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1025-33.
26. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 533-73.
27. de Kok TM, van Breda SG, Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *Eur J Nutr* 2008; 47 (Suppl 2): 51-9.
28. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
29. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 335-48.
30. Arora-Kuruganti P, Lucchesi PA, Wurster RD. Proliferation of cultured human astrocytoma

- cells in response to an oxidant and antioxidant. *J Neurooncol* 1999; 44: 213-21.
31. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32, 595-603.
32. Cooke D, Steward WP, Gescher AJ, *et al.* Anthocyanins from fruits and vegetables – does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur J Cancer* 2005; 41: 1931-40.
33. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* 2008; 269: 281-90.
34. Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, *et al.* Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 68-75.
35. Nam SH, Choi SP, Kang MY, *et al.* Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chem* 2006; 94: 613-20.
36. Skhlar G. Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients. *Oral Oncol* 1998; 34: 24-9.
37. Gysin R, Azzi A, Visarius T. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J* 2002; 16: 1952-4.
38. Lee BM, Park KK. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutat Res* 2003; 523–524: 265–78.
39. Valko M, Izakovic M, Mazur M, *et al.* Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.
40. Hyun J W, Chung HS. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2213-7.
41. Nam SH, Choi SP, Kang MY, *et al.* Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of Rice bran extracts in chemical and cell assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 816-22.
42. Chen PN, Kuo WH, Chiang CL, *et al.* Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem Biol Interact* 2006; 163: 218-29.
43. Fan H, Morioka T, Ito E. Induction of apoptosis and growth inhibition of cultured human endometrial adenocarcinoma cells (Sawano) by an antitumor lipoprotein fraction of rice bran, *Gynecol Oncol* 2000; 76: 170–5.
44. Miyoshi N, Koyama Y, Katsuno Y, *et al.* Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin, *J Biochem* 2001; 130: 799–805.
45. Ghoneum M, Gollapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis *Cancer Lett* 2003; 201: 41-9.

Cytoprotective and Cytotoxic Effects of Rice Bran Extracts on H₂O₂- Induced Oxidative Damage in Human Intestinal Caco-2 Cells

Bunyada Jittorntrum¹, Rodjana Chunhabundit^{2*}, Ratchanee Kongkachuichai³, Supanart Srisala¹ and Yupin Visetpanit²

¹ Nutrition Program, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital and Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

² Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³ Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Oxidative stress is considered to play a prominent role in the causation of chronic diseases. At present, Rice Science Center, Thailand used plant biotechnology technique to develop new rice strains with increasing nutritive values. Some rice varieties such as Sinlek brown rice and Riceberry pigmented rice showed high levels of antioxidant contents and activities, especially in bran portion. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of these bran extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. Human intestinal Caco-2 cells were co-incubated with the bran extracts and H₂O₂ for 3 h. Cytotoxic effects of both bran extracts were also evaluated and cell viability measured by MTT assay. Cell growth was inhibited in dose- and time-dependent manner by both bran extracts. The doses at which non-toxic and approximate to IC₅₀ were used to determine effects of the rice bran extracts on H₂O₂ induced oxidative stress. Non-toxic concentrations of both bran extracts protected cells against H₂O₂-induced oxidative stress as antioxidant property. On the other hand, high concentrations enhanced oxidative stress mediated reduction of cell viability. This may result from the pro-oxidant activity that express at high concentrations of the extracts. Sinlek bran extract exhibited antioxidant and pro-oxidant activity higher than Riceberry bran. In addition, the high concentrations of both bran extracts inhibited cell growth in dose and time-dependent manner. Further studies are needed to clarify the potential activities and properties of these bran extract before using as supplement in food or medicine.

Keywords: Oxidative stress, cytoprotective, H₂O₂, rice bran, antioxidant, pro-oxidant

* Corresponding author:

Rodjana Chunhabundit

Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital

Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

E-mail: rarch@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) or oxygen-derived free radicals have been implicated in various pathological conditions involving chronic diseases such as cardiovascular disease, stroke and cancer.¹⁻³ It is an important mediator of damage to key cellular structures; lipids, proteins and DNA. The epidemiological findings indicate that consumption of fruits, vegetables and whole grains is strongly associated with reducing risk of cancer and other chronic diseases. These plant foods are the major sources of phytochemicals which have antioxidant and anticancer properties.⁴⁻⁶ Rice (*Oryza sativa* L.) is a basic staple crop for a large part of the world including Thailand which is one of the *world's largest rice* exporters. Rice bran is a relatively abundant by-product of rice milling process and contains various antioxidant factors showing beneficial effects on human health. Rice bran is not only a source of *high quality proteins* but also rich sources of *fiber*, antioxidant *vitamins* and *bioactive compounds*. Several studies have demonstrated the abundant bioactives with corresponding high antioxidant, anticarcinogenic and antimutagenic activities in rice bran extracts.⁷⁻¹⁰ In the rice consuming world, nutritious rice grains can become a main ingredient in designing food for specific nutraceutical and functional food formulations. Recently, Rice Science Center, Thailand has developed some new Thai rice strains with increasing nutritive values by using plant biotechnology technique. Some rice varieties such as Sinlek brown rice and Riceberry pigmented rice showed high contents and activities of various antioxidants especially in bran portions.¹¹ Therefore, in this present study, we determined the chemical antioxidant activities of bran extracts from Sinlek and Riceberry rices. In addition, the bran extract of each rice variety was evaluated for its effects on H₂O₂ mediated oxidative stress in human colon

cells.

MATERIALS AND METHODS

Samples and reagents

Bran of brown rice, Sinlek and pigmented rice, Riceberry were obtained from Rice Science Center & Rice Gene Discovery Unit, Thailand. Rice bran samples from experimental rice field were stored at -20 °C until use. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin and streptomycin were obtained from Gibco (Invitrogen, USA). Colorimetric (MTT) kit for cell survival and proliferation were obtained from Chemicon international, Inc. H₂O₂ was purchased from Carlo Erba Reagents Company.

Extraction of rice bran

The extraction of rice bran was performed according to previous method.¹² Briefly, 100g of rice bran was extracted with ethanol - water (70:30 v/v) by stirring for 10 h at room temperature. The filtrate of extract was passed through Whatman filter paper No.1. Solvent was removed by rotary evaporator. Then the sample was lyophilized, re-dissolved and extracted with hexane to remove residual fat. Finally, the aqueous phase of extract was lyophilized and aliquoted into a test tube for storage at -20 °C until used.

Identification of active compounds in defatted rice bran

Bioactive compounds in defatted rice bran were quantified at Institute of Nutrition, Mahidol University. The extracts were analyzed for cyanidin, peonidin and vitamin E. The analysis was performed using a high performance liquid chromatography (HPLC). Samples were diluted with mobile phase and then the peak area was identified base on RT values with standards of cyanidin, peonidin and vitamin E. The concentration of active com-

pounds in sample extracts was quantitated from the peak areas relative to standard calibration curve.

Measurement of antioxidant capacity in defatted rice bran

The antioxidant activity of the defatted rice bran extracts was determined at Institute of Nutrition, Mahidol University. A number of assays were performed for antioxidative activities; oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. These assays were carried out according to the previously described procedures.¹³⁻¹⁵

Cell culture

Caco-2 human colon cancer cells were kindly provided by Asst. Prof. Dr. Ratchanee Kongkachuichai at Institute of Nutrition, Mahidol University. Cell line (passage 32-36) were routinely grown in DMEM media supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin in humidified incubator maintained 37 °C and supplied with 95% air and 5% CO₂. Cells were seeded at a density of 10⁴ cells/well onto 96 well plates and maintained for 48 h before experiments.

Cytotoxicity assays

The MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of the rice bran extract. The assay is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt MTT into purple formazan by metabolically active cells. An increase in number of living cells results in an increase in total metabolic activity, which leads to a stronger color formation. In the experiment, bran extracts were dissolved in completed media with 0.1% v/v DMSO at different concentration (0-10 or 0-20 mg/ml for Sinlek and Riceberry respectively). Cells were exposed to 200 µl of each treatment solution except, control cells

that were treated with 0.1% DMSO presented in media without bran extracts. After 24 and 72 h of incubation, treatment medium was replaced with 100 µl of completed media and 10 µl of MTT solution was added to each well. After 2 h of incubation, the media was removed and 100 µl of isopropanol/ 0.04N HCL was added to each well to solubilize the formazan. The plate was read using a micropate reader (Bio-tek, USA) at a wavelength of 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. The results were expressed as the percentage of viable cells compare with the control (% cell viability).

H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells

Caco-2 cells were cultured in 96-well plates for 48 h before oxidative stress induction. Culture media was removed, cells were washed once with PBS and then, H₂O₂ was added at the concentration ranging from 0.3 to 10 mM. After 3 h of incubation, cell viability was measured by the MTT assay as described above.

Effect of rice bran extracts on H₂O₂-induced inhibition of cell growth

The effects of rice bran extracts on H₂O₂ induced oxidative stress and suppressing cell growth was done by co-incubation method. The cells were incubated in 200 µl of culture medium containing 1 mM H₂O₂ with or without various concentrations of the extracts (0 to 7.5 mg/ml of Sinlek and 0 to 20 mg/ml of Riceberry rice bran). After 3 h of incubation, the cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and 100 µl of fresh medium was added. Then, cell viability was measured by the MTT assay and the treated cells were observed for morphology under inverted microscope.

Statistical Analysis

All results were expressed as mean ± SEM. The

statistical significance of differences between groups in cytotoxicity tests was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison tests. Student's t-test was used for analysis the effects of rice bran extracts on H₂O₂ treated cells. $P < 0.05$ was accepted as the statistically significant level.

RESULTS

Analyses of bioactive components and antioxidant activities of rice bran extracts

Table 1 shows the antioxidant properties and bioactive constituents of the experimental rice bran extracts. The major bioactive components in pigmented Riceberry bran were two phenolics; cyanidin and peonidin (Fig. 1) whereas non-pigmented Sinlek variety contained vitamin E. The results of antioxidant activities were in accordance with those observed in a previous study that found pigmented rice bran had significant higher antioxidant activities than white rice bran. It may be partially due to the anthocyanins those found only in the bran of Riceberry rice. Major and minor proanthocyanidin in rice as refer to cyanidin and peonidin which generally found in pig-

mented of fruits and vegetables have important roles in reducing risk of cancer and other chronic diseases because of their free radicals scavenging capacities.¹⁶⁻¹⁹

Cytotoxicity assay

As illustrated in Fig.2, the cytotoxicity of rice bran extracts on Caco-2 cells was observed after incubation at 24 and 72 h. Bran extracts significantly decreased viability of Caco-2 cells in a dose- and time- dependent manner. After 24 h incubation, the IC₅₀ was 7.5 mg/ml for Sinlek whereas 20 mg/ml of Riceberry rice bran extract reduced cell growth to approximately 60% of control. At 72 h, extracts from both varieties had IC₅₀ lower than those at 24 h. With the lower IC₅₀ values, Sinlek showed a greater cytotoxic activity compared to Riceberry. For subsequent experiments the doses equal or close to IC₅₀ were used to examine the effect of the bran extracts.

H₂O₂ -induced oxidative stress and reduction of viability in Caco-2 cells

Caco-2 cells were treated with various concentrations of H₂O₂ (0.3, 0.5, 1, 5 or 10 mM). Following 3 h of incubation after H₂O₂ treated (Fig.3), cell viability was determined by MTT assay. The results showed that H₂O₂ significantly reduced cell viability dependently on doses. At a concentration of 1 mM, the cell viability was about 60%. There-

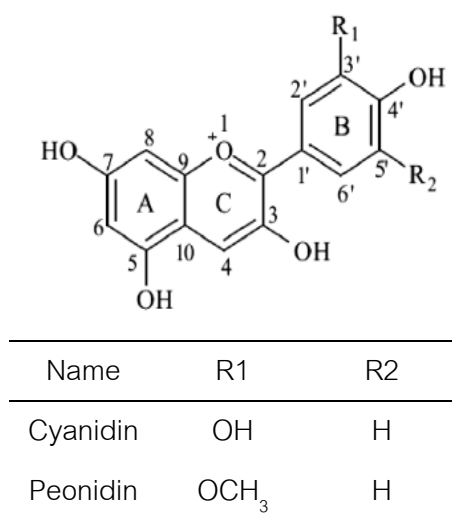


Figure 1. Chemical structure of anthocyanidins

Table 1 The antioxidant activity and active compounds of defatted rice bran extracts.

	Sinlek	Riceberry
FRAP (μmole TE/ml)	146.03	407.85
ORAC (μmole TE/ml)	705.89	1,735.88
DPPH (μmole TE/ml)	1,078.16	5,198.48
Cyanidin (mg/100g)	n.d.*	150.81
Peonidin (mg/100g)	n.d.	66.76
Vitamin E (μg/100g)	996.08	n.d.

* n.d., not detected

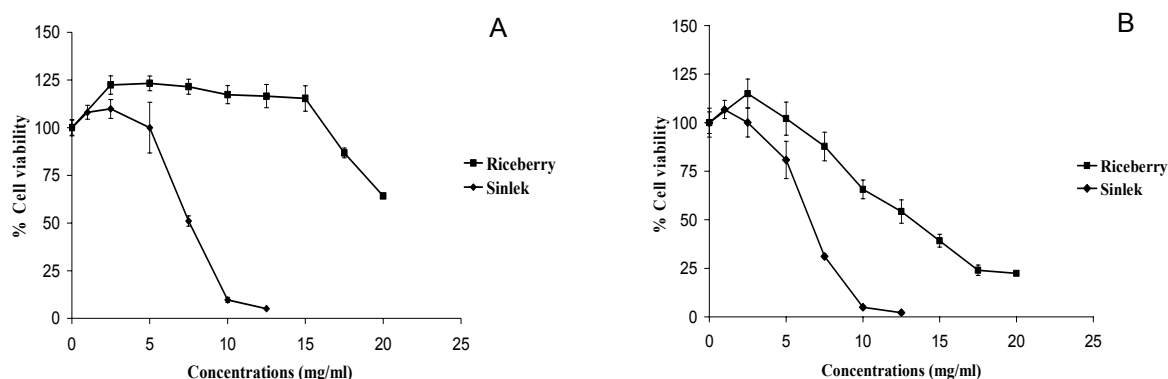


Figure 2. Cytotoxic effect of rice bran extracts on Caco-2 Cells. Caco-2 cells were treated with various concentrations of rice bran extracts for 24 h (A) and 72 h (B). After incubation, cell viability was measured by MTT assay. Data were means $\pm$ SEM ($n \geq 6$).

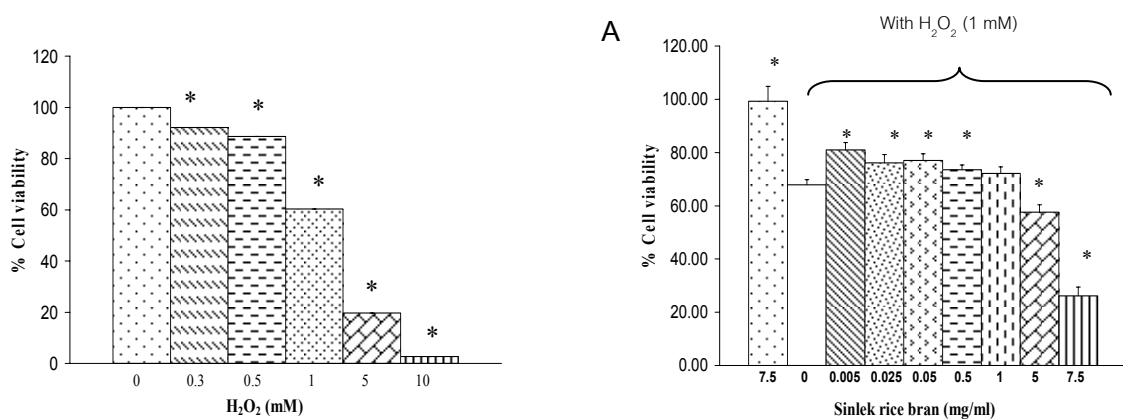


Figure 3. H₂O₂-induced reduction of viability of Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with various concentrations of H₂O₂ (0.3, 0.5, 1, 5, 10 mM). After 3 h of incubation, cell viability was measured by MTT assay. Data were means $\pm$ SEM ($n=3$). * $p < 0.05$ compared to control group.

fore, for investigation the effects of rice bran extracts on oxidative induced cell damage, we used 1 mM as the concentration of H₂O₂ to induced oxidative damage.

Effect of the rice bran extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells

As shown in Fig.4A and 4B, Sinlek and Riceberry rice bran extracts in the highest concentration used in this experiment did not affected cell viable. When the rice bran extracts with 1 mM H₂O₂ were added simultaneously on Caco-2 cells, low concentrations (0.005-0.5 mg/ml) of Sinlek extract

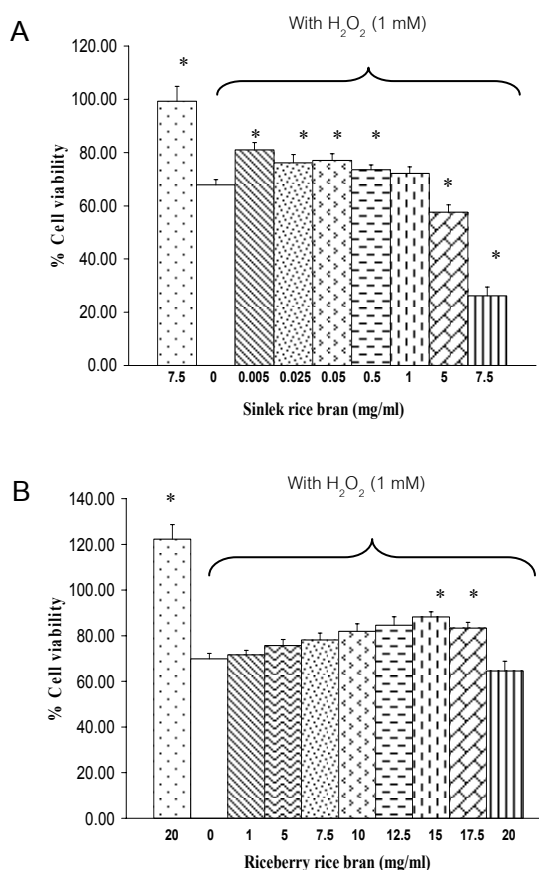


Figure 4. Effect of rice bran extracts on H₂O₂-induced cell damage in Caco-2 cells (co-incubation) Caco-2 cells were treated with 1 mM of H₂O₂ with various concentrations of rice bran extracts: (A) Sinlek or (B) Riceberry. After 3 h of incubation, cell viability was measured by MTT assay. Data were means $\pm$ SEM ($n \geq 6$). * $p < 0.05$ compared to control group.

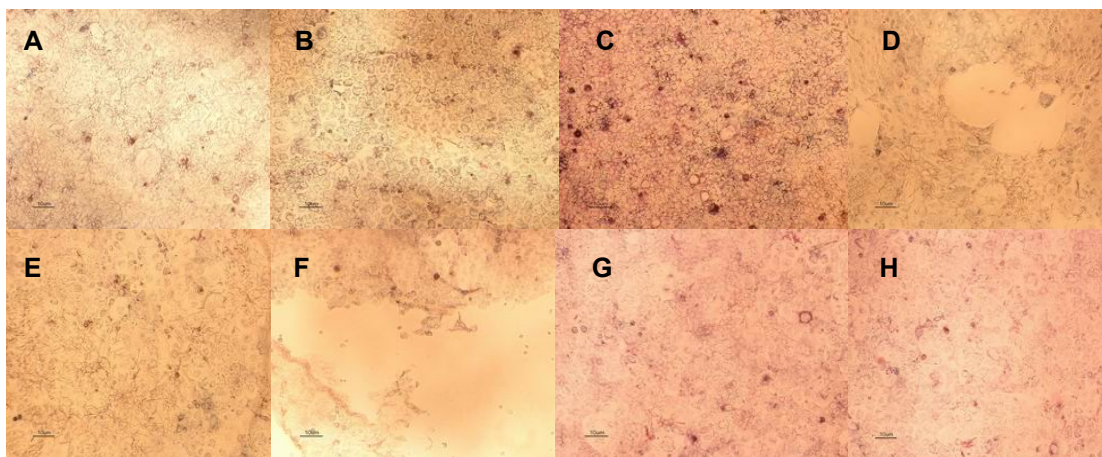


Figure 5. Effect of rice bran extracts on H_2O_2 -induced cell damage in Caco-2 cells. Rice bran extracts were added together with H_2O_2 . At 2 h after the end of 3 h incubation period, cells were incubated with MTT and then observed under phase contrast microscopy. (A) non- H_2O_2 treated groups (B) 7.5 mg/ml Sinlek (C) 20mg/ml Riceburry (D) 1 mM H_2O_2 (E) 1 mM H_2O_2 /0.005 mg/ml Sinlek (F) 1 mM H_2O_2 / 7.5 mg/ml Sinlek (G) 1 mM H_2O_2 / 17.5 mg/ml Riceburry (H) 1 mM H_2O_2 / 20 mg/ml Riceburry

could protect a number of cells by significant increased cell viability compared to H_2O_2 treated control group. However, the protective effect was not seen in higher concentrations (5, 7.5 mg/ml), on the contrary, it caused a significant dose dependently decrease in cell viability after H_2O_2 exposure.

Similar results were found from the cells exposed to Riceberry bran extract with H_2O_2 . The cell viability had a trend of increase according to concentration of bran extracts (Fig.4B). At concentration of 15 and 17.5 mg/ml it caused significant protective effect against H_2O_2 . However, at concentration of 17.5 mg/ml, cell viability started to decline and the protective effect was lost at the highest concentration of 20 mg/ml.

Morphological observations

The morphologies of the Caco-2 cells co-incubated in rice bran extracts with or without H_2O_2 were examined after 3 h of incubation by optical microscopy (Fig. 5). Without treatment, cells were intact and well attached to the culture plate (A). Cells incubated in the highest concentration of Sinlek (B) and Riceberry (C) bran

extracts appeared normal without any signs of impairment. When the oxidative stress was induced by 1 mM H_2O_2 , the prominent morphological changes were observed. Cell membrane aberration and a detachment of monolayer were clearly observed. In contrast, the membrane damage and monolayer detachment induced by H_2O_2 treatment were completely prevented by co-incubation with low concentration of both rice bran extracts (E) and (G). However, co-incubation with some higher concentrations of bran extracts, cell loss and detachment (F) and membrane aberration (H) were noticed again. The results of cell morphologies were consistent with those of cell viability determination.

DISCUSSION

By using the chemical assays, we found that Riceberry rice bran had a higher antioxidant activity than Sinlek rice bran. Regarding method of analysis, ORAC assay is based on the measurement of antioxidant inhibition of reactive oxygen species (ROS) induced oxidations and thus reflects classical radical chain breaking antioxidant activity by H atom transfer. DPPH is based on

the measurement of the reducing ability of antioxidants in test compounds toward DPPH $\cdot$ which after reaction, DPPH color is lost. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) is based on the measurement of reduction of ferric 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) to ferrous-TPTZ and give blue color by test compound. Our finding agree with a previous study,¹¹ it showed that the bran extract of pigmented Riceberry rice had higher values of ORAC, DPPH and FRAP than the bran extract of non-pigmented Sinlek. It may be related with bioactive compounds identified in this rice bran. Especially, cyanidin and peonidin that expressed higher levels in Riceberry rice bran. Both cyanidin and peonidin is naturally occurring polyphenolic compound that give the intense color to many fruits and vegetables. They are a group of flavonoids that represent the aglycones of most anthocyanins in plants. In current studies, they indicated that these flavonoids have a potential antioxidant, anti-inflammatory and antitumor in many cell lines.²⁰ The structures which support these activities were illustrated in Fig. 1. The flavonoids are recognized for both their ability to donate electrons and stop chain reactions. These activities attribute to the phenolic hydroxyls, particularly in the 3', 4'-OH of the (B) ring and the activities increase with the number of OH groups in ring (A) and (B). However, they lack the ketone structure in ring (C) for contribute to metal chelating activity.²¹⁻²³ Therefore, the higher contents of cyanidin and peonidin including their suitable structures may promote the higher ORAC and DPPH activities of Riceberry as compared to Sinlek cultivar.

The MTT cytotoxicity assay showed that Sinlek rice bran had a higher cytotoxic potential on Caco-2 cells than Riceberry rice bran. To investigate the health benefits of these rice brans, the effects of bran extracts from Sinlek and Riceberry rice on H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells were examined. H₂O₂ was used to induce ROS forma-

tion in this experiment because of its ability to pass freely across cell membranes. It is precursor of highly oxidizing, tissue-damaging radicals such hydroxyl radical as known to be highly toxic to many systems and generate from nearly all sources of oxidative stress.

When 1 mM H₂O₂ and bran extracts were added concomitantly, Sinlek rice bran extract had higher ability to protect cells against H₂O₂-induced oxidative stress than Riceberry rice bran extract. Sinlek showed preventive effect on cells at lower concentration than Riceberry rice bran. Rice bran counteract against the H₂O₂-induced decrease in cell viability may at least partly result from its antioxidant and free radical scavenging properties. Nonetheless at the high dose range, Sinlek bran extract also exerted a promoting effect on H₂O₂-induce oxidative stress in Caco-2 cells at the lower concentration than Riceberry rice bran extract. Some flavonoids such as quercetin reduced intracellular production of ROS and produced peroxide in the culture medium at the same time. It was found that low concentrations of quercetin enhanced total antioxidant capacity while high concentrations decreased total antioxidant capacity of the cells.²⁴ Some phenolic substances can exert pro-oxidant activities under certain conditions, such as in the presence of transition metal ions or alkalis.^{25,26} Metal-mediated autoxidation of some phenolic phytochemicals generates semiquinone radicals, resulting in the enhancement of redox activity to produce reactive oxygen species including H₂O₂. Thus, some phenolic phytochemicals may exert antimutagenic and antitumor-promoting activities at relatively low doses, whereas at high doses, some excess antioxidant may instead exhibit acute toxicity or carcinogenicity. It is possible that a pro-oxidant activity of extracts could be linked to their beneficial effects in cancer therapy while dietary plant phenolics have been reported

to protect cells from oxidative-induced cell toxicity.^{27,28} The present study finding indicated that bioactive compounds in rice bran may act as both antioxidant or pro-oxidant depend on the redox status of the cells and concentration of the extracts.

In summary, Sinlek and Riceberry rice bran extracts behaved differently in cell free and cell based tests. Our present study showed that Sinlek and Riceberry rice bran possessed a high antioxidant activity in cell free system. Exposed Caco-2 cells to rice bran extracts and H₂O₂ simultaneously revealed that at the low concentration, rice bran extract exhibited antioxidant activities whereas at the high concentration, they seemed to be pro-oxidant enhanced oxidative stress decrease in cell viability. Sinlek and Riceberry rice bran extract by themselves, at the high dose range led to cell death in dose and time-dependent manner. Therefore, further studies in these rice bran extracts are needed to clarify their potential activities and properties before using as supplement in food or medicine.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge and thank the National Research Council of Thailand (NRCT) to support our research.

REFERENCES

1. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44(1): 239-67.
2. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett* 2008; 266: 53-9.
3. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
4. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-751.
5. Slavin JL. Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 300S-7S.
6. Cicero AFG, Derosa G. Rice bran and its main component: potential role in the management of coronary risk factors. *Curr Top Nutraceutical Res* 2005; 3: 29-46.
7. Nam SH, Choi SP, Kang MY, *et al.* Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 816-22.
8. Kaneda I, Kubo F, Sakurai H. Antioxidative compounds in the extracts of black rice brans. *J Health Sci* 2006; 52: 495-511.
9. Devi RR, Arumughan C. Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 2014-21.
10. Hudson EA, Dinh PA, Kokubun T, *et al.* Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1163-70.
11. Phenphan C. Antioxidants and antioxidant activities of pigmented rice varieties and rice bran [M.Sc. Thesis in Nutritional Program]. Nakhon Pathom: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 2007.
12. Devi RR, Arumughan C. Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresour Technol* 2007; 98: 3037-43.
13. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant

- capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4290-302.
14. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4619-26.
 15. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-6.
 16. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* 2008; 269: 281-90.
 17. Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 9427-35.
 18. Elisia I, Kitts DD. Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Mol Cell Biochem* 2008; 312: 139-45.
 19. Elisia I, Hu C, Popovich DG, *et al.* Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem* 2007; 101: 1052-8.
 20. Hyun JW, Chung HS. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2213-7.
 21. Jing P, Bomser JA, Schwartz SJ, *et al.* Structure function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 9391-8.
 22. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 572-84.
 23. Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Curr Sci* 2001; 81: 1179-87
 24. Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biolo Int* 2007; 31: 1245-50.
 25. Labieniec M, Gabryelak T. Study of interactions between phenolic compounds and H₂O₂ or Cu(II) ions in B14 Chinese hamster cells. *Cell Biol Int* 2006; 30: 761-8.
 26. Joubert E, Winterton P, Britz TJ, *et al.* Antioxidant and prooxidant activities of aqueous extracts and crude polyphenolic fractions of rooibos (*Aspalathus linearis*). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 10260-7.
 27. Lazze MC, Pizzala R, Savio M, *et al.* Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutat Res/Genet Toxicol and Environ Mutagen* 2003; 535: 103-15.
 28. Johnson MK, Loo G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res/DNA Repair* 2000; 459: 211-8.

Effect of Aqueous Extract from *Cleistocalyx nervosum* on Oxidative Status in Rat Liver

Taya S, Punvittayagul C, Chewonarin T, Wongpoomchai R.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

ABSTRACT

Cleistocalyx nervosum var. *paniala*, Ma-kiang, is a local plant in northern region of Thailand presenting high antioxidant activity *in vitro*. Our previous study found that 5 g/kg bw of *C. nervosum* aqueous extract had no acute toxic effect on rat. The present study was designed to determine effect of aqueous extract of *C. nervosum* on oxidative status in rat liver. Male Wistar rats were divided into 3 groups. Rats in group 1 were received water as a vehicle control, while group 2 and 3 were received 100 and 500 mg/kg bw of aqueous extract via intragastrum 5 times a week for 4 weeks. At the indicated time, the effect of *C. nervosum* on oxidative stress and antioxidant system were evaluated. Aqueous extract of *C. nervosum* did not affect the level of total glutathione, glutathione peroxidase and catalase activities. Low dose of *C. nervosum* (100 mg/kg bw) significantly increased malondialdehyde formation but high dose (500 mg/kg bw) did not. However, 500 mg/kg bw of *C. nervosum* extract significantly enhanced heme oxygenase-1 activity. Although the aqueous extract of *C. nervosum* at low dose exhibited the pro-oxidant effect but at high dose, it reduced oxidative stress in rat liver. In conclusion, the aqueous extract of *C. nervosum* might show biphasic effect on oxidative status of rat liver.

Keywords: Antioxidant, *Cleistocalyx nervosum*, liver, Ma-kiang and oxidative stress

* Corresponding author:

Asst. Prof. Rawiwan Wongpoomchai
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
Email: rawibiochem@yahoo.com

INTRODUCTION

Epidemiological studies suggest that the consumption of fruits and vegetables reduces the risk of cardiovascular diseases, diabetes, arthritis and cancer due, at least in part, to their antioxidant and anti-inflammatory activities.^{1,2} Recent studies have shown flavonoids and related polyphenols in fruits and vegetables contribute significantly antioxidant activity.³ Anthocyanins are flavonoids containing antioxidant properties in certain colorful fruits, such as grapes and cranberries.⁴ Many studies have shown that anthocyanins may have potential effects in reducing the risk of cardiovascular diseases and cancer by antioxidant, anti-inflammatory and chemoprotective properties.^{5,6}

Cleistocalyx nervosum var. *paniala*, Ma-kiang, is found growing in scatter locations in some villages of the northern provinces of Thailand. The rich purplish red color of *C. nervosum* was characterized by an anthocyanin profile and a major compound was cyanidin 3-glucoside.⁷ Our previous study found that *C. nervosum* had no acute toxic effect on rat.⁸ There is no report on biological activity of *C. nervosum*. Then, the present study was designed to determine effect of aqueous extract of *C. nervosum* on antioxidant enzymes in rat liver.



Figure 1 Fruit of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* (Ma-kiang)

MATERIALS AND METHODS

Extraction of *C. nervosum*

The fruit of *C. nervosum* (Figure 1) was collected from Tambol Choeng Doi, Amphur Doi Saket Chiang Mai, Thailand, in July-August, 2008. Fresh ripe fruit of *C. nervosum* was extracted with distilled water and then dried by lyophilizer. The aqueous extract was kept in dark at -20 °C until used to determine antioxidant activity *in vivo*.

Animals

Male Wistar rats, weight ranged 150 - 180 g were obtained from the National Laboratory Animal Center, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand. They were housed under standard environmental conditions of temperature at 24 °C under a 12 hr dark-light cycle, and allowed free excess to drinking water and pelleted diet. An experimental protocol was approved by The Animal Ethics Committee of Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

The male Wistar rats were divided into 3 groups of five animals each with an initial body weight of 199±0.58 g. Rats in group 1 were received water as a vehicle control, while group 2 and 3 were received 100 and 500 mg/kg bw of aqueous extract via intragastrum 5 times a week for 4 weeks. Body weight and food intake were recorded weekly. At the end of the experiment, rats were food deprived for 12 h, and then were anesthetized by diethyl ether. Liver tissue was immediately excised, rinsed with 0.9% NaCl solution, and frozen in liquid nitrogen. The frozen pieces of liver tissue were kept at -80 °C until the determination of oxidative status and antioxidant system.

Liver tissue preparation

The liver was homogenized with potassium phosphate buffer containing potassium chloride, EDTA and PMSF as a protein inhibitor. Liver homogenate was centrifuged at 14,000 rpm at 4 °C for 20

min. The supernatant was transferred into a fresh cleaned tube and centrifuged at 100,000 g at 4 °C for 1 h. The supernatant and pellet were separately collected which were represented the cytosolic and microsomal fractions, respectively.

Assay of lipid peroxidation products in liver tissues

The quantitative estimation of lipid peroxidation was performed by determining the concentration of malondialdehyde (MDA) in the liver using TBARs assay which described by the method of Ohkawa *et al.*⁹ The amount of TBARs was quantified and used as an index of lipid peroxidation. The results were expressed as pmol of MDA per milligram protein.

Determination of glutathione content

Total glutathione was determined by using glutathione recycling system.¹⁰ The conjugation of total glutathione and DTNB which generated yellow color of 2-nitro-5-thiobenzoic acid was measured the absorbance at 405 nm.

Measurement of some antioxidant enzyme activities

Catalase (CAT) activity was measured according to Aebi H.¹¹ The enzyme reaction assay contained 30 mM H₂O₂, 50mM phosphate buffer (pH 7.0) and sample in a total volume of 750 µl. CAT activity was estimated by the decrease in absorbance of H₂O₂ at 240 nm and was expressed as nmol of H₂O₂ decomposed per min per mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx) plays important role in protecting of organisms from oxidative damage. GPx reduces hydroperoxide coupling with oxidizes glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG). Then, GSSG was further reduces to GSH by glutathione reductase using NADPH as an electron donor. The decrease of NADPH is relative to GPx activity. The decrease of NADPH can be meas-

ured by absorbance at 340 nm.¹²

Heme oxygenase (HO) is a potent antioxidant enzyme and is important in the cellular response to oxidative injury. HO is an antioxidant enzyme catalyzing degradation of heme. The end products of HO are carbon monoxide, biliverdin, and free iron. Biliverdin can be subsequently converted to bililubin by biliverdin reductase. Bilirubin levels are then measured by a spectrophotometric method using the difference in absorption at 460 and 530nm.¹³

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc least-significant difference (LSD) test.

RESULTS

Body weight and consumption of diet and water did not show any significant differences in treated groups when compared to control group (Data not shown). The effect of *C. nervosum* aqueous extract on antioxidant and biochemical parameters was summarized in Table 1. The MDA formation resulting in lipid peroxidation was measured in terms of the TBARs formation. The level of MDA in the liver homogenate was significantly increased in the rats treated with 100 mg/kg bw of *C. nervosum* extract when compared to the control group. However, high dose of *C. nervosum* extract (500 mg/kg bw) significantly increased heme oxygenase (HO-1) activity. The aqueous extract did not modulate on total glutathione level, glutathione peroxidase and catalase activities.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In the previous study showed that the aqueous extract of *C. nervosum* contained total phenolic

Table 1 Effect of *C. nervosum* aqueous extract on the level of malondialdehyde, total glutathione, glutathione peroxidase, catalase and heme oxygenase-1 in rat liver

	Control	Aqueous extract of <i>C. nervosum</i>	
		100 mg/kg bw	500 mg/kg bw
MDA formation (pmol/mg protein)	12.36 ± 4.03	20.60 ± 5.37*	17.49 ± 2.70
Total glutathione (nmol/mg protein)	17.61 ± 3.72	15.94 ± 5.92	18.28 ± 2.42
Glutathione peroxidase activity (pmol/min/mg protein)	25.22 ± 2.62	27.11 ± 4.94	28.38 ± 8.50
Catalase activity (nmol/min/mg protein)	19.08 ± 2.72	14.04 ± 1.53	10.17 ± 2.44
Heme oxygenase-1 activity (umol/min/mgprotein)	820.83 ± 81.38	982.64 ± 164.92	1,248.61 ± 230.50

Values are mean±SEM from 5 rats in each group. *Significantly difference from control group; $p < 0.05$.

compounds 181.16 ± 0.59 mg gallic acid equivalents per 100 gram fresh weight and total flavonoids 54.86 ± 3.45 mg catechin equivalents per 100 gram fresh weight.⁸ The phenolic compounds found in aqueous extract of *C. nervosum* might take a part of its antioxidant capacity. The mechanism of antioxidant activity of *C. nervosum* might be involved in scavenging free radical and/or chelating iron generating Fenton reaction.⁸ Lipid peroxidation and antioxidant systems were used as important biomarkers for detection of antioxidant property of aqueous extract. Four antioxidant systems (GSH, GPx, CAT and HO-1) and MDA formation were evaluated for oxidative status. The results in the present study have demonstrated that aqueous extract of *C. nervosum* could affect both of antioxidant system and MDA formation in rat liver. It showed that oxidative stress significantly increased in rats treated with aqueous extract at a low dose (100 mg/kg bw). The increasing of oxidative stress in liver was observed in only rat received low dose of *C. nervosum* extract which might be a dose of prooxidant. Phenolic phytochemicals are not only recognized as antioxidants, but they can also ex-

ert prooxidant activities. In fact, most free-radical scavengers act in oxidation–reduction reactions that are reversible, and some, such as phenolic phytochemicals, can act both as antioxidants and prooxidants depending on their structure and the conditions. The prooxidant activity is thought to be directly proportional to the total number of hydroxyl groups.¹⁴ So, *C. nervosum* might exhibit an antioxidant activity at high dosage while act as a prooxidant at low dosage.

Glutathione is one of the most abundant non-enzymatic biological antioxidants present in the liver. Its functions include removal of free radicals such as hydrogen peroxide, superoxide anions and alkoxy radicals, maintenance of membrane protein thiols and acting as a substrate for glutathione peroxidase (GPx). GPx catalyses the reduction of H_2O_2 and hydroperoxides to non-toxic products. CAT catalyses the reduction of H_2O_2 and protects the tissue from highly reactive oxygen free radicals and hydroxyl radicals. The result showed that aqueous extract of *C. nervosum* did not affect on total glutathione, glutathione peroxidase and catalase activities. Other antioxidant enzyme which determined in the study is

heme oxygenase (HO-1). It mediated cytoprotection which is important for tissues that are vulnerable to oxidative stress.¹⁵ Aqueous extract at dosage of 500 mg/kg bw significantly increased heme oxygenase activity and also decreased MDA formation. Although at low dosage of *C. nervosum* extract enhance oxidative stress in rat liver, on the other hand at high dosage of *C. nervosum* extract might be able to reduce oxidative stress by enhancement of non-glutathione pathway such as heme oxygenase. In conclusion, the aqueous extract from *C. nervosum* might show biphasic effect on oxidative stress in rat liver.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Endowment Fund for Medical Research (2009), Faculty of Medicine, Chiang Mai University. The authors would like to thank Ms. Pimwalun Pinthuprapa for providing *C. nervosum* in this study.

REFERENCES

1. Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. Fruit and Vegetable Intakes and Prostate Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 61-8.
2. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996; 96(10): 1027-39.
3. Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). *J Agric Food Chem* 2002; 50(6): 1379-82.
4. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem* 1997; 45(2): 304-9.
5. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, et al. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D-glucoside and cyanidin. *J Agric Food Chem* 1994; 42(11): 2407-10.
6. Lazze MC, Savio M, Pizzala R, et al. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1427-33.
7. Jansom C, Bhamarapravati S, Itharat A. Major anthocyanin from ripe berries of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*. *Thammasat Med J* 2008; 8: 364-70.
8. Taya S, Punvittayagul C, Wongpoomchai R. Acute and subacute toxicity studies of antioxidative compounds extracted from Ma-kiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) in wistar rat. In The 1st CMU Graduate Research Conference; 2009 Nov 27-28; Chiang Mai, Thailand.
9. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-8.
10. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1): 70-7.
11. Aebi H., Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-6.
12. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: biochemical roles as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-90.
13. McNally SJ, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity. *Anal Biochem* 2004; 332(2): 398-400.
14. Lee KW, Lee HJ. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 424-431.
15. Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1279-87.

Anti-Oxidative Stress Activities of Silibinin on α -Amanitin *In Vitro*

Khunnala A¹, Narongchai S¹, Butkrachang S², Leelarungrayub D³, Narongchai P^{1*}

¹ Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

² Lampang Agricultural Research and Training Center, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang, Thailand

³ Oxidative stress and Exercise Biochemistry Laboratory. Department of Physical Therapy, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

ABSTRACT

Alpha amanitin (α -amanitin) is the mainly toxic substance in *Amanita* mushrooms in Thailand. Toxicity of α -amanitin is directly on the liver organ leading to body systemic failure. Silibinin is an antioxidant and only one medication that can help reduce the toxicity of α -amanitin, but its mechanism of action is still unclear. The antioxidant activities of silibinin in scavenging free radicals, i.e. superoxide radical, hydroxyl radical, and H_2O_2 as well as the direct trapping between silibinin and α -amanitin were evaluated in vitro. The scavenging free radicals of silibinin in this study were demonstrated in XO-HX, Ribose- and H_2O_2 -ABT/HRP systems by comparing to the standard antioxidants; gallic acid, N-acetylcysteine (NAC), and quercetin. Anti-toxicity was studied in human blood from α -amanitin oxidation, then the whole blood glutathione (GSH) and plasma malondialdehyde (MDA) levels were detected with DTNB and TBARs. The results showed that silibinin scavenged superoxide radicals lower than quercetin but higher than gallic acid and NAC. It scavenged hydroxyl radicals better than quercetin, NAC and gallic acid, respectively. However, the scavenging activity on H_2O_2 of silibinin was lowest among the compared antioxidants. Interestingly, silibinin protected the GSH and inhibited MDA production in blood from α -amanitin oxidation in a dose response manner. The study revealed that silibinin had scavenging activity directly on free radicals, especially superoxide, hydroxyl radicals, and H_2O_2 . It also protected the GSH and inhibited MDA production in human blood from α -amanitin oxidation.

Keywords: Alpha-amanitin, silibinin, antioxidant activity, scavenging free radical, *Amanita* mushroom

* Corresponding author:

Prof. Paitoon Narongchai, MD.

Department of Forensic Medicine Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail: pnarongc@mail.med.cmu.ac.th

INTRODUCTION

Bureau of epidemiology, Thailand (2008) reported 1,624 cases with 5 deaths from consuming *Amanita* mushrooms in Chiang Mai and Mae Hong Son. The most poisonous substance of amatoxins is alpha amanitin (α -amanitin). In Thailand, *Amanita verna* (Bull.ex.Fr.) Vitt. and *Amanita virosa* Secr. are the main lethal toadstool.¹ The structure of amatoxins is a bicyclic octapeptides with an indole-(R)-sulphoxide bridge and different amatoxins have been classified in alpha-, beta-, and gamma amanitins.^{2,3} α -Amanitin is the most toxic compound (the lethal dose in human adults is 0.1 mg/kg body weight).^{4,5} The mechanism of α -amanitin toxicity is due to its strong inhibition on the activity of RNA polymerase II leading to the inability in producing messenger RNA and consequently causing cell death within 24 hour.⁴ Other toxic mechanisms have also been proposed, such as, α -amanitin acts synergistically with endogenous cytokine (e.g. tumor necrosis factor)⁶ and may cause generation of free radicals within liver cell.⁷ Some evidences showed that α -amanitin acted either as an antioxidant in the auto-oxidizing liposome system or as a pro-oxidant in Fenton reaction.⁸

Silibinin is the major compound of the silymarin isolated from seeds of mediterranean milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Asteraceae*), and clinically used as a hepatoprotectant.^{9,10} Silibinin has anti-hepatotoxic activity with anti-inflammatory, anti-allergic and anti-oxidant activities by scavenging various free radicals.^{10,11} In animal liver, silibinin is shown to inhibit α -amanitin uptake^{12,13} and also inhibit penetration of α -amanitin by competing with α -amanitin at the hepatocyte membrane.¹¹

In Thailand, mushroom poisoning especially *Amanita* poisoning was increasingly reported

every year. The toxic manifestation of amatoxin poisoning takes a long period of latency. The delay onset of symptoms seems not to be too severe and often lead to misdiagnosis or delayed diagnosis. Several reports claimed the antidote of silibinin to amatoxin is due to antioxidant activity but the actual mechanism of silibinin is still unclear. The aim of this study was to evaluate the mechanism of silibinin on α -amanitin in vitro by observing its scavenging free radicals and activity in human blood.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

N-acetylcystein (NAC), thymol, gallic acid, quercetin, silibinin, hypoxanthine (HPX), xanthine oxidase (XOD) were purchased from Sigma (St. Louis, Mo, USA). 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), nitrotetrazolium blue chloride (NBT), 2-deoxy-D-ribose, 5,5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), α -amanitin, ammonium acetate were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetonitrile was purchased from SK chemicals (Korea). Other chemicals were of analytical grade.

Determination of scavenging activity on H_2O_2

The testing method was followed Okamoto *et al.*¹⁴ Briefly, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0), silibinin, H_2O_2 (0.003%), peroxidase (10 U/ml), and ABTS (0.1%) were thoroughly mixed. Reaction mixture was incubated at 37 °C for 15 min and the absorbance was measured at 415 nm. The concentration of silibinin at 50 % inhibitory activity was compared to NAC, gallic acid and quercetin which were used as the standard antioxidants. All tests were repeated 3 times.

Determination of scavenging activity on superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)

The assay was followed Gaulejac *et al.*¹⁵ Superoxide anion radicals were generated in a hypoxanthine/xanthine oxidase (HPX-XOD) system and assayed by NBT reduction. The decrease in absorbance at 560 nm was measured every 15 second for 6 min. The amount of silibinin to reduce the initial $O_2^{\cdot-}$ concentration by 50% was compared to NAC, gallic acid and quercetin. All tests were repeated 3 times.

Determination of scavenging activity on hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$)

The method of $OH^{\cdot}$ measurement is by thiobarbituric acid-reactive substances (TBAR) assay as described by Ozyürek *et al.*¹⁶ Oxidative attack of $OH^{\cdot}$ generated from a Fenton reaction on deoxyribose to produce MDA and measured the formation of MDA-TBA adducts to detect $OH^{\cdot}$. The amount of silibinin at 50% inhibition was compared to NAC, gallic acid and quercetin. All tests were repeated 3 times.

Antioxidant activity in human erythrocytes

Four systems were designed: erythrocyte (control group), erythrocyte with α -amanitin (negative control), erythrocyte with α -amanitin plus silibinin, and erythrocyte plus silibinin. Each system was incubated at 37 °C for 2 hr. Whole blood was then evaluated for glutathione and the plasma was separated by centrifugation at 3,000 $\times g$ for 10 min to evaluate MDA. Evaluation of MDA was adapted from Chirico.¹⁷ The measurement of MDA based on MDA-TBA adduct formation and measured at 532 nm. Glutathione assay was applied from Beutler *et al.*¹⁸ Briefly, a whole blood sample was mixed with distilled water and precipitating solution. The mixture was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 5 min. A supernatant was mixed with 0.3 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) and

1 mM DTNB. After incubated at room temperature for 5 min, yellow complex was developed and read absorbance at 412 nm.

Determination of α -amanitin by HPLC

The chromatographic condition was followed the method of Jehl *et al.*¹⁹ The HPLC apparatus was run on the 9012Q pump solvent delivery system with a prostar 310 UV/VIS detector (Varian Chromatography system, USA). α -Amanitin was separated in a Luna C18 (5 mm 125 $\times$ 4.6 mm) (Phenomenex®, USA). The mobile phase was a mixture between 0.02 M aqueous ammonium acetate and acetonitrile (88:12, v:v) (pH 5), and α -amanitin was analyzed at 280 nm. The calibration curve was prepared based on the five concentrations of standard α -amanitin (6-100 $\mu g/ml$). Determination of α -amanitin was directly trapped with silibinin. α -Amanitin (50 $\mu g/ml$) were incubated with various concentration of silibinin (200, 100 and 10 μg) at room temperature for 5 min, and α -amanitin was then analyzed with HPLC.

RESULTS AND DISCUSSION

Free radical scavenging activity

The study showed that gallic acid had the highest scavenging activity ($0.34 \pm 0.01 \mu g$) on H_2O_2 , followed by NAC ($0.57 \pm 0.01 \mu g$), quercetin ($3.78 \pm 0.02 \mu g$) and silibinin ($4.84 \pm 0.01 \mu g$). For the scavenging on $O_2^{\cdot-}$ at 50%, the results showed that quercetin provided the highest scavenging activity ($0.07 \pm 0.01 \mu g$) followed by silibinin ($0.36 \pm 0.01 \mu g$), gallic acid ($45.42 \pm 1.92 \mu g$), and NAC ($4,778.34 \pm 208.63 \mu g$). Silibinin showed the best scavenging activity ($214.67 \pm 229.86 \mu g$) on $OH^{\cdot}$ scavenging compared to quercetin ($410.00 \pm 121.66 \mu g$), NAC ($666.67 \pm 5.77 \mu g$) and gallic acid ($713.33 \pm 5.77 \mu g$) (Table 1). The study of Mira *et al.*²⁰ has found that silibinin dihemisuccinate (water soluble form of silymarin) was not a good scaven-

Table1: IC₅₀ antioxidant scavenging activity of silibinin, NAC, gallic acid, and quercetin

compound	H ₂ O ₂ scavenging activity (μg)	O ₂ ^{•-} scavenging activity (μg)	OH ⁻ scavenging activity (μg)
Silibinin	4.84 ± 0.01	0.36 ± 0.01	214.67 ± 229.86
NAC	0.57 ± 0.01	4,778.34 ± 208.63	666.67 ± 5.77
Gallic acid	0.34 ± 0.01	45.42 ± 1.92	713.33 ± 5.77
Quercetin	3.78 ± 0.02	0.07 ± 0.01	410.00 ± 121.66

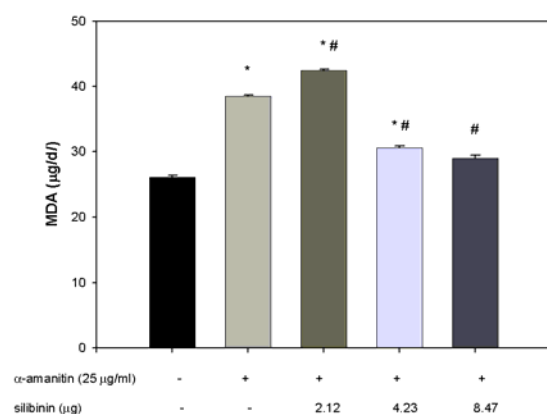


Figure 1 Effect of silibinin at 2.12, 4.23 and 8.47 μg on lipid peroxidation (MDA) level in whole blood from α-amanitin (25 μg/ml) oxidation. Each bar is a mean and standard deviation from triplicates. *, p<0.05 compared to the whole blood without any treatment (first bar); and #, p< 0.05 compared to the whole blood treated with α-amanitin (second bar).

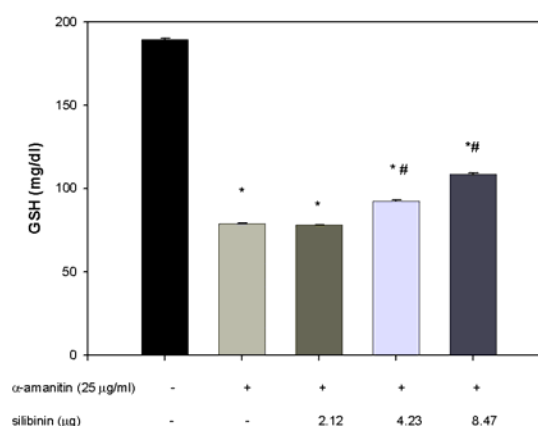


Figure 2 Effect of silibinin at 2.12, 4.23 and 8.47 μg on GSH level in whole blood from α-amanitin (25 μg/ml) oxidation. Each bar is a mean and standard deviation from triplicates. *, p<0.05 compared to the whole blood without any treatment (first bar) and #, p< 0.05 compared to the whole blood treated with α-amanitin (second bar).

ger of O₂^{•-} and gave no reaction with H₂O₂, but could scavenge OH⁻. The present study, however, found that silibinin showed antioxidant activity toward H₂O₂, O₂^{•-} and OH⁻. Besides the different methods for determine free radical scavenging activity were used, silibinin in this study was a pure compound and insoluble in water. Nevertheless, our results confirmed that silibinin acts as antioxidant.^{10,21}

Antioxidant activity in human blood

Figure 1 showed that silibinin inhibited the lipid peroxidation on human erythrocytes from α-amanitin oxidation at 4.23 and 8.47 μg (MDA 30.64 and 28.97 μg/dl) compared to the control (26.11 μg/dl),

which was significantly different (p<0.05). The α-amanitin significantly decreased (p<0.05) the GSH level (78.78 mg/dl) compared to the control (189.51 mg/dl). Silibinin at 4.23 and 8.47 μg significantly increased GSH level (92.34 and 108.30 mg/dl) significantly compared to α-amanitin alone (Figure 2). Silymarin interacts directly to the cell membrane and prevent any abnormalities of lipid fraction responsible for maintaining normal membrane fluidity.^{9,21} Thus, it prevented oxidation of membrane lipids resulting in reducing MDA level after treated α-amanitin with silibinin. This confirmed that silibinin helps to maintain and protect the antioxidant system such as GSH and super oxide dismutase.^{22,23} Silibinin also protected GSH

from α -amanitin oxidation with a dose response manner.

Determination of α -amanitin by HPLC

The retention time of α -amanitin was 11.78 ± 0.47 min. The limit of detection (LOD) and the lower limit of quantitation (LOQ) of alpha amanitin were 4.3 and 5.73 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The peak area responded to the dose concentration at 6-100 $\mu\text{g/ml}$ with a good correlated coefficient ($r = 0.999$). The method showed the high accuracy with % recovery of the measurement of α -amanitin more than 95% (95-98%), including good intra-day coefficient of variation (3.53 to 7.73% in range) from 10 repetitive tests. The direct scavenging effect of silibinin on α -amanitin was done by varying concentrations of silibinin (10, 100, or 200 μg) with 50 $\mu\text{g/ml}$ of α -amanitin. The results showed no different change compared to the untreated α -amanitin (Figure 3). This finding suggested that silibinin did not affect directly on α -amanitin, but the inhibitory action of silibinin is by binding to cell membranes; and therefore inhibit α -amanitin penetration of the cell membrane. Silibinin also competed with α -amanitin for the specific bile salt transport systems of hepatocyte membrane.²⁴

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Faculty of Medicine Research Fund, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. I would like to thanks the head of department, staffs and graduated students of the Department of Forensic Medicine, Chiang Mai University, for their kind support.

REFERENCES

1. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control. Mushroom poisoning. Annual Epidemiological Surveillance Report 2008 [online]. Available from: <http://epid.moph.go.th>,

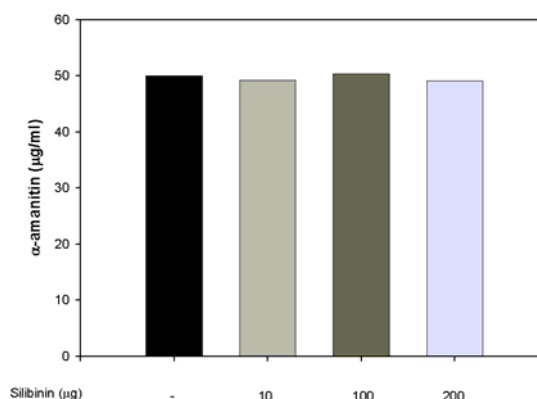


Figure 3 Effect of Silibinin at 10, 100, and 200 μg on α -amanitin at 50 $\mu\text{g/ml}$.

accessed Oct 28, 2008.

2. János V. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998; 36: 13-24.
3. Christine KS, Hans P. Cytotoxic fungi – an overview. *Toxicon* 2003; 42: 339-49.
4. Wieland T. The toxic peptides from *Amanita* mushrooms. *Int J Peptide Protein Res* 1983; 22: 257-76.
5. Faulstich H. Mushroom poisoning. *Lancet* 1980; 316: 794-5.
6. Leist M, Gantner F, Naumann H, et al. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxin. *Gastroenterology* 1997; 112: 923-34.
7. Zheleva A, Tolekova A, Zhelev M, et al. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity – a hypothesis. *Med Hypotheses* 2007; 69: 361-7.
8. Zheleva A, Benov L, Zhelev Z. Effect of amatoxin on lipid peroxidation in model membranes. In: International conference on regulation on free radical reactions; September 13-16, 1989. Varna, Bulgaria; 1989, p. 188.
9. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, Silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 2006; 124: 491-504.
10. Peter C, Tharnkamol C, Chu SS, et al. Fruc-

- tus Silybi Mariae. The second WHO consultation on selected medicinal plants; 1999 March 1-5; Ravello-Salerno, Italy; 1999. p. 300-16.
11. Enjalbert F, Rapior S, Nouguier-Soule J, *et al.* Treatment of amatoxin poisoning: 20-years retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002; 40: 715-57.
 12. Faulstich H. New aspects of amanita poisoning. *Klin Wochenschr* 1979; 57:1143-52.
 13. Vogel G, Tuchweber B, Trost W, *et al.* Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 355-62.
 14. Okamoto G, Hayase F, Kato H. Scavenging of active oxygen species by glycated proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 56: 928-31.
 15. Gaulejac NSC, Vivas N, Freitas V, *et al.* The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 1081-90.
 16. Ozyürek M, Bektaşoğlu B, Güçlü K, *et al.* Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal Chim Acta* 2008; 616:196-206.
 17. Chirico S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods Enzymol* 1994; 233: 314-8.
 18. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1993;61:28.
 19. Jehl F, Gallion C, Birckel P, *et al.* Determination of α -amanitin and β -amanitin in human biological fluids by High-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1985; 149: 35-42.
 20. Mira L, Silva M, Manso CF. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem pharmacol* 1994; 48: 753-9.
 21. Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl_4 liver damage. *J Appl Toxicol* 1990; 10: 229-35.
 22. Shear NH, Malkiewicz IM, Klein D, *et al.* Acetaminophen-induced toxicity to human epidermoid cell line A431 and hepatoblastoma cell line Hep G2, in vitro, is diminished by silymarin. *Skin Pharmacol* 1995; 8: 279-91.
 23. Láng I, Deák G, Müzes G, *et al.* Effect of the natural bioflavonoid antioxidant silymarin, on superoxide dismutase (SOD) activity and expression in vitro. *Biotechnol Ther* 1993; 4: 263-70.
 24. Krönck KD, Fricker G, Meier P, *et al.* α -Amanitin uptake into hepatocyte: identification of hepatic membrane transport system used by amatoxins. *J Biol Chem* 1986; 261: 12562-7.

การต้านอนุมูลอิสระของซิลิบินินต่อความเป็นพิษของแอลฟา-อะมานิติน ในหลอดทดลอง

อัญญา คุณนะลา¹, สิริพันธ์ ณรงค์ชัย¹, ศิริศักดิ์ บุตรกระจำง², ดลรวี ลีลารุ่งระยับ³,
และไพฑูรย์ ณรงค์ชัย^{1*}

¹ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

³ ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

แอลฟา-อะมานิติน (Alpha amanitin) มีความเป็นพิษที่รุนแรงที่สุดที่พบในเห็ดสกุล *Amanita* ในประเทศไทย โดยมีความเป็นพิษต่อตับโดยตรงและทำให้ระบบการทำงานต่างๆ ของร่างกายล้มเหลวได้ ส่วน ซิลิบินิน (Silibinin) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาใช้รักษาความเป็นพิษที่เกิดจากแอลฟา-อะมานิติน แต่กลไกการทำงานของซิลิบินินนั้นยังไม่แน่ชัด ดังนั้นวัตถุประสงค์ในครั้งนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของซิลิบินินในการกำจัดสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ได้แก่ superoxide anion, hydroxyl radical และ hydrogen peroxide โดยอาศัยวิธี XO-HX, Ribose- และ H_2O_2 -ABT/HRP รวมทั้งความสามารถของซิลิบินินในการจับกับแอลฟา-อะมานิตินได้โดยตรงหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ได้แก่ gallic acid, N-acetylcysteine (NAC) และ quercetin นอกจากนี้ได้ศึกษาการต้านความเป็นพิษจากแอลฟา-อะมานิตินในเลือดคน โดยการวัดปริมาณ glutathione (GSH) ในเลือด และ malondialdehyde (MDA) ในพลาสมา โดยอาศัยวิธี DTNB และ TBARS ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า ซิลิบินินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion ได้น้อยกว่า quercetin แต่มากกว่า NAC และ gallic acid ส่วนการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl radical ได้มากกว่า quercetin, NAC และ gallic acid ตามลำดับ และการกำจัด hydrogen peroxide ได้น้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น นอกจากนี้ ซิลิบินินสามารถป้องกัน GSH และลดปริมาณ MDA ได้ตามความเข้มข้น และยังพบว่าซิลิบินินไม่สามารถจับกับแอลฟา-อะมานิตินได้โดยตรง โดยสรุปซิลิบินินสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ superoxide anion, hydroxyl radical และ hydrogen peroxide ได้และยังสามารถป้องกัน GSH และลดการเกิด MDA จากแอลฟา-อะมานิติน

คำสำคัญ : แอลฟา-อะมานิติน, ซิลิบินิน, การต้านอนุมูลอิสระ, เห็ด *Amanita*

* Corresponding author:

ศ นพ. ไพฑูรย์ ณรงค์ชัย

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, จ. เชียงใหม่ 50200

E-mail: pnarongc@mail.med.cmu.ac.th

Butylated Hydroxytoluene in Edible Vegetable Oils from Local Markets of Chiang Mai and Mae Hong Son and Its Thermal Stability in Different Cooking Conditions

Likhitrungrat C¹, Chokethaworn N¹, and Suttajit M²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

² School of Medical Science, Naresuan University, Phayao, Thailand

ABSTRACT

Butylated hydroxytoluene (BHT) was widely used to protect oxidation and rancidity of food products containing fats and oils since it had high antioxidant activity. In this study, samples of edible vegetable oils from 25 local markets in Chiang Mai province and Mae Hong Son province were determined for BHT contents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Of 18 vegetable oil samples, 3 palm oil samples from the local markets contained BHT in the range of 6.8-86.1 µg/g. The extracts of edible vegetable oil samples had 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in the range of 7.5 to 75.8% which had gallic acid equivalent and BHT equivalent concentrations in the ranges of 6.5 to 65.9 mg/g and 17.2 to 173.0 mg/g, respectively. Three different home-cooking conditions were tested for thermal stability of BHT in the samples of palm oil. It was found that cooking temperatures at 98-100 °C by boiling or stir-frying for 1-15 min lost BHT 24-31% in the oil, while deep frying at 200±10 °C for 5-15 min showed 46-62% loss of BHT.

Keywords: Butylated hydroxytoluene, edible vegetable oil, antioxidant activity

INTRODUCTION

Antioxidant compounds in food have an important role as a health protecting factor. They are supposed to protect living organisms from oxidative damage. Synthetic antioxidants are more easily available and have been used in a wide variety of oil products.¹ Although they are effective in protecting product quality in food, excess of these antioxidants added to food might produce toxicity or mutagenicities that may be harmful to human

health.² The effects of BHT increase the susceptibility of mice to lung carcinogens and lung tumor development have broadened the concept of two-stage carcinogenesis and complement the evidence for initiation for other epithelial tissues in liver, colon, stomach, trachea, urinary bladder, and mammary glands.^{3,4} Many oil refiners and food processors continue to use butylated hydroxytoluene in vegetable oils because of its low cost.⁵ The objectives of this study were (1) to determine BHT in edible vegetable oils including palm oil, soybean oil, corn oil, black sesame oil, rice bran oil, cotton seed oil and sunflower oil by GC-MS, (2) to assay antioxidant activity of these edible vegetable oils, and (3) to determine the thermal stability of BHT in different cooking conditions.

* Corresponding author:
Miss Chananat Likhitrungrat
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Maejo University, Chiang Mai, Thailand
Email: chananat_im@hotmail.com

MATERIALS AND METHODS

Materials

Standard solutions of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Methanol and acetonitrile were purchased from JT Baker (USA). All chemicals were of analytical grade. Eighteen edible vegetable oil samples were purchased from local markets in Amphoe Sansai and Amphoe Muang, Chiang Mai, Thailand.

Preparation of BHT and gallic acid standards

A standard stock solution 0.1% (w/v) of BHT and gallic acid were dissolved in acetonitrile. The volumetric flask was shaken until a homogenous and clear solution was formed. The stock solution was covered with aluminum foil and stored in a refrigerator (~4 °C). Fresh standard solutions were prepared by dilution of an appropriate amount of the stock solution in acetonitrile on the day of use.

Sample preparation

One gram of each edible vegetable oil sample was put into a 20 ml sample bottle and then 2 ml of acetonitrile were added, secured the screw, shook and sonicated for 15 min. The sample extract was kept in a freezer at -20 °C for 1 hour. The clear portion was collected and sonicated. 1-2 µl of the sample solution was injected to a GC-MS system.

Measurement of radical scavenging activity

The method was adapted from Erasto *et al*⁶ and Miraliakbari and Shahidi.⁷ Briefly, 2 ml of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) solution (0.1 mM) in methanol was mixed with 1 ml of oil extracts (ten-fold dilution) and mixed thoroughly, left to stand for 30 min in the dark until stable absorption values were obtained. BHT and gallic acid were used as reference antioxidant compounds. The absorbance

of remaining DPPH radicals was read at 517 nm using a spectrophotometer (HITACHI, Model U-1100, Japan). Analysis of each assay solution was done in triplicate. The scavenging of DPPH radicals was calculated according to the following equation:

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100}{}$$

Thermal stability of BHT in palm oil

To investigate thermal stability of BHT in palm oil samples, the oil was heated in an electric pan, with temperature controlled at 200±10 °C. This condition was similar to a deep fried cooking condition in home kitchen of Thai people. At each 5 min interval, an aliquot of the fried oil (2 ml) was collected for extraction by acetonitrile and subjected to GC-MS analysis. Cooking condition by heating oil in boiling water with temperature controlled at 98 °C, at 5 minute interval, an aliquot of the cooking oil (2 ml) was collected for extraction and analysis. Cooking condition by stir-frying, the oil was stir-fried in mixture of water:oil (1:10), temperature was controlled at 100±5 °C. At 1 minute interval, an aliquot of stir-fried oil (2 ml) was collected for extraction and analysis. Preparation of these samples was described in the above preparation of samples. 1 µl of the sample extract solution was injected to a GC-MS system.

GC-MS analysis

GC-MS analysis was performed using Agilent 6890 (Agilent Technologies, USA) equipped with column HP-5MS (Agilent Technologies), 30 m x 250 µm i.d., 0.25 µm film thickness and Agilent MSD 5973 (Agilent Technologies) quadrupole mass spectrometer with an electron impact (EI) ion source as a detector. Carrier gas was Ultra high purity (UHP) helium at 1.0 ml/minute. Oven

temperature was: initial 40 °C, held for 3 minutes, programmed to 300 °C at 30 °C/minute. The detector was operated at 70 eV with full scan (30~550 amu). Ion source temperature was 230 °C. The temperature of quadrupole was 150 °C. Software used was NIST98 Library and WILEY Library mass database. Samples were injected in splitless mode.

RESULTS AND DISCUSSION

The BHT standard was determined based on the sample solution. The retention time of BHT standard was 8.84 minutes (Figure 1).

In the quantitation results of BHT of eighteen edible vegetable oil samples, three samples were found to contain BHT in the range of 6.8-86.1 mg/g (Table 1). The difference of BHT content in each sample depends on the manufacturer of the palm oil. Palm oil from the same manufacturer, but collected from different markets, showed almost the same BHT values.

The result showed that the 18 edible vegetable oil samples had DPPH radical scavenging activity in the range of 7.5-75.8%, 6.5-65.9 mg/g of gallic

acid equivalent and 17.2-173.0 mg/g of BHT equivalent. Palm oil (1) – (7) had activity ranged from 40.2% to 75.8%, gallic acid equivalent and BHT equivalent in the ranges of 35.0-65.9 mg/g and 91.7-173.0 mg/g, respectively. Palm oil (3) has the highest activity than other palm oil and other vegetable oils (Table 2). All samples of edible vegetable oil showed antioxidant activity, but BHT were not detected in some samples, because of different antioxidants (natural or synthetic) used in various products.

Table 2 shows that the 18 edible vegetable oil samples have DPPH radical scavenging activity in the range of 7.5-75.8%, 6.5-65.9 mg/g of gallic acid equivalent and 17.2-173.0 mg/g of BHT equivalent. Palm oil (1) – (7) had activity ranged from 40.2% to 75.8%, gallic acid equivalent and BHT equivalent in the ranges of 35.0-65.9 mg/g and 91.7-173.0 mg/g, respectively. Palm oil (3) has the highest activity than other palm oil and other vegetable oils. All samples of edible vegetable oil showed antioxidant activity, but BHT were not detected in some samples, because of different

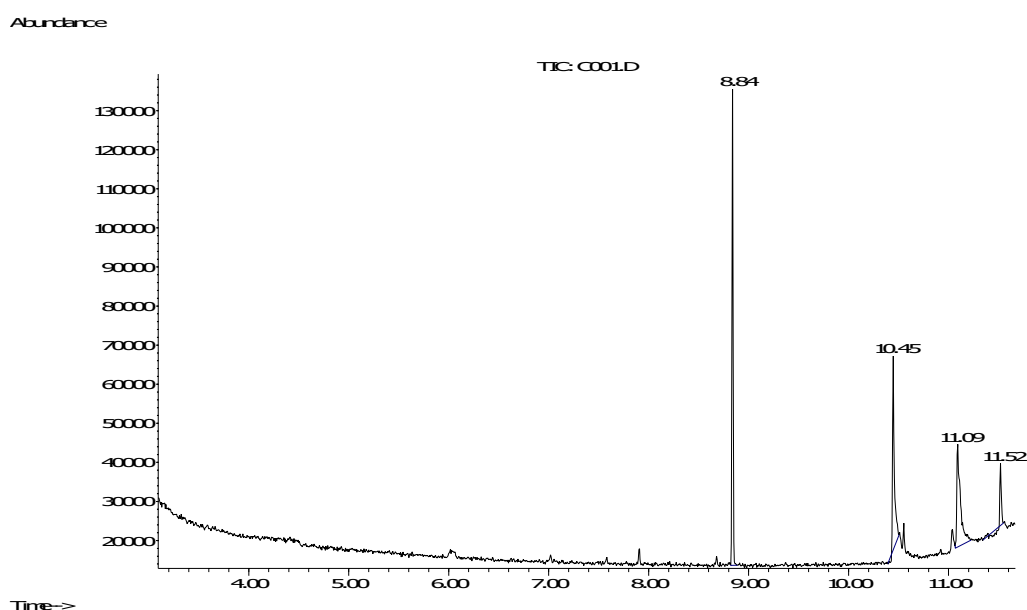


Figure 1 GC chromatogram of BHT detected from a palm oil extract.

Table 1 Content of BHT detected in the palm oil samples by GC-MS

Palm oil Sample #	BHT ($\mu\text{g/g}$)			
	1	2	3	Mean $\pm$ SD
(1)	85.9	86.1	86.2	86.1 $\pm$ 0.2
(2)	18.0	18.0	18.1	18.0 $\pm$ 0.1
(3)	6.8	6.7	6.8	6.8 $\pm$ 0.1

Note: BHT was not detected in other oil samples including 4 palm oil samples, 4 soybean, 2 corn oil, 2 black sesame oil, 1 rice bran oil, 1 cotton seed oil and 1 sunflower seed oil sample(s).

antioxidants (natural or synthetic) used in various products.

Cooking such as deep frying, boiling in water and stir-frying methods could affect BHT content in the oil. This study demonstrated that deep frying was the best method to decrease BHT from 100% to 46% at 5 min and 62% at 15 min. Heating of oil in boiling water and stir-frying could de-

crease the BHT to about 24-31% within 1-15 min. In other study, temperature can drastically affect the commercial antioxidants. BHT is effective as antioxidants at temperatures up to 175 °C and exhibiting only 25 to 30% inactivation.⁸

In conclusion, BHT in oil samples was generally safe for consumption and we found only one sample contained BHT over the limit. The maximum level of BHT limited by Thai Food Regulations (Ministry of Public Health, Thailand) is 75 mg/kg of BHT for edible fats and oils. This method should be applied for effective analysis of BHT antioxidant in other vegetable oils, edible fats and toxic residues in foods. One of the important applications of GC-MS was for identifying compounds using both the retention times and the relative abundances of the characteristic fragment ions, thus increasing accuracy and providing reliable results. Cooking temperatures and time as well as cooking method affected BHT contents in foods.

Table 2 DPPH radical scavenging activity of edible vegetable oils (mean $\pm$ SD)

Samples	DPPH radical scavenging activity (%)	Gallic acid equivalent (mg/g)	BHT equivalent (mg/g)
Palm oil (1)	48.9 $\pm$ 0.1	42.5 $\pm$ 0.1	111.7 $\pm$ 0.3
Palm oil (2)	43.1 $\pm$ 0.1	37.5 $\pm$ 0.0	98.3 $\pm$ 0.0
Palm oil (3)	75.8 $\pm$ 0.1	65.9 $\pm$ 0.1	173.0 $\pm$ 0.3
Palm oil (4)	43.2 $\pm$ 0.1	37.6 $\pm$ 0.1	98.5 $\pm$ 0.2
Palm oil (5)	40.2 $\pm$ 0.1	35.0 $\pm$ 0.1	91.7 $\pm$ 0.2
Palm oil (6)	45.1 $\pm$ 0.1	39.2 $\pm$ 0.2	102.9 $\pm$ 0.4
Palm oil (7)	45.5 $\pm$ 0.1	39.6 $\pm$ 0.1	103.8 $\pm$ 0.2
Soybean oil (1)	14.9 $\pm$ 0.0	13.0 $\pm$ 0.1	33.8 $\pm$ 0.1
Soybean oil (2)	18.5 $\pm$ 0.0	16.1 $\pm$ 0.1	42.3 $\pm$ 0.1
Soybean oil (3)	19.3 $\pm$ 0.1	16.8 $\pm$ 0.2	44.0 $\pm$ 0.4
Soybean oil (4)	13.6 $\pm$ 0.2	11.8 $\pm$ 0.2	31.1 $\pm$ 0.7
Corn oil (1)	7.5 $\pm$ 0.0	6.5 $\pm$ 0.1	17.2 $\pm$ 0.1
Corn oil (2)	14.8 $\pm$ 0.0	12.9 $\pm$ 0.1	33.7 $\pm$ 0.1
Black sesame oil (1)	20.7 $\pm$ 0.1	18.0 $\pm$ 0.1	47.1 $\pm$ 0.3
Black sesame oil (2)	25.2 $\pm$ 0.1	21.9 $\pm$ 0.1	57.5 $\pm$ 0.2
Rice bran oil (1)	30.3 $\pm$ 0.1	26.4 $\pm$ 0.2	69.1 $\pm$ 0.5
Cotton seed oil (1)	7.8 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.2	17.8 $\pm$ 0.4
Sunflower seed oil (1)	9.7 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.3	22.1 $\pm$ 0.7

Table 3 Stability of BHT in 3 different cooking conditions

Cooking condition	BHT (%)				Loss of BHT (%)			
	0 min	1 min	5 min	15 min	0 min	1 min	5 min	15 min
Deep fried	100	-	54	38	0	-	46	62
Boiled	100	-	73	69	0	-	27	31
Stir-fried	100	76	71	-	0	24	29	-

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University for providing laboratory facilities and Miss Rungtip Kavaree for BHT analysis.

REFERENCES

1. Pinho O, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP, *et al.* Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pâtés. *Food Chem* 2000; 68:353-7.
2. Xiu-Qin L, Chao J, Yan-Yan S, *et al.* Analysis of synthetic antioxidant and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chem* 2009; 113:692-700.
3. Umemura T, Kodama Y, Hioki K, *et al.* Butylated hydroxytoluene (BHT) increases susceptibility of transgenic rasH2 mice to lung carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 217:583-90.
4. Witschi HP. Promotion of lung tumors in mice. *Environ Health Perspect* 1983; 50:267-73.
5. Yang M-H, Lin H-J, Choong Y-M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Res Int* 2002; 35:627-33.
6. Erasto P, Grierson DS, Afolayan AJ. Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina* growing in South Africa. *Food Chem* 2007; 104:636-42.
7. Miraliakbari H, Shahidi F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem* 2008; 111:421-7.
8. Sanhueza J, Nieto S, Valenzuela A. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. *JAOCS* 2007; 77: 933-6.

บิวทิเลตเตตไฮดรอกซีโทลูอิน ในน้ำมันพืชสำหรับบริโภคที่มีจำหน่ายในตลาดของเชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน และความคงตัวต่อความร้อนในสภาวะการปรุงอาหารที่แตกต่างกัน

ชนนัช ลิขิตรุ่งรัตน์¹, นันทฤทธิ์ โชคถาวร¹, และไมตรี สุทธจิตต์²

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่ 50290

² สำนักวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร วิทยาเขตพะเยา, พะเยา 56000

บทคัดย่อ

บิวทิเลตเตตไฮดรอกซีโทลูอิน (บีเอชที) ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับป้องกันการออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งทำจากไขมันและน้ำมันเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณของบีเอชทีในน้ำมันสำหรับบริโภค ซึ่งมีจำหน่ายในตลาดท้องถิ่น 25 แห่งของจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี พบว่าน้ำมันปาล์มจำนวน 3 ตัวอย่างมีบีเอชที 6.8-86.1 ไมโครกรัม/กรัม การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย 1,1-ไดฟีนิล-2-พิกริลไฮดราซิล (ดีพีพีเอช) พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 7.5 ถึง 75.8% เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกและสารมาตรฐานบีเอชทีเทียบเท่าระดับ 6.5 ถึง 65.9 ไมโครกรัม/กรัมของกรดแกลลิกและ 17.2 ถึง 172.7 ไมโครกรัม/กรัมของบีเอชทีตามลำดับ การทดสอบผลของวิธีการหุงต้มต่อความคงตัวของบีเอชทีในตัวอย่างน้ำมันปาล์ม 3 วิธีการ พบว่าอุณหภูมิการหุงต้มอาหาร 98-100 °C เป็นเวลา 1-15 นาที สามารถลดความเข้มข้นของบีเอชทีในน้ำมันได้ร้อยละ 24-31 โดยวิธีการต้มหรือผัดในน้ำมัน ขณะที่การทอดในน้ำมันที่อุณหภูมิสูง 200±10 °C เป็นเวลา 5-15 นาที สามารถลดบีเอชทีในน้ำมันได้มากถึงร้อยละ 46-62

คำสำคัญ: บีเอชที, น้ำมันพืชสำหรับบริโภค, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DNA Extraction from Buccal Cells for Determination of Nucleotide Polymorphism at rs 1800497 Position in Dopamine D2 Receptor Gene

Pitsinee Inthi¹, Manit Srisuraphanont², Surinporn Likhitsatien², Lertlakana Bhoopat³, and Tanin Bhoopat^{1*}

¹ Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

² Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

³ Department of Pathology Faculty of Medicine, Chiang Mai University

ABSTRACT

Substance use disorder is influenced by complex genetic and environmental factors. Many studies found that genetics may play an important role in the development of alcohol dependence. Twin and family history studies revealed that genetics affect a heritability of alcoholism approximately 50-60%. The neurotransmitter in brain especially dopamine may associate with rewarding system that might increase risk in alcohol dependence. The dopamine D2 receptor gene (*DRD2*) allelic status may influence on development of alcohol dependence due to the change in number of receptor. This study aimed to demonstrate that buccal cells could be used as an alternative source of DNA for PCR-RFLP based method to determine the allelic status of *DRD2*. The DNA samples were extracted from buccal cells using proteinase K and 5% chelex solution, then amplified by PCR method with some modification of the primer sequence. The optimization for annealing temperature was performed. Our PCR system using an annealing temperature at 56 °C yielded the most specific amplified DNA of approximately 200 ng/μl. The PCR product was digested with TaqI restriction enzyme at 65 °C overnight. The digested product was separated in 8.5% polyacrylamide gel electrophoresis for genotyping.

Keywords: Alcohol dependence, PCR-RFLP, *DRD2*, buccal cells.

INTRODUCTION

Many studies found that addictive behaviour are influenced by genetics and environmental factors. Twin and family history studies revealed that genes may play a role in substance dependence including 50 % to 60 % of alcohol dependence linked to genetic factor.^{1,2} Genetic effects may contribute to the alcohol susceptibility in individu-

als. It is suggested that neurotransmitter in brain may associate to the alcohol dependence development. In the family with positive history of alcoholics, the biological offspring have 3-5 folds risk to develop alcohol dependence in adolescence than the negative family.^{1,3} The individual difference in alcohol susceptibility may be a result of DNA variation called DNA polymorphism that might affect protein structure or function. The difference region and pattern of DNA polymorphism can effects protein synthesis and its quality.⁴

The mesocorticolimbic dopamine system in ventral tegmental area (VTA) of the brain may plays important role on brain reward mechanism^{5,6} and

* Corresponding author:
Professor Dr. Tanin Bhoopat
Department of Forensic medicine,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand 50200
E-mail: tbhoopat@mailmed.cmu.ac.th

associate with addictive behaviour. The addictive drugs including alcohol can overstimulation dopamine release in nucleus accumbens (NAC) reinforce the user to repeat drug administration. The chronic overstimulation of dopamine causes drug tolerance, followed by addiction.^{7,8}

The studies of 5 dopamine receptor gene (*DRD1-DRD5*) found that dopamine D2 receptor gene (*DRD2*) located on chromosome 11 q22-23 is associated with alcohol dependence.⁹ The polymorphism at TaqI A site (rs1800497 in dbSNP; C/T) A1 allelic status (TT or TC genotype) prevalence is significantly higher in alcoholic patients than control group.¹⁰ Many studies were performed in different ethnic group show the similar result. For the Asian population¹¹ also found more prevalence of A1 allele in Japanese alcoholic patients than the control group. Besides that the prevalence of A1 allele was also correlated with the severity of the disease.

Most studies for A1 allele determination in *DRD2* were conducted by using DNA extraction from blood.^{11,12} Since buccal cell is more simple to collected with non-invasive method, it should be used as a source of DNA for the test. We demonstrated the technique for determination of polymorphism at TaqI site of *DRD2* using buccal cells as a sample of choice.

MATERIALS AND METHODS

Buccal cell collection

The buccal cells samples were collected from the volunteers by scraping (about 10 times) the oral mucosa with the blunt end of a toothpick. The sample was soaked with 1 ml sterile distilled water in the 1.5 ml centrifuge tube and stored in -20°C until extraction.

DNA extraction from buccal cells

The samples were thawed at room temperature

then centrifuged for 1 min at 14,000 xg. After the supernatant was discarded, the pellet was washed with 1 ml of sterile distilled water for 3 times and then 290 µl of sterile distilled, 5 µl of proteinase K solution (1 mg/ml; Sigma, USA) and appropriate amount of chelex resin (Sigma, USA) were added. The sample tubes were incubated at 55°C for 60 min. After the buccal cells were completely digested, samples tubes were reincubated at 100°C for 8 min. The sample were centrifuged at 14,000 xg for 1 min then stored at 4°C until amplification.

DNA amplification

The extracted DNA was used as a template for the polymerase chain reaction method (PCR) by the procedure previously described^{1,2,13} with some modification of primer sequence as followed (Invitrogen USA): forward primer: 5'ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA 3', reverse primer: 5' CCT TCC TGA GTG TCA TCA AC 3'. PCR was performed in a final volume of 20 µl and carried out in a mastercycler ep (Eppendorf Germany). About 2 µl of extracted DNA were used as a template in a final volume of 20 µl containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTPs, 0.01% BSA, 0.05% Tween 20, 0.5 Unit of Taq DNA polymerase and 0.25 µM of each primer (Invitrogen USA). To optimize the reaction, we have performed PCR using different annealing temperature ranging from 50-57°C. The PCR products were checked for 310 bp product by 2% agarose gel electrophoresis.

Genotyping

The amplicon was digested with TaqI restriction enzyme (Invitrogen USA) at 65°C overnight and then separated by 8.5% polyacrylamide gel electrophoresis. The 3 different genotypes of the polymorphic site were revealed as: A1A1 (TT) genotype will be separated as a single undigested fragment, for the heterozygous genotype (CT) will

show 3 fragments of 130, 180 and 310 bp and the A2A2 (CC) genotype will be revealed as 2 fragments of 130 and 180 bp.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimal annealing temperature

The PCR was conducted with different annealing temperatures according to the following protocol: 94°C 2 min, 94 °C 30 sec, annealing temperature ranging from 50-57°C for 30 sec and 72 °C 1 min 30 sec. The optimal annealing temperature was around 56°C as shown in Figure 1. The brightest band was found in lane 10 with the lowest signal of background.

DNA quantitation

The PCRs were performed using extracted DNA from 6 volunteers. The amplicons were quantitated using UV spectrophotometry. 250 µl mixture containing 10 µl of amplified DNA and 240 µl of ultrapure water (1:25 dilution) was filled in cuvette and measured the absorption at 260 nm (A260). Approximately 200 ng/µl of product was yielded (Table 1 and Figure 2). The amplified DNA concentration was calculated using the formula:

DNA concentration (ng/µl)

$$= A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50$$

*Absorbance at 260 nm

$$= 1.0 \text{ equals to } 50 \text{ ng/ } \mu\text{l of DNA concentration}$$

Genotyping

The A2A2 (CC) genotype was used as the pilot sample to test for completeness of restriction enzyme digestion. Approximately 1,600 ng of amplicon was digested in 4 different amounts of TaqI restriction enzyme (Invitrogen, USA). To the target DNA 8, 4, 2 and 1 Unit of restriction enzyme and 1x react 2 buffer were added to make a final volume of 30 µl. The reaction tubes were incubated at 65°C overnight. Digested product was separated by

Lane 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Temp °C 50.1 50.3 50.7 51.3 52.0 52.8 53.7 54.6 55.4 56.0 56.5 56.8

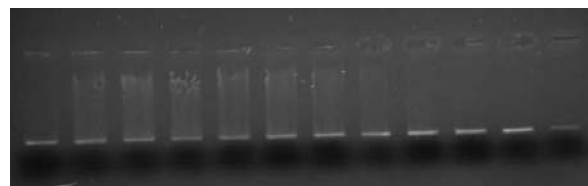


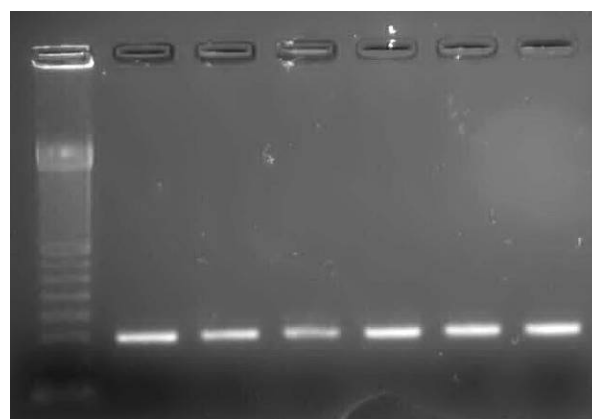
Figure 1 PCR products with different annealing temperature

Table 1 Concentration of amplified DNA from 6 volunteers.

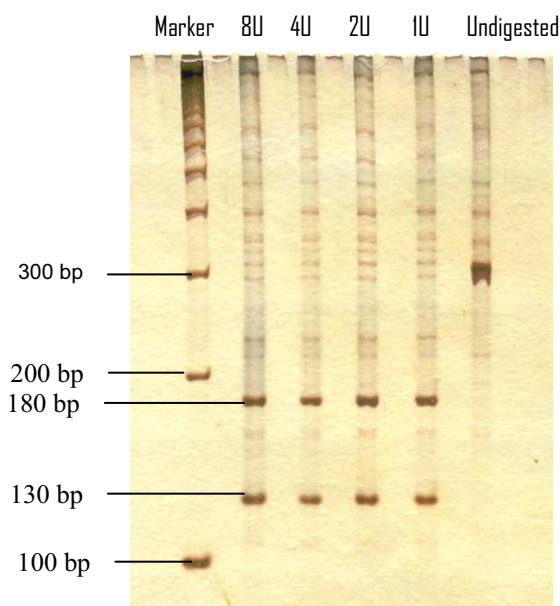
Sample	Absorbance at 260 nm (A260)	Concentration (ng/µl)
S1	0.166A	207.5
S2	0.153A	191.25
S3	0.149A	186.25
S4	0.162A	202.5
S5	0.168A	210.0
S6	0.160A	200.0

Figure 2 The 310 bp amplicon from 6 volunteers in 2% agarose gel electrophoresis

Marker S1 S2 S3 S4 S5 S6



8.5% polyacrylamide gel electrophoresis. It revealed 2 bands of 130 and 180 bp compared to 310 bp of undigested product. We found the minimal amount of TaqI restriction enzyme that

Figure 3 PCR-RFLP analysis of A2A2 genotype

could digest 1,600 ng of DNA completely was about 1 Unit as shown in Figure 3.

The study shows effectiveness of using buccal cell samples to determine TaqI A1 allele of *DRD2*. Since the way to collect buccal cell is simpler and inexpensive. DNA from buccal cell yields enough quantity suitable for PCR. Therefore, we encourage using buccal cells as a sample of choice in detection of alcohol related gene.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to all staff at Department of Forensic: Toxicology Unit for their supported facilities and training.

REFERENCES

- McGue M. The behavioral genetics of alcoholism. *Curr Directions Psychol Sci* 1999; 8: 109–15.
- Dick DM, Foroud T. Candidate genes for alcohol dependence: a review of genetic evidence from human studies. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 868-79
- Cotton NS. The familial incidence of alcoholism: a review. *J Stud Alcohol* 1979; 40: 89–116.
- Kelada SN, Eaton DL, Wang SS. The role of genetics polymorphisms in environmental health. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1055-64.
- Tupala E, Tiihonen J. Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 1221-47.
- Kohnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharm* 2008; 75: 160-77.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience: exploring the brain. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins 2007: 501-8, 522-31.
- Chandler LJ. Ethanol and brain plasticity: receptor and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. *Pharmacol & Therap* 2003; 99: 311-26.
- Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 1990; 263: 2055-60.
- Amadeo S, Abbar M, Fourcade ML, et al. D2 dopamine receptor gene and alcoholism. *J Psychiatr Res* 1993; 27: 173-9.
- Arinami T, Itokawa M, Komiyama T, et al. Association between severity of alcoholism and the A1 allele of the dopamine D2 receptor gene TaqI A RFLP in Japanese. *Biol Psychiatry* 1993; 33: 108-14.
- Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Human Molec Genet* 1993; 2: 2197.
- Noble EP. The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes. *Alcohol* 1998; 16: 33-45.

การสกัดสารพันธุกรรมจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มเพื่อใช้ตรวจสอบภาวะพิษ ฐานของนิโคติโอไทด์ที่ตำแหน่ง rs 1800497 ในยีนตัวรับโดปามีนชนิดที่ 2

พิชญ์สินี อินติ¹, มานิต ศรีสุรภานนท์², สุรินทร์พร ลิขิตเสถียร², เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์³

และธานินทร์ ภูพัฒน์^{1*}

¹ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ² ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

เป็นที่ยอมรับกันว่าการติดสารเสพติดส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการพันธุกรรมที่ซับซ้อนและผลจากสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาพบว่าพันธุกรรมอาจเกี่ยวข้องกับการติดสุราเรื้อรัง จากการศึกษาเปรียบเทียบในฝาแฝดและประวัติครอบครัวพบว่าพันธุกรรมมีผลถึงร้อยละ 50-60 ที่จะเพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการติดสุราเรื้อรังในอนาคต สารสื่อประสาทในสมองที่เรียกว่าโดปามีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับความรู้สึกพึงพอใจหรือ rewarding system อาจมีผลต่อความเสี่ยงของการติดสุราเรื้อรัง สาเหตุอาจเกิดจากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการเกิดภาวะพิษฐานบนยีนตัวรับโดปามีนชนิดที่ 2 ที่อาจมีผลต่อจำนวนตัวรับในสมองทำให้แต่ละบุคคลมีความเสี่ยงต่อการติดสุราเรื้อรังได้ต่างกัน การศึกษานี้เสนอทางเลือกในการใช้เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มเพื่อศึกษาภาวะพิษฐานของยีนบนตำแหน่งดังกล่าวด้วยวิธี PCR-RFLP โดยทำการสกัดสารพันธุกรรมจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้วยเอนไซม์ proteinase K และสารละลาย 5% chelex จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR จากการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ annealing พบว่าที่ 56 องศาเซลเซียสจะให้ PCR product ที่เหมาะสมที่มีความเข้มข้น 200 ng/μl นำ PCR products ไปแช่อบที่ 65 องศาเซลเซียสพร้อมกับ TaqI restriction enzyme ข้ามคืน จากนั้นจึงตรวจสอบลักษณะของจีโนไทป์ด้วย 8.5% polyacrylamide gel electrophoresis.

คำสำคัญ: การติดสุราเรื้อรัง, PCR-RFLP, *DRD2*, เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

* Corresponding author:

ศ.นพ. ธานินทร์ ภูพัฒน์
ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
E-mail tbhoopat@mailmed.cmu.ac.th

การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการประเมินการเกิด อะฟลาทอกซินในข้าวโพดไทยที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ ตอนที่ 1 การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์

อนงค์ บิณฑวิหค,^{1*} ศุภวิน วัชรมูล,² วิสุทธิ นวลชื่น,³ สุพิชญา ตรีบุญเมือง,³ กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ,³
กรณิศ พัฒนชัย,¹ และสังวร อยู่สว่าง³

¹ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ประเทศไทยพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างอะฟลาทอกซินและมักพบปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพดที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาวิธีการประเมินผลการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ ด้วยวิธี ELISA และ PCR-RFLP จากการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดจำนวน 200 ตัวอย่างจากแหล่งปลูกในไร่และโรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่น 5 จังหวัดคือ ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ นำมาตรวจวิเคราะห์หาสารพิษปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปวิธีไอโซล่า และนำตัวอย่างข้าวโพดที่ตรวจพบและไม่พบอะฟลาทอกซิน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มไม่พบอะฟลาทอกซิน กลุ่มตรวจพบอะฟลาทอกซิน มากกว่าและน้อยกว่า 20 ppb ตามลำดับ นำตัวอย่างข้าวโพดมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีมากพอที่จะทำพีซีอาร์ทั้ง 3 กลุ่ม นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วย 2% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตัดด้วยเอนไซม์ *HincII* และ *PvuII* จากผลการศึกษาพบว่าข้าวโพดจากแหล่งปลูกในไร่ จำนวนตัวอย่างที่พบอะฟลาทอกซินปี 1 ร้อยละ 40-100 มากกว่าข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อค้าท้องถิ่น ร้อยละ 25-50 แต่มีปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่พบในข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อค้าท้องถิ่น (12-172 ppb) สูงกว่าข้าวโพดจากแหล่งปลูกในไร่ (2-6 ppb) ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนอะฟลาทอกซินได้ทั้ง 3 กลุ่ม

Keywords: อะฟลาทอกซิน ข้าวโพด เทคนิคพีซีอาร์

* Corresponding author:

รศ สพ.ญ. ดร. อนงค์ บิณฑวิหค

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

E-mail: anong_vet@yahoo.com

บทนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เกิดจากเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) และแอสเพอร์จิลลัส พาราซิติกัส (*Aspergillus parasiticus*) สำหรับประเทศไทยมักพบ *A. flavus* ปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพดที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งเชื้อราเจริญได้ดี เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูงกว่าร้อยละ 85 และโดยธรรมชาติสามารถเกิดอะฟลาทอกซินขึ้นในพืชผลได้ตั้งแต่ในไร่ ยุ้งฉางเกษตรกร โรงเก็บของพ่อค้าและไซโลท้องถิ่น และเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ หลังจากการสีและการเก็บในโรงเก็บสินค้า^{1,2}

วิธีการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในวัตถุดิบทางการเกษตร ใช้วิธีทางเคมี เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งต้องใช้สารเคมีอันตรายจำนวนมาก ใช้เวลาตรวจนานหลายวัน และต้องมีความชำนาญสูงในการตรวจสอบ ส่วนการใช้วิธีทางอิมมูโน เช่น Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ต้องใช้สารเคมีก่อมะเร็งในกระบวนการตรวจสอบ³⁻⁶ สำหรับการตรวจหาเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธีจุลชีววิทยา ใช้เวลาตรวจนานหลายวัน มักพบเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราอื่นๆ ปนเปื้อนร่วมด้วย เชื้อราแต่ละสายพันธุ์ แต่ละ isolates มีคุณสมบัติแตกต่างกัน การสร้างและลักษณะของ sclerotia ไม่สัมพันธ์กับการสร้างอะฟลาทอกซิน¹ โดยวิธีเหล่านี้ไม่สามารถตรวจหาพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อราจำเพาะ ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญของการสร้างอะฟลาทอกซินได้

การศึกษาวิจัยด้านการปนเปื้อนเชื้อราในอาหารด้วยเทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์ มีแตกต่างกันหลายวิธี ทั้งการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและการจำแนกสายพันธุ์ อาทิ การศึกษาวิจัย ชนิด

ของ *aflR* gene ที่แตกต่างกันของสายพันธุ์ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP^{7,8} โดยการศึกษาระดับของเชื้อราที่เกิดขึ้น และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของวัตถุดิบและสามารถบ่งบอกถึงความรุนแรงของการเกิดอะฟลาทอกซินได้^{9,10}

จากการตรวจหา หรือจำแนกเชื้อราในอาหารแบบดั้งเดิม มีการศึกษาทั้งทางด้านจุลชีววิทยาและใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในห้องปฏิบัติการที่จำเพาะ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการตรวจหาเพื่อความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น เพื่อให้สามารถประเมินคุณภาพของการปนเปื้อนในอาหารได้ ซึ่งเทคนิคทางด้านพีซีอาร์นี้เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีความไว และมีความจำเพาะต่อการจำแนกเชื้อราที่สร้างและไม่สร้างอะฟลาทอกซิน^{11,12} โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Aspergillus* ได้มีการศึกษาในต่างประเทศถึงการจำแนกขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ที่มีความแตกต่างของสายพันธุ์^{12,13} การศึกษาดีเอ็นเอของเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินในประเทศไทยนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา และวิเคราะห์หาเชื้อราที่ก่อให้เกิดอะฟลาทอกซิน และมีการปนเปื้อนในพืชวัตถุดิบอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ด้านอื่นๆ ได้ต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบอะฟลาทอกซินในข้าวโพดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดที่เกิดการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่จะเพิ่มประสิทธิผล ความแม่นยำในการตรวจสอบและประเมินผลการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดรวม 200 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบหลายขั้นตอน จากแหล่งเพาะปลูกในไร่ และโรงเก็บข้าวโพดของพ่อค้าในท้องถิ่นของ 5 จังหวัดในประเทศไทย คือลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ จังหวัดละ 40 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธี ELISA

ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพด 200 ตัวอย่าง โดยสกัดตัวอย่างและวัดหาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป DOA-Aflatoxin ELISA Test kit ซึ่งใช้หลักการ direct competitive ELISA ได้ค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่างระดับ ng/g หรือ ng/ml (ppb)

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวโพดบด

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่เก็บมาบดให้ละเอียดปริมาณ 10 - 25 mg นำไปสกัดดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kit "Geneaid" และทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 2% gel electrophoresis แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

PCR amplification

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ทำการตรวจ สอบว่าพบการปนเปื้อน หรือไม่พบการปนเปื้อนด้วยวิธี ELISA มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยขั้นตอนพีซีอาร์ (PCR) ทำการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์เพื่อให้ได้ product สำหรับนำมาศึกษาถึงลักษณะผลที่เกิดขึ้นด้วยการ

นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไปได้ โดยจะนำตัวอย่าง 2 ng มาเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA โดยใช้ความเข้มข้นของ primers (forward และ reverse) 10 uM, dNTPs 0.2 mM, 1.5 mM MgCl₂ และ Taq DNA polymerase จำนวน 1 unit และ PCR condition คือ pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที, denaturation 94°C นาน 18 วินาที, vary annealing 50° - 60°C นาน 1 นาที 15 วินาที, และ extension 72°C นาน 1 นาที 24 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วย 72°C นาน 10 นาที primers ที่ใช้ในการตรวจสอบ¹⁴ คือ *aflR* -1, 5'- AAC CGC ATC CAC AAT CTC AT -3', *aflR* -2, 5'- AGT GCA GTT CGC TCA GAA CA -3'.

การตรวจสอบผล

หลังจากทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะในขั้นตอนพีซีอาร์แล้ว ทำการตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่ได้ปริมาตร 10 ul มาแยกขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2% ในบัฟเฟอร์ 1xTBE (45 mM Tris, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA) ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์ -ไฟฟ้า 100 V เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เปรียบ- เทียบด้วยขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) ย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งมีความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นเวลานานประมาณ 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาประมาณ 30 นาที และบันทึกผลด้วย UV transilluminator

ผลการวิจัยและอภิปราย

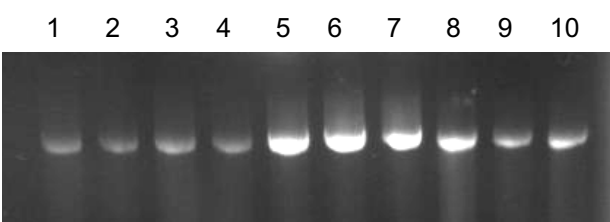
ผลการตรวจอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดรวม 200 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบ

หลายขั้นตอนจากแหล่งปลูกในไร่ และโรงเก็บพ่อดำ ท้องถิ่นของ 5 จังหวัด คือ ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ จังหวัดละ 40 ตัวอย่าง โดยสกัดตัวอย่างและวัดหาปริมาณอะฟลาทอกซิน ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปวิธีอีไลซ่า พบว่าตัวอย่างข้าวโพดจากไร่ในจังหวัดลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ ตรวจพบอะฟลาทอกซินร้อยละ 100, 65, 40, 80 และ 100 ตามลำดับ ในปริมาณ 2 – 6 ppb ส่วนตัวอย่างข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อดำท้องถิ่น ตรวจพบอะฟลาทอกซินร้อยละ 45, 25, 30, 40 และ 50 ตามลำดับ ในปริมาณ 12 - 172 ppb เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ในข้าวโพดไทยซึ่งตรวจด้วยวิธี HPLC พบการปนเปื้อนสูงเช่นกัน คือ ร้อยละ 83.3 ของตัวอย่างที่ตรวจ (~ 72 ng/g)¹⁵

ผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดบด

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดพบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 20-60 นาโนกรัม และเมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis ได้ผลดังรูปที่ 1

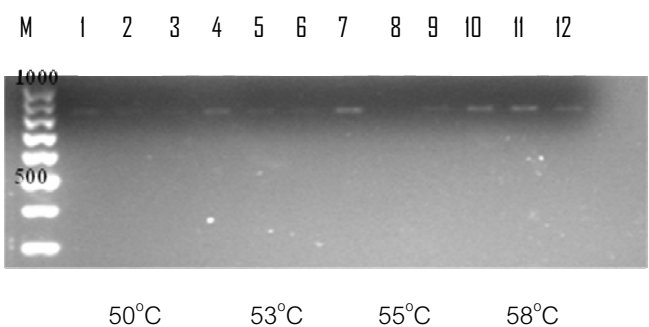


รูปที่ 1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวโพดบด 0.1 กรัม โดยเลน 1 - 4 เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดที่พบอะฟลาทอกซินปนเปื้อนมาก (12-172 ppb), เลน 5 - 7 เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดที่พบสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนน้อย (2-6 ppb) และเลน 8 - 10 เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดที่ตรวจไม่พบอะฟลาทอกซิน

ผลการศึกษาการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์

หลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอ และนำมาทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มตำแหน่งที่จำเพาะต่อสารอะฟลาทอกซิน พบว่าในการศึกษาครั้งแรกๆ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มข้นสูงมากเกินไป และใช้ความเข้มข้นของ primer น้อยเกินไป (10 pM) เมื่อทำการปรับสภาวะความเข้มข้นของส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ใหม่ โดยทำการเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอใหม่ เป็น 1:5 - 1:15 จากเดิม และปรับใช้ primer ที่ 10 uM ในปฏิกิริยาโดยทำการศึกษาความแตกต่างที่อุณหภูมิ annealing ตั้งแต่ 50°C- 60°C ผลที่ได้พบว่า ได้ PCR product จากการทำพีซีอาร์ที่สภาวะเหมาะสม (รูปที่ 2) และได้ความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 58°C จากตัวอย่างที่เจือจางทั้ง 1:5 -1:15 ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ คือ primers (forward และ reverse) 10 uM, template 1 ul, dNTP 4 ul, 10x pcr buffer 2.5 ul, *Taq* polymerase 0.5 ul ในปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ul.

การศึกษาวិธีการประเมินผลการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อให้ทราบถึงที่



รูปที่ 2 PCR products (800 bp) ที่ได้หลังการปรับสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิต่างๆ

มาของผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ก่อนทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อบ่งบอกถึงลักษณะผลที่ได้ว่า แตกต่างกันหรือไม่ในเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งจะพบว่าการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์นี้ มีความสำคัญทุกขั้นตอน ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ การทำพีซีอาร์ จนกระทั่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งต้องมีการปรับสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมทุกขั้นตอน จากการศึกษาพบว่า การสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเมล็ดข้าวโพด ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากพอ สำหรับนำไปศึกษาขั้นตอนพีซีอาร์ และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มชิ้นส่วนจำเพาะในขั้นตอนพีซีอาร์ พบว่าต้องมีการปรับสภาวะที่เหมาะสมหลายครั้ง เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เหมาะสม เพื่อนำไปศึกษาด้วยการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป อย่างไรก็ตามในการศึกษาคั้งนี้ยังต้องมีการปรับความเหมาะสมในการตัดเอนไซม์เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจะเป็นผลที่จะนำไปวิเคราะห์ถึงความแตกต่างของลักษณะเฉพาะของตัวอย่างข้าวโพดที่พบ และไม่พบสารปนเปื้อนในโอกาสต่อไป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของการศึกษาขั้นตอนเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งเป็นการศึกษาถึงผลของการตัดเอนไซม์ สำหรับการบ่งบอกลักษณะเฉพาะตัวของผลการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน เพื่อประยุกต์ใช้ในการประเมินผลการปน-เปื้อนอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ในอนาคต และเพื่อให้สามารถใช้เป็นแนวทางเลือกหนึ่ง สำหรับการตรวจสอบสารปนเปื้อนในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์ใน ทางปศุสัตว์ของประเทศไทยได้

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และองค์การความร่วมมือระหว่างประเทศ แห่งประเทศญี่ปุ่น (JICA). การป้องกันสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพดของประเทศไทย โดยโครงการศูนย์วิจัยการปรับปรุงคุณภาพข้าวโพด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์พันธ์พิบูลย์; 2535.
2. อนงค์ บินทวิหค. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
3. Bintvihok A, Hayashi M. Development of ELISA for aflatoxin B1 detection: preliminary experiment of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B1 in cattle and buffalo sera in Thailand. Recent Advances in Toxicology Research 1991; 3: 233-41.
4. Bintvihok A, Pramoonsinsub T, Hayashi M, *et al.* Production of aflatoxin B1 antibody for ELISA detection in Thailand. Proceedings of 11th Annual Livestock Conference at Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand, September 16-19, 1992: 275-85.
5. Bintvihok A, Sugano K, Intraraksa R, *et al.* Comparative determination of aflatoxin B1 in animal feed by using Densitometer, HPLC and ELISA. Proceedings of 11th Annual Livestock Conference at Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand, September 16-19, 1992: 263-74.

6. Sugano K, Bintvihok A, Thanacharoenwatch P, *et al.* Simple and rapid cleanup method for determination of aflatoxin B1 in mixed feed by sep-pak florisil cartridge. *Proc Jpn Assoc Mycotoxicol* 1993; 37: 43-5.
7. Ehrlich KC, Montalbano BG, Cotty PJ. Sequence comparison of *aflR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genet Biol* 2003; 38: 63-74.
8. Somashekar D, Rati ER, Chandrashekar A. PCR-restriction fragment length analysis of *aflR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *Int J Fd Microbiol* 2004; 93: 101-7.
9. Manuel P, Silvia R, Amparo L. A simple DNA extraction method suitable for PCR detection of genetically modified maize. *J Sci Fd Agri* 2007; 87: 2728-31.
10. Shapira R, Paster N, Eyal O, *et al.* Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3270-3.
11. Chen RS, Tsay JG, Huang YF, *et al.* Polymerase chain reaction mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *A. parasiticus* in peanut kernels by multiplex polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2002; 65: 840-4.
12. Farber P, Geisen R, Holzapfel WH. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int J Food Microbiol* 1997; 36: 215-20.
13. Criseo G, Bagnara A, Bisignano G. Differentiation of aflatoxin production and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 291-5.
14. Rozen E, Skaletsky HJ. Primer 3. Available at http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html, 1997.
15. Yoshizawa T, Yamashita A, Chokethaworn N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit Contam* 1996; 13: 163-8.

ปริมาณไนโตรทีนในแฮมสด แฮนมาย่าง หมูยอ กุนเชียงและไส้กรอกอีสานที่มีจำหน่ายในตลาดของเชียงใหม่

นรารัตน์ ภัทรวารณ และนันท์ฤทธิ์ โชคถาวร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ไนโตรทีนเป็นสารสำคัญของการเกิดไนโตรซามีน ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลายชนิดนิยมใช้ในไนโตรทีนเป็นสารถนอมอาหารเพื่อให้รับประทาน ในงานวิจัยนี้ได้หาปริมาณไนโตรทีนที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ แฮมสด แฮนมาย่าง หมูยอ กุนเชียงและไส้กรอกอีสาน โดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี ผลการศึกษาพบว่าไนโตรทีนในตัวอย่างแฮมสด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 14-173 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); แฮนมาย่างมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 184 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 129-252 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); หมูยอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 66 (มีค่าระหว่าง 29-101 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); กุนเชียงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 154 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 65-238 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); และไส้กรอกอีสานมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 29 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 14-51 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้โซเดียมไนโตรทีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัมสรุปว่าระดับไนโตรทีนในตัวอย่างแฮมย่าง กุนเชียง และแฮมสดบางตัวอย่างมีปริมาณสูงเกินมาตรฐานกำหนด ขณะที่ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ ไส้กรอกอีสานและหมูยอ มีระดับต่ำและปลอดภัยเพียงพอสำหรับการบริโภค

คำสำคัญ: ไนโตรทีน, ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

* Corresponding author:

ผศ. ดร. นันท์ฤทธิ์ โชคถาวร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

E-mail: Nantarit.C@gmail.com

บทนำ

ไนโตรทเป็นสารเจือปนอาหารชนิดหนึ่ง ที่ผู้ผลิตมักนำมาใช้ปรุงแต่งผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะ *Clostridium botulinum* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และยังสร้างสารพิษที่มีอันตรายร้ายแรงอันทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้นอกจากนี้ ไนโตรทยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดงน่ารับประทาน ดังนั้นผู้ผลิตอาหาร เช่น ไส้กรอก กุนเชียง แหนม หมูยอ ฯลฯ จึงนิยมนำมาผสมในผลิตภัณฑ์²

ปัจจุบันอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์แปรรูปนิยมใช้เกลือไนโตรทมากขึ้น ในรูปโซเดียมไนโตรท หรือโพแทสเซียมไนโตรท การใช้ปริมาณที่พอเหมาะจะไม่เป็นอันตราย แต่เมื่อร่างกายได้รับปริมาณเกินขนาด จะมีผลทำให้ออกซิเจนไม่จับเม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อของร่างกายขาดออกซิเจน หายใจไม่ออก เมื่อขาดออกซิเจนมากๆ จะเกิดอาการเนื้อตัวเขียว ปวดท้อง และป่วยหนักได้ ไนโตรทที่รับประทานเข้าไปสามารถทำปฏิกิริยากับเอมีนชั้นทุติยภูมิ และตติยภูมิในร่างกายเกิดสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรงมากต่อดับ³⁻⁴ ปริมาณน้อยที่สุดของไนโตรทที่สามารถก่อให้เกิดไนโตรซามีนในสัตว์ทดลองคือ 20 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 281 กำหนดปริมาณการใช้เกลือไนโตรทและไนเตรทไว้ดังนี้ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอนุญาตให้ใช้โซเดียมไนโตรทในปริมาณไม่เกิน 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โซเดียมไนเตรทใช้ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม กรณีใช้ทั้งโซเดียมไนโตรทและโซเดียมไนเตรทให้มีได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาระดับของไนโตรทที่เจือปนในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์

เนื้อสัตว์แปรรูป 5 ชนิด ได้แก่ แหนมสด แหนมย่าง หมูยอ กุนเชียง และไส้กรอกอีสาน ซึ่งประชาชนทั่วไปนิยมซื้อมารับประทาน และเปรียบเทียบกับปริมาณไนโตรทที่กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดอนุญาตให้มีได้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์เหล่านี้

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและตัวอย่าง

ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide), เอ็น-1-แนฟ-ธิลเอทิลีนไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ [*N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride], โซเดียมไนโตรท (sodium nitrite), กรดแอซิติก (acetic acid), ตัวอย่างแหนมสด แหนมย่าง หมูยอ กุนเชียง และไส้กรอกอีสาน โดยซื้อตัวอย่างจากตลาดสดในอำเภอเมืองและอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ และเก็บ 5 แหล่งจำหน่ายต่อตัวอย่างหนึ่งชนิด

สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรทเตรียมที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 และ 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานโซเดียมไนโตรทขั้นต้น ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่างเนื้อสัตว์

ตัวอย่างเนื้อสัตว์แต่ละชนิด ได้เลือกซื้อจากแหล่งจำหน่ายที่ตลาด (โดย 1 แหล่งจำหน่าย สุ่มเลือกซื้อมา 2 ตัวอย่าง) 5 แหล่งจำหน่ายจึงประกอบด้วย 10 ตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างเนื้อสัตว์ได้ดัดแปลงจากวิธี AOAC⁵⁻⁶ หั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ และสับให้ละเอียดลงในภาชนะแล้วคลุกเคล้า

ให้ทั่ว แบ่งตัวอย่างออกเป็น 8 ส่วน ทำการผสมตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่บดละเอียด 5 กรัมในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดบนเตาไฟฟ้า กรองตัวอย่างผ่านสำลี แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตรพอดี จากนั้นแบ่งสารละลายที่เตรียมได้มาตัวอย่างละ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว (ทำ 2 ข้าง) ดังนั้นตัวอย่างเนื้อสัตว์ 1 ชนิดจาก 1 แหล่ง จำหน่ายจะประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง แล้วนำมาทำให้เกิดสีเพื่อวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งปริมาณไนโตรเจนของ แต่ละตัวอย่าง และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยของ 2 ตัวอย่างที่ได้ผสมเข้ามาพร้อมกัน

การวัดค่าการดูดกลืนแสง

แบ่งตัวอย่างที่เตรียมไว้และสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 และ 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มา 1 มิลลิลิตร เติม 2.50 มิลลิลิตรของ สารละลายซัลฟานิลไมด์ในกรดแอซิติกเจือจาง เขย่าให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิด diazotization ของซัลฟานิลไมด์ จากนั้น เติม 2.50 มิลลิลิตรของสารละลายเอ็น-1-แนฟทิลเอทิลีน ไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ในกรดแอซิติกเจือจาง เขย่าสารในหลอดผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสีของ azo dye แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเทียบกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไนไตรท์ข้างต้น

ผลการวิจัยและอภิปราย

ค่าการดูดกลืนแสงในกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ สำหรับการคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนของ

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่นำมาวิเคราะห์เป็นส่วนโดยตรงกับปริมาณไนไตรท์ และความเข้มข้นของไนไตรท์บนกราฟมาตรฐานอยู่ระหว่าง 0.00 - 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.000 - 0.220 (ซึ่งคำนวณได้ปริมาณโซเดียมไนไตรท์เท่ากับ 0 - 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร พอดี)

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ได้แก่ ตัวอย่างแฮมสดมีไนไตรท์อยู่ระหว่าง 14-173 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82 มิลลิกรัม/

ตารางที่ 1 ปริมาณไนไตรท์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) ในตัวอย่างแฮมสด แฮมย่าง หมูยอ กุนเชียงและไส้กรอกอีสาน

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป (ตัวอย่างที่)	ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร)
แฮมสด 1	173±0	82±58
แฮมสด 2	58±0	
แฮมสด 3	79±7	
แฮมสด 4	86±0	
แฮมสด 5	14±0	
แฮมย่าง 1	252±7	184±50
แฮมย่าง 2	216±0	
แฮมย่าง 3	173±0	
แฮมย่าง 4	129±0	
แฮมย่าง 5	151±7	
หมูยอ 1	79±7	66±27
หมูยอ 2	101±0	
หมูยอ 3	51±8	
หมูยอ 4	29±0	
หมูยอ 5	72±0	
กุนเชียง 1	238±8	154±74
กุนเชียง 2	223±7	
กุนเชียง 3	129±0	
กุนเชียง 4	115±0	
กุนเชียง 5	65±7	
ไส้กรอกอีสาน 1	36±7	29±16
ไส้กรอกอีสาน 2	29±0	
ไส้กรอกอีสาน 3	14±0	
ไส้กรอกอีสาน 4	14±0	
ไส้กรอกอีสาน 5	51±8	

กิโลกรัมอาหาร) แหนมย่างมีไนโตรทอยู่ระหว่าง 129-252 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 184 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) หมูยอมีไนโตรทอยู่ระหว่าง 29-101 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 66 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) กุนเชียงมีไนโตรทอยู่ระหว่าง 65-238 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 154 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) และไส้กรอกอีสานมีไนโตรทอยู่ระหว่าง 14-51 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 29 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร)

เมื่อนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเทียบกับปริมาณที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ คืออนุญาตให้ใช้โซเดียมไนโตรทเจือปนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าตัวอย่างที่เกินมาตรฐานได้แก่ แหนมสด 1 ตัวอย่าง (173 มิลลิกรัม/กิโลกรัม), แหนมย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง (252, 216, 173, 129 และ 151 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ) และกุนเชียง 3 ตัวอย่าง (238, 223 และ 129 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ) แสดงว่าผู้ผลิตและผู้ประกอบการใช้สารนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เกินค่ามาตรฐานกำหนดในการเติมสารเจือปนชนิดไนโตรทไว้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 100 ของตัวอย่างแหนมย่างและร้อยละ 60 ของตัวอย่างกุนเชียงที่นำมาศึกษาครั้งนี้

ในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ผู้บริโภคควรเลือกซื้อผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีเครื่องหมายทะเบียนอาหารของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (เครื่องหมาย อย) และสังเกตคุณสมบัติของอาหารที่เลือก ไม่ควรเลือกผลิตภัณฑ์ที่มีสีส้มมากหรือมีสีแดงเข้มมากเกินไป เนื่องจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เป็นแหนมสด ซึ่งมีจำหน่ายในตลาดของจังหวัดเชียงใหม่ในช่วง 10 ปีต่อเนื่องกันมา พบว่า

แหนมที่มีฉลากทะเบียนอาหารส่วนใหญ่ หรือเกือบทั้งหมดมีปริมาณของไนเตรท และไนโตรทไม่เกินเกณฑ์มาตรฐาน แต่พบตัวอย่างแหนมที่ไม่มีฉลากทะเบียนอาหารและไม่ทราบแหล่งผลิตบางตัวอย่างมีไนเตรทและไนโตรทมากเกินไปกำหนดถึง 16 เท่า ซึ่งนับว่าเป็นอันตรายกับผู้บริโภค ดังนั้นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีไนโตรทเกินมาตรฐานกำหนด ควรจะลดปริมาณโซเดียมไนโตรทให้น้อยลงและไม่เกินกำหนด

อย่างไรก็ตาม เจ้าหน้าที่ของหน่วยงานสาธารณสุขในระดับจังหวัดและระดับภูมิภาค ควรเข้มงวดและเพิ่มความถี่ในการออกเก็บตัวอย่างอาหารเหล่านี้ตามแหล่งจำหน่ายให้มากขึ้นและแพร่หลาย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ แล้วนำผลมาใช้ในการเตือนภัยเกี่ยวกับไนโตรทในอาหารไทย นอกจากนี้เจ้าหน้าที่ของรัฐควรชักชวนและส่งเสริมผู้ประกอบการผลิตเนื้อสัตว์แปรรูปให้ขึ้นทะเบียนอาหารให้ถูกต้อง ซึ่งจะเกิดประโยชน์ในการกำกับดูแลเฝ้าระวัง และควบคุมการเจือปนไนโตรทในอาหาร ให้เกิดความปลอดภัย

ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550 มีรายงานว่านักเรียนที่จังหวัดอยุธยาหลายรายเจ็บป่วยเนื่องจากพิษไนโตรทหลังรับประทานไส้กรอก ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไส้กรอก โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร พบว่ามีปริมาณไนโตรทมากถึง 3,137 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร และเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยมีอาการหน้าซีด เหนื่อย ปากซีดเขียว อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นน้ำและมีภาวะออกซิเจนไม่จับเม็ดเลือดแดง (methemoglobinemia)⁷ ต่อมาสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดทั่วประเทศได้เก็บตัวอย่างอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มาตรวจ

วิเคราะห์ พบปริมาณไนไตรท์เกินกำหนดในไส้กรอก และไกยอสีส้ม และยังพบไนเตรทเกินกำหนดในปลาตากแห้ง กุนเชียงหมู ไส้กรอก และไกยอสีส้ม ในระดับที่สูงมากและเป็นอันตราย

ผลจากการวิจัยการตรวจวิเคราะห์ไนไตรท์นี้ ได้ให้ข้อมูลยืนยันว่า ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปของไทย เช่น แหนมย่าง แหนมสด กุนเชียง ไส้กรอก ไกยอสีส้ม ฯลฯ ควรได้รับความเอาใจใส่ในการเฝ้าระวังให้มีความปลอดภัยกับผู้บริโภคอยู่เสมอ โดยทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องควรร่วมมือกันทั้งภาครัฐและเอกชนอย่างต่อเนื่อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2552

เอกสารอ้างอิง

- Hill MJ. Nitrates and nitrites in food and water. Ellis New York: Horwood; 1991.
- Usher CD, Telling GM. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. *J Sci Food Agric* 1975; 2:1793-1805.
- Funn BS. The effects of nitrate, nitrite and nitrosc compounds on human health: a review. *Vet Hum Toxicol* 1991; 35:521-38.
- Kross BC. Methemoglobinemia, nitrate toxicity in rural America. *Am Fam Physician* 1992; 46:183-8.
- Cunniff P. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Maryland: Gaithersburg; 1995: 8-9.
- Sen NP, Donaldson B. Improved calorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J Assoc Off Anal Chem* 1978; 61: 1389-94.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ศูนย์ข้อมูลด้านอาหาร พิษภัยจากสารโซเดียมไนไตรท์และโซเดียมไนเตรทในอาหาร. Available at http://webdb.dm.sc.moph.go.th/ifc_food/a_fd_4_00t.asp?info_id=518, 2552 (accessed November 13, 2009).

Nitrite Levels in Fresh Fermented Pork Sausage, Grilled Fermented Pork Sausage, Minced Pork Sausage, Chinese-Style Sausage and Sour Pork-Rice Sausage in Markets of Chiang Mai

Patarawan N. and Chokethaworn N.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, 50290, Thailand

ABSTRACT

Nitrite is an important precursor in the formation of nitrosamines, it was commonly used as food additive for several meat products. In this research, determinations of nitrite in 5 types of meat products namely fresh fermented pork sausage, grilled fermented pork sausage, minced pork sausage, Chinese-style sausage and sour pork-rice sausage, were analyzed for nitrite levels by using spectrophotometer. Results demonstrated that the averages of nitrite in fresh fermented pork sausage, grilled fermented pork sausage, minced pork sausage, Chinese-style sausage and sour pork-rice sausage were 82 (range from 14 to 173), 184 (range from 129 to 252), 66 (range from 29 to 101), 154 (range from 65 to 238), and 29 (range from 14 to 51) mg/kg, respectively. The maximum level of sodium nitrite limited by Thai Food Regulations (Ministry of Public Health, Thailand) is 125 mg/kg of nitrite for meat products. In conclusion, nitrite levels in grilled fermented pork sausage and some samples of Chinese-style sausage and fresh fermented pork sausage were higher than maximum allowable concentration, while sour pork-rice sausage and minced pork sausage were lower and safe.

Keywords: Nitrite, meat product

การประเมินสุขาภิบาลการผลิตน้ำตาลมะพร้าวระดับชุมชน ในจังหวัดสมุทรสงคราม

จันทร์ฉาย ประกอบศิลป์, เวณิกา เบ็ญจพงษ์*, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, และวีรยา การพานิช

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

น้ำตาลมะพร้าวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำตาลโสดที่ปาดจากวงมะพร้าวไปเคี่ยว ส่วนใหญ่เป็นการผลิตระดับชุมชนที่มีขนาดเล็ก อาศัยความชำนาญ หรือภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมา แต่กระบวนการผลิตในปัจจุบันเริ่มมีการเปลี่ยนรูปแบบจากเดิม ซึ่งบางขั้นตอนหากไม่มีการควบคุมตามหลักสุขาภิบาลการผลิตอาหารอาจก่อการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์ เพื่อควบคุมการผลิตให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าวที่ปลอดภัยต่อการบริโภค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการประเมินข้อบกพร่องของกระบวนการผลิตน้ำตาลมะพร้าวระดับชุมชน เพื่อเป็นข้อมูลในการควบคุมและปรับปรุงการผลิตน้ำตาลมะพร้าวให้มีความปลอดภัย โดยทำการศึกษากิจการการผลิตน้ำตาลมะพร้าวทั้งกระบวนการ ตั้งแต่การเตรียมน้ำตาลโสดไปจนถึงการเคี่ยวและขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว ในแหล่งผลิตน้ำตาลมะพร้าว 30 รายใน 3 อำเภอของจังหวัดสมุทรสงคราม ผลการศึกษาพบว่า มีหลายขั้นตอนในกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลในเรื่องต่างๆ ดังนี้ 1) สุขลักษณะของสถานที่ผลิต โดยพบว่าที่ตั้งและสภาพแวดล้อมของอาคารผลิตอยู่ใกล้ที่พักอาศัย หรือสถานที่เลี้ยงสัตว์ ไม่มีฝาผนังกันป้องกันฝุ่นละออง 2) อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต พบการเลือกใช้วัสดุที่ไม่เหมาะสม เช่น บรรจุก๊าซหรือภาชนะรองรับน้ำตาลทำจากพลาสติกที่ไม่ทนความร้อน อุปกรณ์ที่พื้นผิวต้องสัมผัสอาหารทำจากวัสดุซึ่งทำความสะอาดยาก เครื่องจักรที่ใช้ในการปั่นน้ำตาลมีการออกแบบไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิต การบำรุงรักษา ทำความสะอาด และจัดเก็บอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไม่ถูกต้องหลักสุขาภิบาล มีการจัดเก็บอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดแล้วปะปนกับอุปกรณ์ที่ยังไม่ได้ทำความสะอาด 3) สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่เหมาะสม ผู้ผลิตส่วนใหญ่นิยมใช้มือเปล่าในการสัมผัสน้ำตาลในขั้นตอนที่น้ำตาลผ่านความร้อนแล้วโดยไม่ทำความสะอาด 4) การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ระหว่างรอจำหน่ายไม่เหมาะสม เช่น ไม่ปกปิดมิดชิด การวางผลิตภัณฑ์บนพื้น ซึ่งข้อบกพร่องดังกล่าวจำเป็นต้องได้รับการแก้ไขปรับปรุงให้เป็นไปตามหลักสุขาภิบาลการผลิตที่ดี จึงจะก่อให้เกิดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว

คำสำคัญ: สุขาภิบาลการผลิต, น้ำตาลมะพร้าว, จังหวัดสมุทรสงคราม

* Corresponding author:

ผศ.ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

Email: nuwbe@mahidol.ac.th

บทนำ

น้ำตาลมะพร้าวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเคี้ยวน้ำตาลใส (หรือน้ำตาลสด) ที่ปาดจากวงมะพร้าว แล้วนำมาเคี้ยวจนได้เป็นน้ำตาลแห้ง บรรจุลงปี๊บ เรียก “น้ำตาลปี๊บ” ขึ้นรูปเป็นก้อน เรียก “น้ำตาลปึก”^{1,2} โดยทั่วไปลักษณะการผลิตน้ำตาลมะพร้าวที่ทำในจังหวัดสมุทรสงครามนั้น มีลักษณะการผลิตระดับชุมชนที่มีขนาดเล็ก ซึ่งผู้ผลิตส่วนใหญ่ยังขาดความรู้ด้านสุขาภิบาลการผลิตอาหาร โดยเฉพาะสถานที่ตั้งและโรงเรือนที่ใช้ผลิต (เตาเคี้ยวตาล) ซึ่งมีพื้นที่จำกัด และขาดการจัดการที่ดี ขาดความเป็นระเบียบในการจัดเก็บอุปกรณ์ มักพบการจัดเก็บอุปกรณ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตในพื้นที่ผลิตตลอดจนปัญหาด้านการทำความสะอาดและการจัดเก็บอุปกรณ์หลังทำความสะอาดไม่เหมาะสม การเลือกใช้อุปกรณ์และบรรจุภัณฑ์ไม่เหมาะสม ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนของสารอันตรายต่างๆ ลงสู่ผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว อันอาจจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 193 (พ.ศ.2543) เรื่องวิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร ตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice; GMP)³ โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนดให้อาหาร 57 ชนิด ต้องมีระบบการผลิตตามหลักเกณฑ์ GMP เพื่อยกระดับสถานที่ผลิตอาหาร⁴ แต่ไม่ครอบคลุมน้ำตาลมะพร้าว อย่างไรก็ตามกระทรวงอุตสาหกรรมได้มีการกำหนดคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์สินค้าระดับชุมชน ตามประกาศสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ฉบับที่ 5 (พ.ศ. 2546) เรื่องการกำหนดมาตรฐาน

ผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำตาลมะพร้าว (มาตรฐานเลขที่ มผช.5/2546)¹ เพื่อใช้ขอการรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์ชุมชนตามความสมัครใจ ทั้งนี้ GMP และ มผช. น้ำตาลมะพร้าว มีหลักเกณฑ์ข้อกำหนดพื้นฐานด้านสุขลักษณะของสถานที่ตั้งและอาคารผลิต เครื่องมือเครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต การควบคุมกระบวนการผลิต การสุขาภิบาล การบำรุงรักษาและการทำความสะอาด รวมทั้งข้อกำหนดด้านบุคลากร และสุขลักษณะผู้ปฏิบัติงานไว้ในทิศทางเดียวกัน ในการป้องกันการปนเปื้อนทั้งด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ลงสู่อาหาร เพื่อให้เกิดความปลอดภัยของอาหาร โดย มผช. น้ำตาลมะพร้าว มุ่งเน้นข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน เหมาะสมกับการผลิตของชุมชน แต่ยังคงรายละเอียดในการดำเนินการที่ผู้ผลิตสามารถเข้าใจ และปฏิบัติตามได้ ดังนั้นการนำหลักสุขาภิบาลการผลิตอาหารมาประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำตาลมะพร้าว ควรมีการประเมินจากรูปแบบการผลิตที่ดำเนินการอยู่ และศึกษาข้อบกพร่องในขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตก่อน เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับกำหนดสุขาภิบาลในการผลิตน้ำตาลมะพร้าวที่สามารถนำไปปฏิบัติได้จริง ทำให้ผู้ผลิตสามารถผลิตได้ตามมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งจะช่วยยกระดับคุณภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าวให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วิธีดำเนินการวิจัย

พื้นที่การศึกษา

ศึกษากระบวนการผลิตน้ำตาลมะพร้าว ตั้งแต่การเก็บน้ำตาลใสซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลมะพร้าว จนถึงการเคี้ยวน้ำตาลที่เตาตาลของกลุ่ม

ผู้ผลิตน้ำตาลมะพร้าว 30 ราย ใน 3 อำเภอ ของ จังหวัดสมุทรสงคราม

การสำรวจข้อมูลการผลิตน้ำตาลมะพร้าว

รวบรวมข้อมูลด้านสุขภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าวจากแหล่งผลิตน้ำตาลมะพร้าวระดับชุมชน โดยการออกภาคสนาม สัมภาษณ์ผู้ผลิตน้ำตาล และ ศึกษาสุขภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าวตลอดทั้ง กระบวนการผลิต ด้านต่างๆ ดังนี้ สถานที่ผลิต และ สภาพแวดล้อม, เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต, กระบวนการเตรียมวัตถุดิบ (น้ำตาลใส), กระบวนการผลิต (การเคี่ยวน้ำตาลที่ เตาเคี่ยวตาล), การบรรจุ และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์, และสุขลักษณะของผู้ผลิต

การวิเคราะห์ข้อมูลด้านสุขภาพการผลิต น้ำตาลมะพร้าว

นำข้อมูลที่พบว่าเป็นข้อบกพร่องด้าน สุขภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าวที่รวบรวมได้มา วิเคราะห์ เพื่อสรุปปัญหาในการผลิตน้ำตาลมะพร้าว ระดับชุมชนร่วมกับกลุ่มผู้ผลิตน้ำตาลมะพร้าว โดย จัดสัมมนากับกลุ่มผู้ผลิตน้ำตาลมะพร้าว เพื่อ วิเคราะห์ปัญหาในการผลิตร่วมกัน และจัดนิทรรศการเพื่อพบปะแลกเปลี่ยนความคิดเห็นกับผู้ผลิตและ ผู้บริโภค

ผลการวิจัย

การลงพื้นที่รวบรวมข้อมูลด้านสุขภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าวในแหล่งผลิตน้ำตาลมะพร้าว ของผู้ผลิตน้ำตาลมะพร้าว เพื่อประเมินข้อบกพร่อง ด้านสุขภาพการผลิต โดยพิจารณาทุกกระบวนการ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำตาลมะพร้าวตลอดทั้ง

กระบวนการ ตั้งแต่การเตรียมวัตถุดิบ การผลิต น้ำตาลมะพร้าวที่เตาเคี่ยวน้ำตาล การขึ้นรูป บรรจุ และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ พบว่ามีข้อบกพร่องด้าน สุขภาพการผลิตน้ำตาลมะพร้าว ดังนี้

1. สถานที่และสภาพแวดล้อมของโรงงานผลิต น้ำตาลมะพร้าว (เตาเคี่ยวตาล)

- ปัญหาด้านสุขภาพในส่วนของที่เกี่ยวข้องกับ สถานที่ผลิต คือ โรงเรือนที่ใช้เคี่ยวน้ำตาล และสภาพแวดล้อมรอบโรงงาน พบข้อ บกพร่องดังนี้
- สถานที่ผลิตหลายแห่งอยู่ใกล้กับที่พักอาศัย ไม่ได้แบ่งแยกการใช้พื้นที่ระหว่างเตาเคี่ยว ตาลและที่พักอาศัยอย่างเป็นสัดส่วนที่ชัดเจน มีการเก็บสิ่งของปะปนกัน ทำให้สภาพแวด- ล้อมรอบโรงงานรกรุงรัง เป็นแหล่งที่อยู่อาศัย ของแมลงรบกวนและสัตว์พาหะนำโรค เช่น แมลงสาบ มด หนู เป็นต้น
- เตาเคี่ยวตาลซึ่งเป็นสถานที่ผลิตน้ำตาล มะพร้าวบางแห่งตั้งอยู่ใกล้กับสถานที่เลี้ยง สัตว์ ซึ่งอาจมีสิ่งสกปรกและเชื้อโรคต่างๆ ปนเปื้อนเข้ามาสู่บริเวณที่ใช้ผลิตน้ำตาลได้ โดยเฉพาะการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์น้ำตาล หลังผ่านความร้อนแล้ว และการปนเปื้อนสู่ ภาชนะ อุปกรณ์การผลิตที่ล้างสะอาดแล้ว หากไม่มีการปกปิดที่ดี ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหา ด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำตาล มะพร้าวได้ เนื่องจากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข แมว สุกร ไก่ กระต่าย หนู นก สามารถเป็นสัตว์ พาหะนำโรคได้
- สถานที่ตั้งและบริเวณรอบเตาเคี่ยวตาล บาง แห่งมีการสะสมสิ่งของที่ไม่ใช้แล้ว ไว้ใกล้

โรงเรือน ทำให้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแมลง
รบกวน และสัตว์พาหะนำโรค

- การออกแบบพื้นที่บริเวณเตาเคี่ยวตาลส่วน
ใหญ่ ยังไม่เหมาะสมกับการใช้งาน หรือการ
ขยายกำลังการผลิตเพิ่มขึ้น การไม่จัด
ระเบียบพื้นที่ปฏิบัติงานให้เหมาะสม มีการ
สะสมสิ่งของที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ
ผลิต และยังพบว่าภายในพื้นที่ของเตาเคี่ยว
ตาลบางแห่งมีการแบ่งพื้นที่เพื่อผลิตสินค้า
ชนิดอื่นด้วย ทำให้พื้นที่ภายในเตาเคี่ยวตาล
มีไม่เพียงพอต่อการปฏิบัติงาน
- การจัดพื้นที่ปฏิบัติงานภายในเตาเคี่ยวตาล
ส่วนใหญ่มีการจัดสายงานผลิตไม่เหมาะสม
เช่น บริเวณรอให้น้ำตาลแห้ง หรือบริเวณ
บรรจุน้ำตาลมะพร้าวอยู่ใกล้แหล่งที่ง่ายต่อ
การก่อการปนเปื้อนข้าม เช่น กองเชื้อเพลิง
แหล่งสะสมขยะ สถานที่เลี้ยงสัตว์ ห้องน้ำ
บริเวณทำความสะอาดอุปกรณ์ เป็นต้น ทำให้
เกิดการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกทางกายภาพ
ฝุ่นละออง จุลินทรีย์ ลงสู่น้ำตาลมะพร้าวได้
- เตาเคี่ยวตาลส่วนใหญ่ มักเป็นโรงเรือนเปิด
โล่ง ทำให้ช่วยระบายอากาศและความร้อนได้
ดี และมีแสงสว่างเพียงพอในการปฏิบัติงาน
แต่ไม่มีฝาผนังล้อมรอบโรงเรือน หรือมีเพียง
บางส่วนเท่านั้น จึงไม่สามารถป้องกันแมลง
และสัตว์รบกวนได้ และไม่สามารถป้องกัน
สัตว์เลี้ยงผ่านเข้าออกภายในพื้นที่ได้
- พื้นที่ของเตาเคี่ยวตาลในการผลิตรายย่อย
ระดับครัวเรือนส่วนใหญ่เป็นดิน เพราะการเท
พื้นคอนกรีตหรือพื้นซีเมนต์จำเป็นต้องใช้
งบประมาณสูง ส่วนการผลิตน้ำตาลมะพร้าว

ที่มีการรวมกลุ่มมีเตารวม พื้นภายในเตาเคี่ยว
ตาลจะเป็นพื้นปูน เพราะได้รับงบประมาณ
สนับสนุนในการสร้างและปรับปรุงโรงเรือน
จากหน่วยงานที่ให้การสนับสนุน หรืออาจมี
กำลังในการลงทุนเกี่ยวกับโครงสร้างได้
เนื่องจากมีกำลังการผลิตต่อวันสูง

2. สุขลักษณะส่วนบุคคลของผู้ที่เกี่ยวข้องกับการ ผลิตน้ำตาลมะพร้าว

การศึกษาสุขลักษณะของผู้ผลิตน้ำตาล
มะพร้าวพบข้อบกพร่อง ดังนี้

- การแต่งกาย พบว่าผู้ผลิตบางรายไม่สวม
เสื้อผ้าที่ปกปิดมิดชิดในระหว่างการเคี่ยว
น้ำตาลมะพร้าวที่เตาตาล เพราะอากาศ
ภายในเตาเคี่ยวตาลค่อนข้างร้อน หรืออาจจะ
สวมใส่เสื้อผ้าที่ไม่สะอาด ชำรุด ระหว่าง
ปฏิบัติงาน จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของสิ่ง
ที่ไม่พึงประสงค์จากตัวคนลงสู่ผลิตภัณฑ์
น้ำตาลมะพร้าว ซึ่งจัดเป็นสิ่งที่น่ารังเกียจ และ
ยังอาจเป็นพาหะนำเชื้อโรคจากคนสู่ผลิต-
ภัณฑ์น้ำตาลที่ผ่านความร้อนแล้ว นอกจากนี้
อุปกรณ์ที่ติดมากับเสื้อผ้าที่ชำรุด เช่น กระดุม
เข็มกลัด อาจหล่นสู่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งจัดเป็น
อันตรายทางกายภาพที่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บ
ได้ถ้าบริโภคเข้าไป
- การสัมผัสอาหาร พบผู้ผลิตบางรายใช้มือ
เปล่าสัมผัสกับน้ำตาลมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการ
ให้ความร้อนแล้ว โดยเฉพาะขั้นตอนการขึ้นรูป
และบรรจุ มักพบว่าไม่มีการสวมถุงมือเมื่อ
สัมผัสผลิตภัณฑ์ ซึ่งแก้ไขได้ดังที่มีผู้ผลิต
บางส่วนใช้ถุงพลาสติกเป็นอุปกรณ์ป้องกัน
โดยนำมาสวมที่มือก่อนหยิบจับน้ำตาล

มะพร้าวที่ผ่านความร้อนแล้ว หรือใช้อุปกรณ์ต่างๆ เช่น ที่คั่วอาหาร ช้อน ททัพ เนียน แต่ต้องระวังความสะดวกของอุปกรณ์เหล่านี้ด้วย เมื่อไม่ใช่ควรวางบนภาชนะที่สะอาด

- การล้างมือ พบว่าผู้ผลิตบางรายไม่ล้างมือก่อนและหลังปฏิบัติงานในขั้นตอนขึ้นรูปและบรรจุผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ผ่านความร้อน อาจเนื่องจากไม่มีอ่างล้างมือภายในพื้นที่ นอกจากนี้ น้ำที่ใช้ในการล้างอาจเป็นน้ำที่ไม่สะอาด เช่น น้ำคลอง ทำให้มีการใช้มือที่สกปรกไปสัมผัสผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ผ่านความร้อนแล้ว

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต

การสำรวจกระบวนการผลิตน้ำตาลมะพร้าว พบข้อบกพร่องทางด้านสุขาภิบาลการผลิตที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ทั้งเครื่องมือเครื่องจักร ตลอดจนบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ ดังนี้

- ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบหรือน้ำตาลใส อุปกรณ์สำคัญคือ “กระบอกรองน้ำตาลใส” พบปัญหาสำคัญ 3 ประการ ดังนี้ 1) ความไม่สะอาดกระบอกรองตาล ทำให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง น้ำตาลใสที่กรองได้จึงเสื่อมเสียเร็วขึ้น, 2) การเลือกวัสดุที่ใช้ทำกระบอกรองตาลไม่เหมาะสม เช่น การเลือกลักษณะอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดยากมารองรับน้ำตาลทำให้เกิดการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะ การนำภาชนะที่เคยใช้บรรจุสารเคมีมาใช้อัดรับน้ำตาลใส และบำรุงรักษากระบอกรองตาลด้วยวิธีไม่เหมาะสม (การใช้สีนํ้ามัน สารตะกั่วอุดรอยรั่ว) ทำให้สารเคมีที่เป็นพิษจากวัสดุปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ได้ และ 3) การเก็บ

กระบอกรองตาลที่ทำความสะอาดแล้วไม่เหมาะสม ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามจากสิ่งสกปรกและจุลินทรีย์สู่กระบอกรองตาล

- ขั้นตอนรับน้ำตาลใส อุปกรณ์สำคัญคือ “ภาชนะบรรจุน้ำตาลใส” ชาวสวนที่ขายน้ำตาลใสหลายรายนิยมใช้ภาชนะมีลักษณะเป็นแกลลอนพลาสติก ข้อบกพร่องที่พบจากภาชนะลักษณะนี้คือ บริเวณปากด้านบนของภาชนะแคบและมีจุดอับที่ไม่สามารถทำความสะอาดได้ ทำให้เกิดการสะสมของคราบเมือก เป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อทำให้คุณภาพของน้ำตาลใสที่ไม่ดีและยังพบการจัดเก็บภาชนะบรรจุน้ำตาลใสหลังล้างทำความสะอาดอย่างไม่เหมาะสม เช่น วางคว่ำบนพื้น บนโต๊ะไม้ที่สกปรก กายแก่การปนเปื้อน
- ขั้นตอนการกรองน้ำตาลใส อุปกรณ์สำคัญคือ “อุปกรณ์กรองน้ำตาลใส” พบว่าส่วนใหญ่ผู้ผลิตน้ำตาลมะพร้าวนิยมใช้ผ้าขาวบางวางบนตะกร้าพลาสติกซึ่งผูกติดกับโครงไม้หรือนำผ้าผูกยึดกับโครงไม้ ถ้าผ้าขาวบางที่ใช้ชำรุด จะทำให้ประสิทธิภาพการกรองลดลง การใช้ไม้ซึ่งขึ้นราได้ และง่ายต่อการผูกก่อน ทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของเศษไม้ลงสู่น้ำตาลใสขณะกรอง
- ขั้นตอนการเคี่ยวน้ำตาลมะพร้าว อุปกรณ์ที่สัมผัสกับน้ำตาลมะพร้าวในขั้นตอนนี้ ได้แก่ กระทะใบบัว กงไม้ไผ่หรือกงอะลูมิเนียม กระชอนช้อนฟองน้ำตาล ส่วนใหญ่พบข้อบกพร่องเรื่องการทำความสะดวก เช่น หลังเลิกใช้งานไม่ได้ทำความสะอาด อุปกรณ์

มีพื้นผิวที่ทำความสะอาดยาก และพบข้อบกพร่องเรื่องการจับเก็บอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดแล้วไม่เหมาะสม เช่น วางคว่ำไว้ที่พื้น นอกจากนั้นยังพบว่าเตาเคียวตาลขาดการทำความสะอาดหลังใช้งาน มีคราบน้ำตาลหกเลอะ ทำให้กลายเป็นแหล่งล่อแมลง มด ผึ้ง เข้ามายังพื้นที่ภายในโรงเรือนจำนวนมาก

- ขั้นตอนการกรองน้ำตาลหลังเคียว อุปกรณ์สำคัญคือ “อุปกรณ์กรองน้ำตาลที่เคียวได้” พบว่าในกระบวนการผลิตของผู้ผลิตบางรายไม่มีการกรองน้ำตาลหลังเคียว จึงทำให้สิ่งปนเปื้อนทางกายภาพที่ปนเปื้อนระหว่างการเคียวน้ำตาลไม่ถูกกำจัดออกไป เหลือตกค้างมาถึงผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว และถ้าใช้อุปกรณ์การกรองที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะนำอุปกรณ์ที่ไม่ทนความร้อนมากรองน้ำตาลหลังเคียว อาจก่อการปนเปื้อนของสารเคมีจากวัสดุที่ใช้ผลิตอุปกรณ์ผู้ผลิตภัณฑ์
- ขั้นตอนการทำน้ำตาลให้แห้ง โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับเครื่องจักรที่ใช้ปั่นน้ำตาล พบว่าปัจจุบันการผลิตน้ำตาลมะพร้าวของผู้ผลิตที่มีกำลังการผลิตต่อวันสูง นิยมใช้เครื่องปั่นน้ำตาลมะพร้าว เพราะสามารถผ่อนแรง และลดเวลาในการผลิตลง แต่เครื่องปั่นที่ผู้ผลิตใช้ไม่ได้ออกแบบมาสำหรับใช้ในการผลิตอาหารโดยตรง จึงพบลักษณะที่ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ผลิตอาหาร ได้แก่
 - ⇒ ไม่มีฝาครอบสายพานด้านล่าง ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเศษสายพานขณะปฏิบัติงานได้ เพราะตำแหน่งของสายพาน

อยู่เหนือกระทะใบบัว ไม่สามารถถอดใบพัดซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสน้ำตาลมาล้างทำความสะอาดได้ ก่อความยุ่งยากในการทำความสะอาด ทำให้ไม่มีการทำความสะอาดใบพัดของเครื่องปั่นอย่างเหมาะสมหลังจากใช้งานประจำวัน

⇒ การแยกส่วนไม่ได้ ทำให้ไม่สะดวกในการเก็บแยกส่วนอุปกรณ์ที่สัมผัสอาหารคือใบพัด หลังใช้งานใบพัดของเครื่องจักรปั่นจึงไม่ถูกปกปิดจากสิ่งปนเปื้อน จากการที่ตำแหน่งใบพัดอยู่สูงจากพื้นประมาณ 30 เซนติเมตร เมื่อสัตว์เลื้อยเข้ามาในพื้นที่ผลิตอาจทำให้ไปเลียแทะน้ำตาลที่ติดค้างที่ใบพัด ซึ่งอาจเป็นพาหะนำโรคได้ เพราะน้ำตาลที่ยกมามีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเดือด

⇒ เครื่องปั่นมีมุมอับที่ยากต่อการทำความสะอาด จึงพบการสะสมของหยากไย่ ฝุ่นละออง คราบน้ำมัน ชิ้นส่วนของซากสัตว์ เศษสี สนิม ตามซอกมุมของเครื่องปั่น น้ำตาลมะพร้าว เนื่องจากขาดการทำความสะอาดตัวเครื่องเป็นประจำ

- การขึ้นรูปและบรรจุน้ำตาล อุปกรณ์ที่ใช้ในการขึ้นรูปน้ำตาลปึก พบข้อบกพร่องดังนี้
 - ⇒ ฝ่าขาวบางหรือถุงพลาสติกกรองพิมพ์หยอดน้ำตาล การใช้วัสดุรองรับน้ำตาลประเภทถุงพลาสติก ผู้ผลิตหลายรายเลือกใช้ชนิดพลาสติกไม่เหมาะสมมาเป็นแผ่นรองรับน้ำตาลบนพิมพ์ เช่น ถุงเย็น ถุงก๊อบแก็บ ซึ่งเป็นถุงที่ผลิตจากพลาสติกที่ไม่ทนร้อน มาใช้รองรับ

น้ำตาลขณะที่ยังร้อนอยู่ บางครั้งพบการใช้ผ้าขาวบางที่ชำรุด มีการทำความสะอาดและจัดเก็บไม่เหมาะสม

- ⇒ พิมพ์ขึ้นรูปน้ำตาล พิมพ์ที่ใช้ขึ้นรูปน้ำตาลนอกจากถ้วยอลูมิเนียม กระเบื้องเคลือบ มีการใช้ถ้วยพลาสติก และพิมพ์พลาสติก มาใช้หยอดน้ำตาล พบว่ามีการเลือกใช้พิมพ์พลาสติกที่ทำจากวัสดุไม่ทนความร้อนมาใช้หยอดน้ำตาลซึ่งมีอุณหภูมิสูง อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีจากเนื้อพลาสติกสู่ผลิตภัณฑ์ได้ และยังพบการทำความสะดวกอุปกรณ์อย่างไม่เหมาะสม เช่น ไม่ทำให้อุปกรณ์ที่ล้างทำความสะอาดแห้งสนิทก่อนจัดเก็บ และจัดเก็บโดยไม่มีการปกปิดให้มิดชิด
- ⇒ การขึ้นรูปและบรรจุน้ำตาลบางแห่งทำบนพื้นของโรงเรือน ทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนข้าม

4. การจัดเก็บผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว

การเก็บรักษาสภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างรอจำหน่าย พบข้อบกพร่องดังนี้

- การเก็บน้ำตาลปึก มักวางปึกน้ำตาลไว้บนพื้นภายในโรงเรือน เพราะปึกมีขนาดใหญ่และน้ำหนักมาก ข้อบกพร่องด้านสุขาภิบาลที่พบคือ การจัดเก็บไม่เหมาะสม กล่าวคือไม่มีการปกปิดปึกบรรจุน้ำตาลอย่างมิดชิดทำให้น้ำตาลถูกแทะ เลี้ยวจากสัตว์เลี้ยงภายในครัวเรือน หรืออาจปิดคลุมปึกน้ำตาลด้วยวัสดุที่ไม่สะอาด เช่น เศษผ้า แผ่นพลาสติกไม่อัด

- การเก็บน้ำตาลปึก ซึ่งบรรจุในถุงพลาสติกพร้อมจำหน่าย พบว่าส่วนใหญ่ผู้ผลิตมักวางไว้บนชั้น หรือโต๊ะ เพราะมีขนาดเล็กและน้ำหนักเบา แต่บางแหล่งผู้ผลิตวางน้ำตาลปึกที่ยังไม่ได้บรรจุในถุงพลาสติกไว้บนพื้นและไม่มีการปกปิดมิดชิด ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากแมลง มดและฝุ่นละอองได้

อภิปรายผล

การขาดการควบคุมด้านสุขาภิบาลการผลิตอาหาร ทำให้พบข้อบกพร่องด้านสุขาภิบาลการผลิตน้ำตาลมะพร้าวหลายด้าน โดยด้านที่เกี่ยวข้องกับสถานที่และสภาพแวดล้อมของเตาตาล พบว่ามีลักษณะที่เปิดโล่งเพื่อระบายความร้อน หรืออยู่ใกล้กับสิ่งซึ่งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้าม เช่น สถานที่เลี้ยงสัตว์ จะทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ สิ่งสกปรกและฝุ่นผงต่างๆ ลงสู่ผลิตภัณฑ์น้ำตาลได้ โดยเฉพาะในขั้นตอนการปั้นและการขึ้นรูป และการบรรจุน้ำตาล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนในการเคี่ยวมาแล้ว จึงควรมีความระมัดระวังในการปฏิบัติงานในขั้นตอนเหล่านี้ โดยเลือกปฏิบัติงานในบริเวณที่มีการป้องกันการปนเปื้อนข้ามที่เหมาะสม นอกจากนี้การนำอุปกรณ์หรือวัสดุต่างๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องในการผลิตมาเก็บไว้ในบริเวณเตาตาล ยังทำให้เป็นแหล่งซุกซ่อนของสัตว์พาหะนำโรค เช่น หนู ซึ่งเป็นพาหะนำโรคดีซ่านและโรคไทฟอยด์ แมลงวันทำให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น ไข้รากสาด บิด อหิวาตกโรค วัณโรค เป็นต้น⁵ ส่วนการขาดการป้องกันการเข้าออกของสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข แมว ถ้าหากเข้ามาในบริเวณผลิตหรือบริเวณเก็บภาชนะ อาจเดินย่ำหรือนอนบนชั้นเก็บ

ของ หรือเลยผลิตภัณฑ์น้ำตาล และอุปกรณ์ที่ใช้สร้างความสกปรกแก่ภาชนะที่ใช้ในการผลิตได้ และสัตว์เลี้ยงอาจสร้างความสกปรกโดยการอุจจาระ ปัสสาวะ หรือสัมผัสเครื่องมือและภาชนะที่ทำความสะอาดแล้วให้สกปรกอีก จึงจำเป็นต้องมีการแก้ไขข้อบกพร่องเหล่านี้ เพื่อให้สถานที่ผลิตน้ำตาลมะพร้าวมีความเหมาะสมต่อการผลิตอาหาร ที่สำคัญควรมีการปรับปรุงไม่ให้สัตว์รบกวนหรือสัตว์พาหะนำโรคต่างๆมาสัมผัสอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว ดังนั้นควรมีการศึกษาลักษณะการปฏิบัติงานในพื้นที่โรงเรือนที่ต้องการการเปิดโล่งตามลักษณะการผลิตน้ำตาลมะพร้าวของชุมชน ว่าควรมีการควบคุมการปนเปื้อนอย่างไร

การที่ลักษณะการผลิตน้ำตาลมะพร้าวเป็นการผลิตรายย่อย ทำในครัวเรือนของชาวสวนมะพร้าว จึงมีปัจจัยหลายด้านที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการปฏิบัติงานที่ทำให้การนำสุขลักษณะส่วนบุคคลไปปฏิบัติยังไม่เกิดผลเท่าที่ควร และอาจเนื่องจากผู้ผลิตส่วนใหญ่เป็นชาวบ้านและค่อนข้างสูงวัยทำให้ไม่มีความเข้าใจเกี่ยวกับสุขลักษณะส่วนบุคคล ข้อบกพร่องด้านสุขลักษณะส่วนบุคคล โดยเฉพาะการสัมผัสผลิตภัณฑ์ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแล้ว เช่น การปั่นหรือกระทุ้งน้ำตาลให้แห้ง การขึ้นรูปเป็นน้ำตาลปึก การบรรจุลงปี๊บ หรือบรรจุภัณฑ์ต่างๆ หากผู้ผลิตมีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่เหมาะสม เช่น การใช้มือที่ไม่สะอาดสัมผัสน้ำตาลมะพร้าว การใส่เสื้อผ้าที่สกปรก อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคจากคนสู่อาหารได้ โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบได้ตามจมูก หู และผิวหนังของคน มีความเป็นพิษทำให้เกิดอาการท้องเสีย

อย่างรุนแรงได้⁶⁻⁸ ดังนั้นระหว่างการผลิตน้ำตาลหลังเคี้ยว จึงไม่ควรใช้มือเปล่าสัมผัสผลิตภัณฑ์น้ำตาลโดยตรง ไม่แตะจมูก เกา หรือแกะเล็บระหว่างปฏิบัติงาน หากจำเป็นต้องใช้มือเปล่าควรมีการดูแลความสะอาดที่เหมาะสม

ปัจจัยที่สร้างความไม่ปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าวที่เกิดจากความบกพร่องทางด้านสุขาภิบาลการผลิตนั้น ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ทั้งเครื่องมือ เครื่องจักรที่ใช้ในกระบวนการผลิต ตลอดจนบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ โดยเฉพาะมีการเลือกใช้ชนิดพลาสติกไม่เหมาะสมเป็นแผ่นรองรับน้ำตาลบนพิมพ์ เช่น ถูยีน ถูก๊อบ-แก๊ป ซึ่งเป็นถุงพลาสติกหุ้มหิ้วที่ใช้ได้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 70°C อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากสารเคมีที่มีอยู่ในชั้นพลาสติกสู่ผลิตภัณฑ์ได้^{9,10} เนื่องจากการวัดอุณหภูมิน้ำตาลขณะหยอด พบว่ามีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 60-80°C นอกจากนี้ยังมีการนำพลาสติกที่ใช้แล้วนำกลับมาหมุนเวียนใช้ใหม่ ปัจจัยเหล่านี้อาจทำให้เกิดการละลายของสารเคมีในเนื้อของพลาสติกปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว^{10,11} ดังนั้นจึงควรให้ความรู้ที่ถูกต้องในการเลือกใช้ภาชนะรองรับหรือบรรจุน้ำตาลหลังเคี้ยวแก่ผู้ผลิต มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าวที่ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนด้านต่างๆ ลงสู่ผลิตภัณฑ์ ส่วนปัญหาด้านการดูแลทำความสะอาดและจัดเก็บอุปกรณ์เป็นปัญหาที่จัดการได้ไม่ยาก สามารถแก้ไขโดยการอบรมให้ความรู้ด้านสุขาภิบาลที่ดีในการผลิตอาหาร ส่วนการเลือกใช้อุปกรณ์นั้นยังมีข้อจำกัดด้านงบประมาณ จึงควรมีการศึกษาความเหมาะสมของอุปกรณ์ที่นำมาใช้ในชั้น

ตอนการผลิตน้ำตาลว่าแต่ละขั้นตอนมีความจำเป็น ต้องเลือกใช้วัสดุอุปกรณ์ลักษณะไหน แต่ควรเน้น อุปกรณ์ราคาไม่แพง หรือสามารถประกอบขึ้นเองได้ เพื่อให้เข้ากับวิถีชีวิตการผลิตน้ำตาลมะพร้าวของ ชุมชน ซึ่งเป็นการผลิตรายย่อย เน้นการนำวิธีการผลิต แบบดั้งเดิมในหลายด้านที่มีการดูแลในแต่ละขั้นตอน การผลิตอย่างดี ทั้งการดูแลความสะอาดของกระบอก รองตาล² และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเคี่ยวตาล

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการผลิตน้ำตาลมะพร้าวใน ปัจจุบัน หากมีการละเลยการนำหลักสุขภาพิบาลการ ผลิตอาหารมาใช้ควบคุมการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ จะ นำมาซึ่งข้อบกพร่องในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตที่ อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของอันตรายสำคัญต่างๆ ลงสู่ผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว ดังนั้นควรมีการศึกษา ปรับปรุงสุขภาพิบาลการผลิตในลักษณะที่สามารถ นำไปปฏิบัติได้จริงในการผลิตน้ำตาลมะพร้าวระดับ ชุมชน ซึ่งควรนำองค์ความรู้ในการผลิตที่เป็นภูมิ ปัญญาท้องถิ่นมาปรับใช้ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้น โดยใช้ความรู้ด้านสุขภาพิบาลการผลิตอาหาร มาประกอบ เพื่อสนับสนุนให้เกิดการผลิตน้ำตาล มะพร้าวที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. มาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำตาลมะพร้าว. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน; 2546. มผช. 5/2546.
2. เวณิกา เบ็ญจพงษ์, อาณัติ นิติธรรมยง, เรณู ทวีชาติวิทยากุล, และคณะ. รายงานวิจัย เรื่อง การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำตาลปี๊บและ น้ำตาลปึกเพื่อความปลอดภัยในการบริโภคและ ถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อเศรษฐกิจชุมชน. นครปฐม: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2549.
3. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวง สาธารณสุขฉบับที่ 193 พ.ศ. 2543 เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิตและ การเก็บรักษาอาหาร. กรุงเทพฯ: กระทรวง สาธารณสุข; 2543.
4. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. คู่มือ การตรวจสถานที่ผลิตอาหารด้านสุขลักษณะ ทั่วไป. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการ อาหารและยา; 2543.
5. พัฒน์ สุจำนงค์. การสุขภาพิบาลอาหาร. พิมพ์ ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไทยสัมพันธ์; 2526.
6. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. การจัดการสุขลักษณะและระบบ HACCP ใน โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรม; 2541.
7. Marriott NG, Gravani RB. Principle of food sanitation. 5th ed. New York: Springer; 2006.
8. ปูน คงเจริญเกียรติ, สมพร คงเจริญเกียรติ. บรรจุภัณฑ์อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรง พิมพ์หิเสง, 2541: 60-7.
9. สุวิมล กิริติพิบูล. GMP ระบบการจัดการและ การควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย. พิมพ์ ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น); 2543.
10. Wiberg GS. Consumer hazard of plastics. *Environ Health Perspect* 1976; 17: 221-5.
11. Weisel C, Demak M, Marcus S, et al. Soft plastic bread packaging: lead content and reuse by families. *Am J Public Health* 1991; 81: 756-8.

Assessment on Sanitation of Traditional Coconut Sugar Production in Samut Songkhram Province

Junchaiy Prakobsil, Wenika Benjapong*, Narisara Moungrichan and Weeraya Karnpanit

Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT

Coconut sugar is a product from the fresh coconut sap. The fresh coconut sap, tapping from the flower stalks of coconut palm's spadix is boiled to evaporate the water until liquid become very sticky. Most production of coconut sugar is a traditional production which is small scale production, steps and methods relying on the experience or indigenous knowledge. As modernized production, the important aspects of the production process should be held to food safety standards. This study evaluated food safety issues in 30 small scale coconut sugar productions in 3 districts of Samut Songkram province, Thailand. This information would be useful for the control in ensuring food safety. The processes of coconut sugar production were analyzed starting with preparation of coconut sap, chewing and product packaging.

The study found that some steps of coconut sugar production were not met food safety requirements in at least four ways. First, the production facilities were found to be in direct proximity to residences or animal pens. They lacked walls to protect against dust particles. Secondly, equipments used in production were inappropriate, such as plastic containers that could not endure heat. Also equipment that comes in contact with food was difficult to clean. Furthermore the mixer used in production was not designed for food production. Maintenance, cleaning and storage of equipment and containers were not sanitary. Clean equipment was stored together with equipment that had not been cleaned. In addition, the coconut sugar production producers exhibited unsanitary behaviors. Most producers directly contacted the heated coconut sugar with their unwashed hands. Finally, storage of the product prior to distribution was inadequate in some ways, such as lack of containment and placing product on the ground. The inadequate sanitation need to be corrected for good food sanitation resulting in food safety in coconut sugar products.

Keywords: Food Sanitation, coconut Sugar, Samut Songkram Province, Thailand

* Corresponding author:
Asst. Prof. Dr. Wenika Benjapong
Institute of Nutrition, Mahidol University,
Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand
E-mail: nuwbe@mahidol.ac.th

สถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลใส

กังสดาล สิงห์สูง, เวณิกา เบ็ญจพงษ์*, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, และวีรยา การพานิช

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

น้ำตาลใสเป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิตน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลสด ในการรักษาคุณภาพน้ำตาลใสระหว่างการรองรับน้ำตาลจากวงมะพร้าว เกษตรกรนิยมใช้ไม้พะยอม หรือไม้เคี่ยม ซึ่งมีสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันบูดตามธรรมชาติ แต่ปัจจุบันมีการนำสารเคมีสังเคราะห์ประเภทวัตถุกันเสียมาใช้แทน การใช้สารเคมีเหล่านี้อย่างไม่เหมาะสมอาจก่อผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภค การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลใส โดยเก็บตัวอย่างน้ำตาลใสจากเกษตรกรในจังหวัดสมุทรสงคราม นำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวัตถุกันเสียในน้ำตาลใส ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มของซัลไฟด์ จำแนกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิเคราะห์ปริมาณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยเทคนิค Optimized Monier-Williams และสารประกอบในกลุ่มของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ซึ่งจำแนกชนิดและวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวิร์สเฟส

ผลการศึกษาพบว่าในน้ำตาลใสจำนวน 100 ตัวอย่าง พบการเจือปนวัตถุกันเสีย 2 กลุ่ม คือกลุ่มของสารประกอบซัลไฟด์จำนวน 39 ตัวอย่าง มีการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในช่วง 11.01- 2,106.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณเฉลี่ย 377.29 ± 456.68 มก.ต่อ กก. พบการเจือปนวัตถุกันเสียกลุ่มของกรดเบนโซอิกจำนวน 10 ตัวอย่าง ในช่วง 31.37- 1,384.45 มก.ต่อ กก. มีปริมาณเฉลี่ย 286.608 ± 415.68 มก.ต่อ กก. และน้ำตาลใส 2 ตัวอย่าง มีการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และการเจือปนของกรดเบนโซอิก จะเห็นได้ว่าปริมาณวัตถุกันเสียทั้ง 2 กลุ่มที่พบในหลายตัวอย่างมีค่าสูง ดังนั้นควรหามาตรการควบคุมการใช้วัตถุกันเสียทั้งชนิดและปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำตาลใสทั้งน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลสดมีการใช้วัตถุกันเสียทั้งชนิดและปริมาณถูกต้องตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐานอาหาร หรือหันมาควบคุมการผลิตตามหลักสุขาภิบาลอาหาร เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการเก็บรักษาน้ำตาลใส และส่งเสริมการใช้สารกันบูดจากธรรมชาติ เช่น ไม้เคี่ยม ไม้พะยอม ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น

คำสำคัญ: น้ำตาลใส, วัตถุกันเสีย, ซัลเฟอร์ไดออกไซด์, กรดเบนโซอิก

* Corresponding author:

ผศ.ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

Email: nuwbe@mahidol.ac.th

บทนำ

น้ำตาลโสมหมายถึงน้ำหวานที่ได้จากช่อดอกที่เรียกว่า งวงมะพร้าวหรือจั่นมะพร้าว นิยมนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ 2 ประเภท คือ น้ำตาลมะพร้าว และน้ำตาลสด โดยเมื่อนำไปผ่านกระบวนการเคี้ยวบนเตาจนงวด จะได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว ซึ่งหากบรรจุน้ำตาลลงปื๊บ เรียก น้ำตาลปื๊บ ถ้าขึ้นรูปเป็นก้อน เรียก น้ำตาลปึก¹ หรือนำน้ำตาลโสมไปกรองและผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เช่น การต้มแล้วนำไปบรรจุขวดจะหมายถึงน้ำตาลสด² วิธีการดั้งเดิมในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำตาลโสม มีการใส่เปลือกไม้ประเภทไม้เคี่ยม หรือไม้พะยอม ซึ่งมีสารแทนนิน (Tannin) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์³ จึงสามารถป้องกันกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างการรองรับน้ำตาลโสมได้ เนื่องจากการรองรับน้ำตาลโสมใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง การใส่เปลือกไม้ยังช่วยให้น้ำตาลมีความใสขึ้น ซึ่งเกิดการตกตะกอนของอัลบูมินที่อยู่ในน้ำตาลโสม⁴ แต่ปัจจุบันเกษตรกรหลายรายที่ผลิตน้ำตาลโสมส่งขาย นิยมนำสารเคมีประเภทวัตถุกันเสียมาใช้ในการป้องกันการเสื่อมเสียของน้ำตาลโสมระหว่างรองรับบนต้นมะพร้าวกันมากขึ้น การเลือกใช้สารเคมีที่ไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์และวัตถุประสงค์ที่ต้องการ อาจนำไปสู่การใช้สารเคมีในปริมาณมากในผลิตภัณฑ์นั้นโดยไม่จำเป็น ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ดังเช่นการใช้สารเคมีในกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์ ซึ่งมักพบตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว^{5,6} เนื่องจากนิยมใช้เป็นสารฟอกขาวในกระบวนการผลิตน้ำตาลมะพร้าว แต่การบริโภคสารกลุ่มนี้ในปริมาณมากสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะ เด็ก

ทารกที่ขาดเอนไซม์ sulfite oxidase แต่กำเนิด เมื่อได้รับสารนี้จะเกิดอาการผิดปกติของระบบประสาทอย่างรุนแรง และสารนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านสารอาหาร โดยสามารถทำปฏิกิริยาวิตามินบางชนิดก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบเมตาบอลิซึมของร่างกายได้ ที่สำคัญสารในกลุ่มของสารประกอบซัลไฟด์ยังสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงในกลุ่มคนที่ไวต่อสารนี้ เช่น ผู้ที่เป็นโรคภูมิแพ้หรือโรคหอบหืด โดยจะทำให้เกิดอาการในระบบทางเดินหายใจ (brochoconstriction & bronchospasm) อาจทำให้ช็อก หดสติ และเสียชีวิตได้⁷ การตกค้างของสารกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าวอาจไม่ได้เกิดจากการใช้สารกลุ่มนี้ในการฟอกขาวน้ำตาลระหว่างเคี้ยวเท่านั้น ยังอาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ คือน้ำตาลโสม เนื่องจากสารประกอบซัลไฟด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์⁸

การใช้สารเคมีประเภทวัตถุกันเสียในน้ำตาลโสมอย่างไม่ถูกวิธีทั้งชนิดและปริมาณ นำไปสู่การตกค้างของสารเหล่านั้นในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำตาลโสม เช่น น้ำตาลสด น้ำตาลมะพร้าว อันจะส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัญหาที่เกิดในการผลิตน้ำตาลโสม และประเมินสถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลโสมเพื่อวางแผนควบคุมการนำสารเคมีมาใช้ในการผลิตน้ำตาลโสม และพัฒนาระบบการผลิตน้ำตาลมะพร้าวให้เกิดความปลอดภัยเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การส่งเสริมให้เกิดกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่ปลอดภัยขึ้นในชุมชน จำเป็นต้องให้การแนะนำที่ถูกต้องในกระบวนการผลิตที่สร้างความมั่นใจในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะการนำสารเคมีเข้ามาใช้ในการผลิตอาหาร

ระดับชุมชนยังต้องมีความระมัดระวังทั้งชนิดและปริมาณของสารเคมีที่นำมาใช้ในการผลิตวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อประเมินสถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำตาลไอของเกษตรกรชาวสวนมะพร้าวในจังหวัดสมุทรสงคราม

วิธีดำเนินการวิจัย

พื้นที่ศึกษา

เลือกพื้นที่ศึกษาแบบเจาะจง (purposive sampling) โดยเลือก 3 อำเภอ คืออำเภอเมืองสมุทรสงคราม อัมพวา และบางคนที ของจังหวัดสมุทรสงคราม เป็นพื้นที่ศึกษาเนื่องจาก เป็นจังหวัดที่มีสถิติการเพาะปลูกมะพร้าวเพื่อผลิตน้ำตาลมากที่สุด⁹

การสุ่มตัวอย่าง

การเลือกตัวอย่างประชากร : ประชากรกลุ่มเป้าหมาย เกษตรกรที่มีกิจกรรมในการเก็บน้ำตาลไอ ทั้งเพื่อจำหน่าย และนำมาเคี้ยวเป็นน้ำตาลมะพร้าว ใน 3 อำเภอของจังหวัดสมุทรสงคราม โดยคำนวณขนาดตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, สัดส่วนความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับให้เกิดขึ้นได้ 0.1 และความซุกของการเก็บน้ำตาลไอที่สัมพันธ์กับการใช้วัตถุกันเสีย = 0.5 ได้จำนวนตัวอย่างประชากรเท่ากับ 96 หรือประมาณ 100 ตัวอย่าง จากนั้นคณะผู้วิจัยนำเสนอวัตถุประสงค์ของการวิจัยกับหน่วยงานในท้องถิ่น และประสานขอความร่วมมือในการนำเข้าพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างน้ำตาลไอจากเกษตรกรชาวสวนมะพร้าว

การรวบรวมข้อมูลการผลิต

สัมภาษณ์ข้อมูลการผลิตน้ำตาลไอ เพื่อ

รวบรวมข้อมูลเบื้องต้นในการผลิต และสังเกตกระบวนการผลิต ทั้งการเตรียมอุปกรณ์ในการขึ้นเก็บน้ำตาลไอ และวิธีการรักษาคุณภาพน้ำตาลไอ การเก็บน้ำตาลไอระหว่างรอจำหน่าย หรือรอการรวบรวมไปเคี้ยวเป็นน้ำตาลมะพร้าว

การเก็บตัวอย่างน้ำตาลไอ

เก็บตัวอย่างน้ำตาลไอที่บรรจุอยู่ในกระบอกรองตาล จากเกษตรกร จำนวน 100 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณวัตถุกันเสีย

วิธีการวิเคราะห์วัตถุกันเสีย

1. การวิเคราะห์การเจือปนของวัตถุกันเสียในกลุ่มของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำตาลไอ

ทำการจำแนกชนิด และวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในตัวอย่างน้ำตาลไอ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวิร์สเฟส (Reverse Phase Liquid Chromatography) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม นำไปสกัดด้วยสารละลายเมทานอลและ 0.0185 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ในอัตราส่วน 37:63 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นนำมาตกตะกอนโปรตีนโดยเติมสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะไซยาไนด์เรต (II) ไตรไฮเดรต และสารละลายซิงค์อะซีเตต ดี-ไฮเดรต กรองผ่านกระดาษกรอง นำสารละลายส่วนที่กรองได้ไปแยกชนิด และวิเคราะห์ปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) ใช้คอลัมน์ RP 18 endcaped (5 μ m) lichrosphere, Merck Lichrocast 230 โดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือ อะซีโตไนไตรล์ และ 0.0185 โมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์, พีเอช 4.5 ในอัตราส่วน 14:86 ตั้งอัตราการไหลไว้ที่ 1.2

มิลลิลิตรต่อนาที่ และวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์การเจือปนของสารประกอบซัลไฟด์ในน้ำตาลใส

จำแนกชนิดของสารประกอบซัลไฟด์โดยใช้ชุดทดสอบโซเดียมไฮโดรซัลไฟด์ในอาหาร (สารฟอกขาว) ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อระบุว่ามี การเจือปนของสารประกอบซัลไฟด์กลุ่มที่อนุญาตหรือไม่อนุญาตให้ใส่ในอาหาร โดยใช้ตัวอย่างทดสอบ 5 มิลลิลิตร หยดน้ำยาทดสอบ 3-4 หยด จากนั้นสังเกตสีของสารละลาย ถ้าสารละลายมีสีเทา หรือดำ แสดงว่ามีโซเดียมไฮโดรซัลไฟด์ (ไม่อนุญาตให้ใช้) ถ้าสารละลายมีสีเขียว แสดงว่ามีสารฟอกขาว (อนุญาตให้ใช้) และถ้าสารละลายมีสีฟ้าอ่อน แสดงว่าไม่มีสารฟอกขาว

วิเคราะห์หาปริมาณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยเทคนิค Optimized Monier-Williams (AOAC, 2000)¹⁰ เป็นวิธีการตรวจวัดซัลไฟด์อิสระที่แตกตัวออกจากตัวอย่างอาหาร โดยตัวอย่างเมื่อได้รับความร้อนและทำปฏิกิริยากับ 4 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก เกิดการเปลี่ยนรูปจากซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ขณะที่ไอของแก๊สไนโตรเจนจะเป็นตัวพาซัลเฟอร์ไดออกไซด์ผ่านคอนเดนเซอร์ทำความเย็น และผ่านต่อไปทำปฏิกิริยากับ 3 % โซเดียมเพอร์ออกไซด์ ทำให้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ถูกออกซิไดส์ไปเป็นกรดซัลฟูริก ซึ่งสามารถนำไปหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ โดยการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.010 โมลาร์

3. ศึกษาข้อกำหนดเกี่ยวกับการใช้วัตถุเจือปนอาหารในน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลสด

ทำการรวบรวมข้อกำหนดด้านมาตรฐานการ

ใช้วัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์น้ำตาลใส น้ำตาลสด และน้ำตาลมะพร้าว เพื่อนำไปประเมินสถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลใส

ผลการวิจัย

การเจือปนของวัตถุกันเสียในน้ำตาลใส

การเก็บตัวอย่างน้ำตาลใส ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ถูกส่งไปผลิตเป็นน้ำตาลมะพร้าว ในพื้นที่ของจังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 100 ตัวอย่าง พบการเจือปนของสารเคมีกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์ (วิเคราะห์ปริมาณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์) จำนวน 39 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเป็นสารประกอบซัลไฟด์กลุ่มที่อนุญาตให้ใส่ในอาหารได้ และพบการเจือปนของสารเคมีในกลุ่มกรดเบนโซอิกจำนวน 10 ตัวอย่าง นอกจากนี้น้ำตาลใส 2 ตัวอย่าง พบการเจือปนของทั้งสารประกอบซัลไฟด์ และกรดเบนโซอิก แต่ไม่พบการเจือปนของกรดซอร์บิกในตัวอย่างใด จำนวนตัวอย่างน้ำตาลใสจากทั้ง 3 อำเภอของจังหวัดสมุทรสงคราม ซึ่งพบการเจือปนของวัตถุกันเสียแสดงในตารางที่ 1

ผลวิเคราะห์ปริมาณวัตถุกันเสียในน้ำตาลใส 100 ตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 2 พบวัตถุกันเสีย 2 กลุ่มคือ กลุ่มของสารประกอบซัลไฟด์ คำนวณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ พบในช่วง 11.01- 2,106.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มของกรดเบนโซอิกจำนวน 10 ตัวอย่าง พบในช่วง 31.37- 1,384.45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การศึกษาข้อกำหนดและเกณฑ์มาตรฐาน

อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

น้ำตาลใสซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาล

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างน้ำตาลไอ และร้อยละของตัวอย่างที่พบการใช้วัตถุกันเสีย ในจังหวัดสมุทรสงคราม

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (%) ที่พบการใช้วัตถุกันเสีย			
		ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	กรดเบนโซอิก	กรดซอร์บิก	ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร่วมกับกรดเบนโซอิก
เมือง	48	13 (27.08%)	4 (8.33%)	0 (0%)	1 (2.08%)
อัมพวา	31	15 (48.39%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
บางคนที	21	11 (52.38%)	6 (28.57%)	0 (0%)	1 (4.76%)
รวม	100	39 (39%)	10 (10%)	0 (0%)	2 (2%)

ตารางที่ 2 ปริมาณการตกค้างของกรดเบนโซอิกและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำตาลไอของแต่ละอำเภอ

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณกรดเบนโซอิก	ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์
		(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	(มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
เมือง	48	179.26 ± 415.68 (96.80-387.94)	226.91 ± 457.67 (11.01-1037.76)
อัมพวา	31	ตรวจไม่พบ	342.912 ± 457.67 (76.30-2106.94)
บางคนที	21	358.17 ± 415.68 (31.37-1384.45)	601.88 ± 457.67 (13.09-1381.68)
รวม	100	286.61 ± 415.68 (31.37-1384.45)	377.29 ± 457.67 (11.01-2106.94)

มะพร้าวหรือน้ำตาลสด เป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านที่ยังไม่มีข้อกำหนดตามกฎหมายในเรื่องการใช้วัตถุกันเสียที่ชัดเจน ข้อกำหนดเกี่ยวกับการใช้วัตถุเจือปนอาหารในน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลสดที่สามารถอ้างอิงได้ แสดงในตารางที่ 3

สารประกอบซัลไฟต์ เป็นกลุ่มของสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ผลิตน้ำตาลมะพร้าว มีทั้งชนิดที่จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร ได้แก่ โซเดียมไบซัลไฟต์ โซเดียม

เมตาไบซัลไฟต์ โซเดียมซัลไฟต์ โพแทสเซียมไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมซัลไฟต์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น โซเดียมไฮโดรซัลไฟต์ ซึ่งห้ามใส่ในอาหารทุกชนิด สารประกอบกลุ่มนี้นิยมใช้เป็นทั้งสารฟอกขาวและสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าวต้องใช้ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหาร

ตารางที่ 3 ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหารในสารกลุ่มซัลไฟต์และกรดเบนโซอิกในผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลสด

วัตถุกันเสีย	ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร	อ้างอิง
สารประกอบซัลไฟต์	ไม่เกิน 40 มิลลิกรัมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่อกิโลกรัมของน้ำตาลมะพร้าว	ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2532 ¹¹
	ไม่เกิน 70 มิลลิกรัมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่อเครื่องดื่ม 1 กิโลกรัม	ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 214) พ.ศ. 2543 เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ¹²
กรดเบนโซอิก	ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม *กรณีที่ใช้ร่วมกับกรดซอร์บิกต้องไม่เกิน 1,000 มก./กก.	มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (น้ำตาลสด) ²
	ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเครื่องดื่ม *กรณีที่ใช้ร่วมกับกรดซอร์บิกต้องไม่เกิน 200 มก./กก.	ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 214) พ.ศ. 2543 เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ¹²

และยา พ.ศ. 2532 เรื่องมาตรฐานน้ำตาลมะพร้าวที่มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ปนเปื้อน¹¹ ซึ่งอนุญาตให้ใช้เฉพาะชนิดที่เป็นวัตถุเจือปนอาหาร โดยกำหนดการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไว้ไม่เกิน 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หากนำน้ำตาลที่ได้ไปผลิตเป็นน้ำตาลสดบรรจุภาชนะปิดสนิท ควรอ้างอิงปริมาณการใช้วัตถุกันเสียในกลุ่มซัลไฟต์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543 เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ที่อนุญาตให้มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ไม่เกิน 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม¹² สำหรับวัตถุกันเสียกลุ่มของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข(ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร¹³ อนุญาตให้ใช้ในอาหารบางชนิดได้ แต่ไม่ได้กล่าวถึงการใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว มีเพียงมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) ซึ่งเป็นมาตรฐานสมัครใจ ที่มีการกำหนดปริมาณ

กรดเบนโซอิกหรือกรดซอร์บิกในน้ำตาลสดไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กรณีที่ใช้ร่วมกันให้ใช้ได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม² หากนำน้ำตาลที่ได้ไปผลิตเป็นน้ำตาลสดที่มีการบรรจุเป็นเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ต้องพิจารณาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 ที่อนุญาตให้มีกรดเบนโซอิกได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม¹² จากประกาศของหน่วยงานต่างๆ จะพบว่าการอนุญาตให้ใช้วัตถุกันเสียในชนิดและปริมาณของสารเคมีที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าน้ำตาลสดยังไม่ได้ถูกจัดเข้าอยู่ในหมวดหมู่อาหารกลุ่มใดเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิตน้ำตาลสด และน้ำตาลมะพร้าว

อภิปรายผล

ปัจจุบันการผลิตน้ำตาลมะพร้าวมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการผลิตไปจากเดิม ที่ผู้ผลิตน้ำตาล

มะพร้าวจะขึ้นเก็บน้ำตาลใสแล้วนำไปเคี่ยวที่เตาเคี่ยวตาลของตนเอง แต่ข้อจำกัดเรื่องแรงงานที่เป็นปัญหาในปัจจุบัน ทำให้ผู้ผลิตน้ำตาลมะพร้าวหลายรายเลือกใช้วิธีการจ้างผู้อื่นเก็บน้ำตาลใส หรือรับซื้อน้ำตาลใสจากเกษตรกรชาวสวนมะพร้าว เพื่อนำมาเคี่ยวเป็นน้ำตาลแห้งที่เตาเคี่ยวตาล โดยเฉพาะเตาที่มีลักษณะเป็นเตารวม ซึ่งมีกำลังการผลิตต่อวันสูง การที่เกษตรกรบางกลุ่มเลิกเคี่ยวตาลหันมาเก็บน้ำตาลใสส่งขายให้กับผู้ผลิตน้ำตาลสดหรือน้ำตาลมะพร้าว ทำให้เกษตรกรเหล่านี้ไม่มีเตาเคี่ยวตาลสำหรับใช้ลวกทำความสะอาดกระบอกรองตาลตามวิธีดั้งเดิม หันมาล้างกระบอกด้วยน้ำคลอง ส่งผลให้กระบอกรองตาลไม่สะอาดมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบอกสูง¹⁴ การไม่มีเตาตาลสำหรับอุ่นน้ำตาลที่เก็บในตอนบ่าย ซึ่งต้องเก็บค้างคืนเพื่อรอเคี่ยวในวันรุ่งขึ้น จึงไม่มีการขึ้นเก็บน้ำตาลใสลงจากต้นมะพร้าวในรอบบ่าย การขึ้นเอาน้ำตาลใสลงจึงเหลือเพียงวันละ 1 รอบ ในตอนเช้า ดังนั้นกระบอกรองตาลต้องอยู่บนต้นประมาณ 24 ชั่วโมง การใช้เพียงไม้พะยอมหรือไม้เคี่ยมจึงไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ได้เพียงพอในการป้องกันการเสื่อมสภาพของน้ำตาลใส ด้วยเหตุนี้เองทำให้เกษตรกรนำสารเคมีประเภทวัตถุกันเสียมาใช้ร่วมกับการใช้ไม้พะยอมหรือไม้เคี่ยมในการเก็บรักษาน้ำตาลใส เพื่อการป้องกันไม่ให้น้ำตาลใสที่รองไว้บูด

สารเคมีที่นำมาเพื่อใช้รักษาคุณภาพของน้ำตาลใส ซึ่งพบในการศึกษานี้มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของสารประกอบซัลไฟด์ และกลุ่มของกรดเบนโซอิก โดยพบการเจือปนของสารเคมีในกลุ่มของสารประกอบซัลไฟด์ในจำนวนตัวอย่างที่มากกว่า

กลุ่มของกรดเบนโซอิก ในการศึกษานี้พบการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำตาลใส ในปริมาณเฉลี่ย 377.29 ± 456.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่การใช้สารเคมีกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์ในน้ำตาลใสของเกษตรกร มีความแตกต่างกันของปริมาณอย่างมาก โดยพบตั้งแต่ 11.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถึง 2,106.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อาจเป็นผลเนื่องมาจากความไม่เข้าใจในวิธีการใช้ของเกษตรกร เพราะจากการเข้าศึกษาสถานการณ์ในพื้นที่ทำให้ทราบว่าเกษตรกรผู้ผลิตเข้าใจว่าสารเคมีในกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์เป็นสารกันบูดที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย สามารถนำไปใช้ได้ในอาหารได้ เนื่องจากมีการแสดงฉลากกำกับว่า เป็นสารที่มีสรรพคุณในการรักษาสีของผัก ผลไม้ รวมถึงผลิตภัณฑ์ของผักผลไม้ เช่น น้ำตาลปี๊ป น้ำผลไม้ เป็นต้น และมีการแสดงปริมาณการใช้โดยทำเป็นสารละลาย 1-2 % ชุบผัก ผลไม้หรือ ใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหารไม่เกิน 100 ppm (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับปริมาณการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในตัวอย่ำนน้ำตาลใสที่พบ ถ้าพิจารณาในกรณีที่น่าไปผลิตเป็นน้ำตาลสดนั้น ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 (พ.ศ. 2543)¹² เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท มีการอนุญาตให้มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ไม่เกิน 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฉลี่ยที่พบจะเห็นได้ว่าการเจือปนอยู่ในปริมาณที่สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดถึง 5 เท่าตัว โดยร้อยละ 31 ของตัวอย่างน้ำตาลใสมีซัลเฟอร์ไดออกไซด์เกินมาตรฐานนี้ ดังนั้นถ้าไม่ควบคุมปริมาณการใช้ให้เหมาะสมอาจส่งผลต่อไปยังผลิตภัณฑ์น้ำตาลสดที่บรรจุในภาชนะปิดสนิทได้ แม้ในขั้นตอนการผลิตน้ำตาลสดจะไม่ได้ใช้สารกลุ่มนี้ แต่

ถือเป็นสิ่งที่ติดมากับวัตถุดิบ คือน้ำตาลใส ดังผลการศึกษาของวันชัย¹⁵ จะเห็นได้ว่าทุเรียนกวน ซึ่งเป็นอาหารพื้นบ้านที่ยังไม่มีการกำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไว้อย่างชัดเจน ก็พบว่าการตรวจพบปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์สูงที่สุดถึง 2,334.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

นอกจากเกษตรกรจะใช้สารเคมีในกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์ เป็นวัตถุกันเสียเพื่อรักษาคุณภาพของน้ำตาลใสไม่ให้เสื่อมเสียแล้ว สารกลุ่มนี้ยังช่วยทำให้น้ำตาลมะพร้าวที่เคี่ยวจากน้ำตาลใสที่มีการเจือปนของสารประกอบซัลไฟด์ มีสีชาวนวลมากขึ้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning Reaction) ของอาหาร¹⁶ จึงนิยมนำมาใช้ป้องกันปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของน้ำตาลมะพร้าวที่เกิดจากความร้อน (Caramelization) ในขณะเคี่ยว และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำให้สามารถเก็บน้ำตาลได้นานขึ้นโดยยังคงสีเหลืองอ่อนเหมือนเดิม¹⁷ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้มีการใช้สารเคมีในกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์กันอย่างแพร่หลายทั้งในการเตรียมน้ำตาลใสและการเคี่ยวน้ำตาลมะพร้าวเนื่องจากการขาดความระมัดระวังในการควบคุมการผลิต แม้จะมีการกำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ได้ ดังที่พบการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำตาลมะพร้าวทั้งที่จำหน่ายในท้องตลาดและที่ผลิตจากแหล่งผลิตโดย พ.ศ.2544 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงครามร่วมกับสำนักงานสาธารณสุขสมุทรสงครามสำรวจปริมาณสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำตาลมะพร้าวที่ผลิตในจังหวัด 779 ตัวอย่าง พบน้ำตาลมะพร้าวที่มีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เกิดมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ร้อยละ 50.2⁶

และใน พ.ศ.2547 จากการศึกษาของเวณิกา เบญจพงษ์ และคณะพบว่า ร้อยละ 56 ของน้ำตาลมะพร้าวที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้างสูงกว่ามาตรฐาน แต่น้ำตาลมะพร้าวที่จำหน่ายในสมุทรสงครามพบเกินมาตรฐานเพียงร้อยละ 31⁵

นอกจากสารเคมีในกลุ่มสารประกอบซัลไฟด์แล้ว ยังพบการเจือปนของวัตถุกันเสียกลุ่มของกรดเบนโซอิกในน้ำตาลใส ในปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 286.61 ± 415.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสุมาลีและคณะ ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารกันบูดในน้ำตาลมะพร้าวก่อนและหลังแปรรูป พบว่าตัวอย่างมีการกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก เท่ากับ 21.00 % และ 42.00 % W/W ตามลำดับ¹⁸ ถ้าพิจารณาในกรณีที่ต้องการนำน้ำตาลใสไปผลิตเป็นน้ำตาลสดนั้น ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 (พ.ศ. 2543)¹² เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท อนุญาตให้มีกรดเบนโซอิกได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นปริมาณเฉลี่ยของกรดเบนโซอิกที่พบในน้ำตาลใสจึงมีค่าสูงกว่ามาตรฐานนี้เล็กน้อย โดยร้อยละ 3 ของตัวอย่างน้ำตาลใสมีการเจือปนของกรดเบนโซอิกเกินมาตรฐาน การที่พบการเจือปนของกรดเบนโซอิกในน้ำตาลใสในปริมาณเฉลี่ยที่ต่ำกว่าการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพที่แตกต่างกันของสารเคมี 2 กลุ่มนี้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำตาลใส ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารเคมีที่จะนำมาใช้ ว่าสามารถคงประสิทธิภาพตามวัตถุประสงค์ของการใช้ในผลิตภัณฑ์นั้นหรือไม่ ไม่เช่นนั้นจะเกิดการใช้วัตถุกันเสียเกินความ

จำเป็นในการผลิต

จากการที่สารเคมีเหล่านี้สามารถช่วยในเรื่องของการเก็บรักษาน้ำตาลใสไม่ให้เสื่อมสภาพได้นานขึ้น จึงเป็นที่นิยมสำหรับเกษตรกรในการนำมาใช้ป้องกันน้ำตาลใสไม่ให้บูด แต่การขาดความรู้ที่ถูกต้องในการใช้สารเคมี ทำให้พบวัตถุดิบเสียเหล่านี้เจือปนในน้ำตาลใสในปริมาณที่สูง การใช้วัตถุดิบเสียในวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิต คือน้ำตาลใส จะส่งผลต่อเนื่องให้เกิดการตกค้างของวัตถุดิบเสียในผลิตภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลสดหรือน้ำตาลมะพร้าว แม้ในกระบวนการผลิตจะไม่ได้ใช้ก็ตาม ดังนั้นเมื่อศึกษาสถานการณ์การใช้วัตถุดิบเสียในน้ำตาลใสแล้ว จะเห็นได้ว่าการแก้ปัญหาการใช้สารเคมีในน้ำตาลใส นั้น ไม่เพียงแต่ต้องศึกษาประสิทธิภาพของวัตถุดิบเสียต่อการเก็บรักษาน้ำตาลใส แต่ต้องนำเกณฑ์มาตรฐานต่างๆ เกี่ยวกับการใช้ วัตถุดิบเสียในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ น้ำตาลใสเป็นวัตถุดิบในการผลิตมาประกอบการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีอย่างเหมาะสมทั้งชนิดและปริมาณ เพื่อไม่ให้เกิดการตกค้างเกินมาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด ทั้งนี้ส่วนราชการและเกษตรกรต้องมีความเข้าใจที่ตรงกัน เพื่อควบคุมให้เกิดการใช้สารเคมีเหล่านี้อย่างถูกต้องตามวัตถุประสงค์ในการใช้ ทั้งชนิดและปริมาณของวัตถุดิบเสียที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

1. เวนิกา เบ็ญจพงษ์ และประภา คงปัญญา. น้ำตาลมะพร้าว. วารสารหมอชาวบ้าน 2547; 25 (297): 49-51.
2. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำตาลสด. กรุงเทพฯ:สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน; 2546. มพช. 38/2546.
3. อารี แก้วกนกวิจิตร. ผลของไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา. [วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2546.
4. Browning KC, Symons CT. Coconut toddy in Ceylon. J Soc Chem Ind 1916; 35: 1158-62.
5. เวนิกา เบ็ญจพงษ์, อรอนงค์ มหัคฆพงศ์ และทองศักดิ์ ศรีอนุชาต. การตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำตาลปื๊บและน้ำตาลปึกที่ผลิตจากน้ำตาลมะพร้าวที่จำหน่ายในตลาดของจังหวัดสมุทรสงคราม. วารสารโภชนาการ 2547; 39 (3): 45-55.
6. ปกรณ์ น้อยประเสริฐ, นันทนา กลิ่นสุนทร และภาณุโชติ ทองยัง. การตรวจซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในน้ำตาลมะพร้าวที่จังหวัดสมุทรสงคราม โดยวิธี Modified Rankine, วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2544; 44(2): 166-70.
7. Papazian R. Sulfites: safe for most, dangerous for some. FDA consumer, 1996.
8. Wong Dominic W.S. Mechanism and theory in food chemistry. New York: Van Nostrand Reinhold; 1989: 326-34.
9. กระทรวงพาณิชย์. สำนักงานพาณิชย์จังหวัดสมุทรสงคราม. รายงานการศึกษาเรื่องมะพร้าว, 2541.
10. Association Official Analysis Chemists.

- Official Methods for Analysis, 17th ed. Procedure 47.3.43. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
11. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2532. เรื่องมาตรฐานน้ำตาลมะพร้าวที่มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ปนเปื้อน. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2532.
 12. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543 เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2544.
 13. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (พ.ศ. 2547) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2547.
 14. เวณิกา เบ็ญจพงษ์, อาณัติ นิติธรรมยง, เรณู ทวีชาติวิทยากุล, และคณะ. รายงานวิจัย เรื่อง การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำตาลปี๊บและน้ำตาลปี๊กว่าความปลอดภัยในการบริโภค และถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อเศรษฐกิจชุมชน. นครปฐม: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549.
 15. วันชัย ศรีทองคำ. กระทรวงสาธารณสุข. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา .กองควบคุมอาหาร.การศึกษาศถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร. Available from: [http://elib.fda.moph.go.th/library/fulltext1 /private/picture.asp?temp=12676](http://elib.fda.moph.go.th/library/fulltext1/private/picture.asp?temp=12676), accessed 2009 Nov 1.
 16. Sapers GM. Browning of foods: controls by sulfites, antioxidants, and other means. Food Technol 1993; 47(10): 75-84.
 17. เวณิกา เบ็ญจพงษ์ อรอนงค์ มหัทธพงศ์ อาณัติ และคณะ. การใช้สารซัลไฟต์ในการผลิตน้ำตาลมะพร้าวและปรับปรุงการผลิตให้ปลอดภัยต่อการบริโภค. วารสารอาหาร 2550; 37(2): 163-72.
 18. สุมาลี วงบุตร, นิศากร ทองก้อน. รายงานวิจัย เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณสารกันบูดในน้ำตาลผลิตภัณฑ์จากมะพร้าว. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี; 2547.

Situation of Preservatives Used in Coconut Sap

Kangsadan Singsoong, Wenika Benjapong*, Narissara Moungrichan and Weeraya Karnpanit

Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT

Coconut sap is a raw material using for coconut sugar and sterilized coconut sap production. Traditionally, Payom or Khiem wood chips which are added to the collecting cylinder for preservation of the sap are antimicrobial properties. Production became modernized with the use of chemical preservatives to prevent the coconut sap deterioration. Unsuitable use of chemical preservatives could cause the problem in consumer health. This study investigated the use of chemical preservatives in coconut sap. The samples of coconut sap were collected from farmers in Samut Songkhram for analysis of types and levels of preservatives used in the samples. Samples were analyzed for sulfites by using a test kit for Sodium Hydrosulfite in Food (Bleaching agent) Products from the Department of Medical Sciences. Levels of sulfur dioxide were determined using the Optimized Monier-Williams method. The type and quantity of benzoic acid and sorbic acid were determined by Reverse Phase Liquid Chromatography. Sulfur dioxide was found 39 samples of 100 samples at the level ranging from 11.01- 2,106.94 mg/kg. The mean $\pm$ SD of sulfur dioxide was 377.29 ± 456.68 mg/kg. Benzoic acid was found in 10 samples ranging from 31.37- 1,384.45 mg/kg. The mean $\pm$ SD of benzoic acid was 286.608 ± 415.68 mg/kg. Two coconut sap samples were found both sulfur dioxide and benzoic acid. Therefore, the potential misuse of these preservatives should be strictly controlled and suitably used in order to improve the safety of products made from coconut sap. Otherwise the production might need to be controlled by food sanitation and promote use of natural preservatives.

Keywords: Coconut sap, preservatives, sulfur dioxide, benzoic acid

* Corresponding author:
Asst. Prof. Dr. Wenika Benjapong
Institute of Nutrition, Mahidol University,
Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand
E-mail: nuwbe@mahidol.ac.th

การนำหลักการประเมินความเสี่ยงมาใช้เฝ้าระวังการบริโภคอาหารผสมสี

เวณิกา เบ็ญจพงษ์ วีรยา การพานิช และ ปิยนุช วิเศษชาติ

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

การกำหนดระดับสูงสุดของวัตถุเจือปนอาหารต้องผ่านการประเมินความเสี่ยงก่อน เพื่อป้องกันการนำไปใช้ในระดับที่ก่ออันตรายต่อสุขภาพ โดยเฉพาะผู้มีอายุน้อยซึ่งกระบวนการด้านทันตและกำจัดสารพิษยังพัฒนาไม่เต็มที่ แต่อาหารที่เด็กนิยมบริโภคมักเป็นอาหารผสมสีจึงต้องเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการได้รับสีสังเคราะห์ที่อยู่ในระดับที่ก่อผลเสียต่อสุขภาพ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงของการได้รับสีสังเคราะห์จากการบริโภคอาหารของเด็ก โดยประเมินจากค่ามาตรฐาน และสถานการณ์จริงในภาคกลาง (กรุงเทพฯและนครปฐม) และภาคใต้ (สุราษฎร์ธานี) ของประเทศ การประเมินจากค่ามาตรฐานของ Codex พบว่า สี 7 ชนิด ได้แก่ คาร์โมอิซิน, เออร์โรซิน, ปองโซ 4 อาร์, ไรโบฟลาวิน, ตาร์ตราซีน, ซันเซต เยลโลว์ และอินดิโกติน มีปริมาณการได้รับสัมผัสในกลุ่มเสี่ยงคือเด็กอายุ 3-5.9 ปี สูงกว่าค่า Acceptable Daily Intake (ADI) จึงต้องปรับลดค่ามาตรฐานของสีเหล่านี้ลง ผลการเก็บตัวอย่างอาหารที่เด็กนักเรียนนิยมบริโภคพบการเจือปนสีสังเคราะห์ 7 ชนิด ได้แก่ ตาร์ตราซีน, ซันเซต เยลโลว์, คาร์โมอิซิน, ปองโซ 4 อาร์, เออร์โรซิน, ฟาสกรีนต์ และบิลเลียนท์ บลู ซึ่งเป็นสีที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข โดยสีกลุ่มสีเหลือง คือ ตาร์ตราซีน และซันเซต เยลโลว์ และสีแดงคือ คาร์โมอิซิน เป็นสีที่นิยมใช้ในอาหารที่เด็กนิยมบริโภคหลายชนิด ผลการประเมินความเสี่ยงของการได้รับสีเหล่านี้ กลับพบว่าสีที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงจากการได้รับสัมผัสสูงกว่าสีอื่น คือเออร์โรซิน (สีแดง) และซันเซต เยลโลว์ (สีเหลือง) เนื่องจากเป็นสีที่มีค่า ADI ต่ำ ทำให้มีโอกาสก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการได้รับสัมผัสสูงกว่าสีอื่นในปริมาณการบริโภคที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามการได้รับสีสังเคราะห์จากการบริโภคอาหารที่ระดับเฉลี่ยของเด็กนักเรียนมีปริมาณต่ำกว่าค่า ADI ของสีแต่ละชนิดมาก แสดงว่าปริมาณสีสังเคราะห์ผสมอาหารที่เด็กได้รับในแต่ละวันไม่อยู่ในระดับที่มีโอกาสก่อผลเสียต่อสุขภาพ ยกเว้นสีเออร์โรซินที่พบมีการเจือปนในไส้กรอกที่จำหน่ายในพื้นที่ชนบทของ จ.นครปฐม ในระดับที่สูงกว่าพื้นที่อื่นมาก ถ้าประเมินในกลุ่มที่บริโภคไส้กรอกปริมาณสูง (97.5 เปอร์เซ็นต์ไทล์) จะมีค่าสูงถึง 90 % ของ ADI เมื่อรวมกับการบริโภคอาหารรายการอื่นที่ระดับเฉลี่ยจะทำให้ปริมาณการได้รับสีนี้สูงกว่าค่า ADI แสดงว่าถ้าเด็กกลุ่มนี้บริโภคไส้กรอกปริมาณสูงอย่างต่อเนื่องอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการได้รับสีเออร์โรซินในระดับที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพได้ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรให้ความรู้แก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค ในการหลีกเลี่ยงการผลิตหรือบริโภคอาหารที่มีการเจือปนสีนี้ในปริมาณสูง เช่น ไส้กรอก และน้ำหวาน

คำสำคัญ การประเมินความเสี่ยง สีสังเคราะห์ อาหารผสมสี

* Corresponding author:

ผศ.ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

Email: nuwbe@mahidol.ac.th

Health Risk Assessment of Methomyl Exposure among Farmers in Jasmine's Agriculture

Chaiklieng S¹, Suggaravetsiri P², and Charerntanyarak L²

¹ Department of Environmental Health Science, Faculty of Public Health, Khon Kaen University

² Department of Epidemiology, Faculty of Public Health, Khon Kaen University

ABSTRACT

Methomyl, a cholinesterase-inhibiting insecticide, is commonly used in a jasmine's agricultural area, Sila Sub-district, Khon Kaen Province, northeast of Thailand. This cross sectional study aimed to determine the potential health risk to methomyl exposure among farmers working in a jasmine's agriculture. Personal air samplings were conducted by using Universal Pump Model 224-PCXR8, SKC with filter/solid sorbent tube (OVS-2 tube: 13-mm quartz fiber filter, XAD-2, 270 mg/140 mg). All samples were analyzed by using HPLC with UV detector. Exposure concentrations and hazard quotients (HQ) were estimated for inhalation exposure risk.

This study found that the maximum concentration of methomyl in the breathing zone of workers (N=24) was 1.119 mg/m³ (range 0-1.119 mg/m³). Comparison to the standard regulatory on the ambient concentration of methomyl, i.e. TLV-TWA of 2.5 mg/m³ (ACGIH) or PEL-TWA of 2.5 mg/m³ (NIOSH), the results of this study did not exceed the regulation. The average inhalation exposure to methomyl was 0.018±0.037 mg/kg-d. The result of average HQ indicated no health risk (HQ=0.723±1.461). When each farmer was considered, there were 6 farmers (25%) with high risk (HQ >1). Therefore, there should be health surveillance program and occupational health services for jasmine's agriculture farmers to work and live safely.

Keywords: Methomyl, health risk assessment, jasmine's agriculture

* Corresponding author:
Dr. Sunisa Chaiklieng
Department of Environmental Health Science,
Faculty of Public Health, Khon Kaen University
Email: csunis@kku.ac.th

Antimutagenic Activity of *Curcuma elata* Extract against 4-Nitroquinoline 1-oxide and 2-Aminoanthracene Toxicity Observed by *Salmonella* Mutation Assay

Puchadapirom P and Himakoun L*

Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok.

ABSTRACT

The use of natural chemicals to suppress or reverse the carcinogenic processes is a promising approach for the prevention of cancers. Most of the chemopreventive agents are derived from various kinds of plant extracts. Both 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) and 2-Aminoanthracene (2-AA) are mutagenic agents and have been implicated in the etiology of human cancers and other diseases. In this study, the hexane extract of *Curcuma elata* Roxb., a Thai medicinal plant known as Wan-chak-mot-luk, was investigated for its antimutagenic activities against the direct acting mutagen, 4-NQO as well as the indirect acting mutagen, 2-AA, by using the *Salmonella* mutation assay (Ames test). The results indicated that the extract from *C. elata* itself does not display a mutagenic activity at the concentration of 5-500 µg/plate. The inhibitory effect of *C. elata* against 4-NQO mutagenic activity was shown in a dose dependent manner with the concentration of 25-75 µg/plate. The highest inhibitory effects were 66.2% and 73.9% observed in TA98 and TA 100, respectively. In addition, *C. elata* extract at the concentration of 1,000 µg/plate exhibited the highest inhibitory effect against 2-AA mutagenic activity with 40.9% and 49.9% inhibitions in TA98 and TA 100, respectively. In conclusion, the hexane extract of *C. elata* did not display mutagenic activity in the Ames test but had antimutagenic activity against the carcinogenic compounds 4-NQO and 2-AA. Our results demonstrated that *C. elata* Roxb. could potentially be used as a novel cancer chemopreventive agent.

Keywords: *Curcuma elata* Roxb., Ames test , antimutagenicity

* Corresponding author:
Assoc. Prof. Lakana Himakoun
Department of Pathobiology, Faculty of Science,
Mahidol University, Bangkok, Thailand
E-mail: sclhk@mahidol.ac.th

***Phyllanthus emblica* (Ma-Kham-Pom) Increased the Proliferation of Mouse Splenocytes While Suppressing Mouse Lymphoma Cell Growth**

Huabprasert S^{1*}, Wongkajornsilp A¹, Akarasereenont P^{1,2}, Panich U¹, Laohapand T², Kasetinsombat K¹ and Kangsadalampai K³

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

² Center of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok.

ABSTRACT

Phyllanthus emblica Linn. (Ma-Kham-Pom) has been constituted as an herbal component of Thai traditional recipes proposed to slow down the aging process. A number of methodologies were employed to investigate the anti-aging effects of *P. emblica* in a mice model. The infusion of *P. emblica* could directly drive the proliferation of mice splenocytes in a dose-dependent manner. The *P. emblica* infusion was cytotoxic to the YAC-1 (mouse lymphoma) cells in the studied dose, while sparing the human umbilical endothelial cells. Mice ingesting *P. emblica* infusion for 14 days carried healthy splenocytes with higher proliferative potential in a dose-dependent relationship. However, the isolated splenocytes from the ingesting group did not exhibit higher NK cell activity. We concluded that *P. emblica* infusion was relatively safe and contained growth enhancing activity toward mice splenocytes

Keywords: *Phyllanthus emblica*, mouse splenocyte, lymphoma cell

* Corresponding author:

Mr. Sukij Huabprasert,
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand
E-mail: sishp@mahidol.ac.th

Association between P53 Codon 72 Gene Polymorphism and Risk of Lung Cancer in Thailand

Danai Tiwawech^{1*}, Adisak Sornprom², Anant Karalak³ and Takafumi Ishida⁴

¹ Research, ²Surgery and ³Pathology Divisions, National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand,

⁴ Unit of Human Biology and Genetics, Department of Biological Sciences, School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

ABSTRACT

Lung cancer (LUC) is a malignancy killer causing uncountable losses worldwide annually including Thailand. Clinically, the early stage of LUC has no specific warning signs, resulting in late diagnosis when cancer is incurable. Screening for early stage of patients with LUC in high-risk population for intensive counseling and immediately efficient treatment has been suggested to be the best way to prevent this undesirable cancer. Therefore, a mass screening for early stages of LUC patients without cancer-related symptoms is urgent. P53 codon 72 gene (*P53cd72*), producing P53 protein for inducing cancer cell arrest and apoptosis, has been reported to be polymorphic and associated with increased risk of several cancers. This study aimed to investigate the association between *P53cd72* polymorphism and the risk of LUC in Thai population. The frequency of *P53cd72* genotypes [*Arginine/Arginine (Arg/Arg)*, *Arginine/Proline (Arg/Pro)* and *Proline/Proline (Pro/Pro)*] was detected in DNA extracted from white blood cells of 60 patients with LUC and 148 healthy controls using the real time-polymerase chain reaction (R-PCR) assay.

The results of *P53cd72* genotypes detection in the LUC group showed that 4 (6.67%), 40 (66.67%), and 16 (26.67%) of the patients had *Arg/Arg*, *Arg/Pro* and *Pro/Pro*, respectively whereas in the healthy control group, 50 (33.78%), 28 (18.92%), and 70 (47.30%) of subjects had *Arg/Arg*, *Arg/Pro* and *Pro/Pro*, respectively. Overall, the frequency of *P53cd72* genotypes between LUC and healthy control groups was significantly different ($p < 0.001$). Individuals with *Pro/Pro* had an increased risk at 7.14-fold for LUC development as compared with those with *Arg/Arg* (Odds ratio = 7.14, 95% confidence interval = 2.17-23.46). In addition, the associations between *Pro/Pro* genotype and the increased risk of LUC in cigarette smokers and alcohol drinkers were observed. The findings of this study showed that *P53cd72* polymorphism was associated with LUC and the *Pro/Pro* genotype was an important factor that could increase the risk for LUC development. Therefore, we suggested that the *P53cd72* polymorphism detection could be very useful in screening for high-risk group that may lead to identification of early stages of LUC in Thai population.

Keywords: Lung cancer, risk factor, *P53 codon 72* gene, polymorphism, Thailand.

* Corresponding author:

Dr. Danai Tiwawech,
National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand,
E-mail: tdnai@hotmail.com

Cadmium Levels in Blood and Tissues and the Correlation between Blood Cadmium and Plasma Testosterone in Beef Cattle from a Polluted Area in Thailand

Trakranrungsie N*, Yatmark P and Nakthong C.

Faculty of Veterinary Science, Mahidol University-Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand

ABSTRACT

Since the incidence of cadmium- (Cd) polluted environment has been declared in the area of Mae Sot district, Tak province, Thailand, investigation on Cd-contaminated agricultural products and human health has been conducted. This study aimed to investigate the levels of Cd in blood, liver and kidney of beef cattle at different age and the possible adverse health impact on the animals. The results revealed that beef cattle reared in this polluted area accumulated high Cd levels in kidney and liver, in which the significant positive correlations between tissue Cd levels and age were detected. With regard to food safety standard, 62% of the 99 studied cattle had renal Cd at levels exceeding the safety limit (1 mg/kg) and 43% concomitantly had hepatic Cd higher than the permitted level (0.5 mg/kg). It was also suggested that environmental Cd exposure could disrupt testosterone homeostasis as demonstrated by the correlation analysis between blood Cd levels and testosterone levels in each age group. These findings indicated that Cd levels in food-producing grazing animals would help reflect the levels of environmental contamination and be valuable in risk estimation of Cd carry-over on human via food chain. The results implied that testicular function was sensitive to Cd and data obtained from the animals could be regarded as a bio-indicator for risk of reproductive dysfunction in humans

Keywords: Cadmium, testosterone, beef cattle, Thailand

* Corresponding author:
Asst. Prof. Nopamas Trakranrungsie
Faculty of Veterinary Science, Mahidol University
Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand.
E-mail: vsntk@mahidol.ac.th

Detection of Urinary Kidney Injury Molecule-1 in a Chronic Cadmium Exposed Population, Mae Sot District, Tak Province

**Amnart Panyamoon¹, Kowit Nambunmee², Muneko Nishijo³,
Witaya Swaddiwudhipong⁴ and Werawan Rungyutthikarn^{1*}**

¹ Division of Toxicology, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

² Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

³ Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan.

⁴ Department of Social Medicine, Mae Sot General Hospital, Tak Province, Thailand.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) has been found as an environmental pollutant in Mae Sot district, Tak province. Contaminated Cd in water and rice causes high risk of renal dysfunction among the inhabitants. In order to investigate the effect of Cd induced renal dysfunction, a kidney injury molecule-1 (KIM-1), a recently discovered biomarker for an early detection of renal tubular dysfunction, was measured using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Polyclonal goat anti-KIM-1, horseradish peroxidase labeled streptavidin and its specific substrate were used in the in-house ELISA technique. The method was validated and used to quantitate KIM-1 in the urine of 700 Mae Sot inhabitants in comparison to two conventional renal biomarkers; N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and β_2 -microglobulin (β_2 -MG). The results showed that KIM-1 standard concentrations provided good linearity ($r=0.998$) with limit of detection and quantitation at the concentrations of 33.20 pg/ml and 110.68 pg/ml, respectively. The coefficient variation (CV) for inter-day and intra-day precisions for 3 levels of KIM-1 (200, 800 and 3,000 pg/ml) were at 0.8, 1.2, and 2.1% CV and 0.7, 2.4, and 6.7% CV, respectively. The accuracy of the assay was found with 89-101% recovery. The average $\pm$ SD of the KIM-1 concentrations in urine samples of 700 Mae Sot inhabitants were at $1,347 \pm 1,290$ pg/gCr, ranged between 61-15,330 pg/gCr. Using Spearman's rho analysis, a strong positive correlation between KIM-1 and Cd concentrations ($r=0.234$, $P<0.001$) was found. The Cd was also correlated well with the NAG ($r=0.263$, $P<0.001$) and β_2 -MG ($r=0.179$, $P<0.001$). Prevalence of high excretion of renal biomarkers was shown in dose response relationship to Cd concentrations. This finding demonstrated that KIM-1 was a sensitive biomarker for detection of renal dysfunction in population with high Cd exposure.

Keywords: Kidney Injury Molecule-1, ELISA, cadmium, Mae sot, Thailand

Full paper on page 72

* Corresponding author:

Assoc. Prof. Dr. Werawan Ruangyutthikarn,
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand,
E-mail: wruangyu@med.cmu.ac.th

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากกระทกรก ต่อเซลล์ไขกระดูกหนูถีบจักร

ขวัญยืน ศรีเปารยะ¹, ผ่องพรรณ หมอกมิด^{1*}, จิรภา ศิลาเกษ¹, และทรงพล ชีวพัฒน์²

¹ ฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

² กลุ่มวิจัยสรรพคุณและพิษของสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

กระทกรก *Passiflora foetida* Linn. เป็นไม้เถาเลื้อย ในประเทศไทยมีการนำไปใช้เป็นอาหาร ใช้เป็นยาสมุนไพร ถอนพิษเบื่อเมา รักษาบาดแผล ขับเสมหะ แก้ไอ รักษาสิว และอาการบวม ส่วนที่เป็นพิษคือใบและผลดิบ เนื่องจากมีสารกลุ่ม cyanogenetic glycosides ได้แก่ tetraphyllin A, tetraphyllin B, deidaclin, volkenin และ linamarin เมื่อสารเหล่านี้สลายตัวจะได้ acetone และ hydrocyanic acid เป็นสารพิษ คณะผู้วิจัยจึงศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันต่อเซลล์ไขกระดูกของสัตว์ทดลองจากการได้รับสารสกัดกระทกรก โดยใช้วิธีไมโครนิวเคลียส เพื่อเพิ่มเติมข้อมูลผลการทดสอบทางพิษวิทยาของสารสกัดกระทกรก โดยการป้อนสารสกัดให้หนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมีย 156 ตัว ในความเข้มข้น 5 g/Kg BW, 10 g/Kg BW และ 20 g/Kg BW และกลุ่มควบคุม จากนั้น เก็บตัวอย่างเซลล์ไขกระดูก ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความถี่ในการเกิดไมโครนิวเคลียส ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดกระทกรกที่ระดับ 5-20 g/kg BW ไม่เปลี่ยนแปลงค่า Micronucleus polychromatic erythrocyte ต่อ 1,000 Polychromatic erythrocyte อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสจากสารสกัดกระทกรกดังกล่าว ไม่พบการรบกวนการสร้างเซลล์ไขกระดูกของสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: พิษเฉียบพลัน กระทกรก เซลล์ไขกระดูก ไมโครนิวเคลียส

* Corresponding author:

คุณผ่องพรรณ หมอกมิด

ฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

E-mail: pmokmued@hotmail.com

Protective Role of Gamma Oryzanol in Rice Bran Oil on Sodium Arsenite-Induced Rat Testis Toxicity

**Naovarat Tarasub¹, Siriporn Soponsupattthaporn²,
and Watcharaporn Devakul Na Ayutthaya³**

¹ Anatomy Unit, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Thailand.

² Biomedical Science Program, Faculty of Science, Rangsit University, Thailand.

³ Pharmacology and Toxicology Unit, Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Thailand.

ABSTRACT

Arsenic (As) compounds are environmental toxins and cause oxidative stress. The gamma oryzanol, antioxidant compound, in rice bran oil (RBO) may prevent the oxidative stress resulted from sodium arsenite. The aim of study was to investigate the potential protective effects of gamma oryzanol in RBO in attenuating the rat testis toxicity induced by oral exposure of sodium arsenite. Male Wistar rats were subdivided into six groups for 8 animals each. The first group was used as control. While, groups 2-6 were orally treated with sodium arsenite (As 30 mg/kg BW), Suriny RBO (gamma oryzanol 1.7 mg/kg BW), vitamin E (125 mg/kg BW), Suriny RBO (gamma oryzanol 1.7 mg/kg BW) plus As (30 mg/kg BW) and vitamin E (125 mg/kg BW) plus As (30 mg/kg BW), respectively. All groups were treated by gavage once daily for 8 days except in As-treated groups; it treated only once on the last day of treatment. After 24 h of the last treatment, the malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and histological changes of testis were evaluated. The results showed that the reduced GSH level was decreased in As treated group and decreased significantly in RBO and vitamin E pretreated groups ($p < 0.05$) as compared to the control group. Moreover, the MDA level was increased in As treated group. Pretreatment with RBO and vitamin E could not inhibit the increase of MDA level from As treatment. Histological evaluation also revealed no significant changes in all groups of treatment. In conclusion, the gamma oryzanol in RBO at the studied dosage could not prevent the damages induced by As in rat testis.

Keywords: Gamma oryzanol, rice bran oil, vitamin E, malondialdehyde, glutathione, sodium arsenite, testis

* Corresponding author:
Dr. Naovarat Tarasub
Anatomy Unit, Department of Medical Sciences,
Faculty of Science, Rangsit University, Thailand
E-mail: tarasubnao@gmail.com

Effect of Aqueous Extract from *Cleistocalyx nervosum* on Oxidative Status in Rat Liver

Taya S, Punvittayagul C, Chewonarin T, and Wongpoomchai R.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

ABSTRACT

Cleistocalyx nervosum var. *paniala*, Ma-kiang, is a local plant in northern region of Thailand presenting high antioxidant activity *in vitro*. Our previous study found that 5 g/kg bw of *C. nervosum* aqueous extract had no acute toxic effect on rat. The present study was designed to determine effect of aqueous extract of *C. nervosum* on oxidative status in rat liver. Male Wistar rats were divided into 3 groups. Rats in group 1 were received water as a vehicle control, while group 2 and 3 were received 100 and 500 mg/kg bw of aqueous extract via intragastrum 5 times a week for 4 weeks. At the indicated time, the effect of *C. nervosum* on oxidative stress and antioxidant system were evaluated. Aqueous extract of *C. nervosum* did not affect on the level of total glutathione, glutathione peroxidase and catalase activities. Low dose of *C. nervosum* (100 mg/kg bw) significantly increased malondialdehyde formation but high dose (500 mg/kg bw) did not. However, 500 mg/kg bw of *C. nervosum* extract significantly enhanced heme oxygenase-1 activity. Although the aqueous extract of *C. nervosum* at low dose exhibited the pro-oxidant effect but at high dose, it reduced oxidative stress in rat liver. In conclusion, the aqueous extract of *C. nervosum* might show biphasic effect on oxidative status of rat liver.

Keywords: Antioxidant, *Cleistocalyx nervosum*, liver, Ma-kiang and oxidative stress

Full paper on page 101

* Corresponding author:
Asst. Prof. Rawiwan Wongpoomchai
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
Email: rawibiochem@yahoo.com

Anti-Oxidative Stress Activities of Silibinin on α -Amanitin *In Vitro*

**Khunnala A¹, Narongchai S¹, Butkrachang S², Leelarungrayub D³,
and Narongchai P¹**

¹ Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

² Lampang Agricultural Research and Training Center, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang, Thailand

³ Oxidative stress and Exercise Biochemistry Laboratory, Department of Physical Therapy, Faculty of Associated Medical Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

ABSTRACT

Alpha amanitin (α -amanitin) is the mainly toxic substance in *Amanita* mushrooms in Thailand. Toxicity of α -amanitin is directly on the liver organ leading to body systemic failure. Silibinin is an antioxidant and only one medication that can help reduce the toxicity of α -amanitin, but its mechanism of action is still unclear. The antioxidant activities of silibinin in scavenging free radicals, i.e. superoxide radical, hydroxyl radical, and H_2O_2 as well as the direct trapping between silibinin and α -amanitin were evaluated in vitro. The scavenging free radicals of silibinin in this study were demonstrated in XO-HX, Ribose- and H_2O_2 -ABT/HRP systems by comparing to the standard antioxidants; gallic acid, N-acetylcysteine (NAC), and quercetin. Anti-toxicity was studied in human blood from α -amanitin oxidation, then the whole blood glutathione (GSH) and plasma malondialdehyde (MDA) levels were detected with DTNB and TBARs. The results showed that silibinin scavenged superoxide radicals lower than quercetin but higher than gallic acid and NAC. It scavenged hydroxyl radicals better than quercetin, NAC and gallic acid, respectively. However, the scavenging activity on H_2O_2 of silibinin was lowest among the compared antioxidants. Interestingly, silibinin protected the GSH and inhibited MDA production in blood from α -amanitin oxidation in a dose response manner. The study revealed that silibinin had scavenging activity directly on free radicals, especially superoxide, hydroxyl radicals, and H_2O_2 . It also protected the GSH and inhibited MDA production in human blood from α -amanitin oxidation.

Keywords: Alpha amanitin, silibinin, antioxidant activity, scavenging free radical, *Amanita* mushroom

* Corresponding author:

Prof. Paitoon Narongchai, MD.

Department of Forensic Medicine Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail: pnarongc@mail.med.cmu.ac.th

Effect of Pinocembrin on Promotion Stage in Diethylnitrosamine-Induced Rat Hepatocarcinogenesis

Punvittayagul C¹, Taya S¹, Pompimon W², and Wongpoomchai R^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Lampang Rajabhat University, Thailand.

ABSTRACT

Pinocembrin (5, 7-dihydroxyflavanone) is one of flavanone found in rhizome of *Boesenbergia pandurata*. Our previous study demonstrated that pinocembrin had no toxicity and mutagenicity in male rat. To evaluate the effect of pinocembrin on promotion stage in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis, using the medium-term carcinogenicity test, male Wistar rats were divided into 7 experimental groups. At week 3 and 4 of an experiment, groups 1 to 5 were given a double intraperitoneal (i.p.) injection of diethylnitrosamine (DEN) to initiate hepatocarcinogenesis, while groups 6 and 7 were i.p. administered a normal saline solution. Before 2 week of injection, groups 2 and 3 were orally received pinocembrin at 2 and 10 mg/kg bw, respectively. Group 4 and 5 were fed with pinocembrin at 2 and 10 mg/kg bw, respectively, after injections for 1 week. Group 1 and 6 were treated with 5% tween-80 as a vehicle control, while group 7 was fed with pinocembrin at 10 mg/kg. All animals were 2/3 partial hepatectomized at week 6 and were sacrificed at weeks 15. The livers were immunohistochemically examined for glutathione-s-transferase placental form (GST-P) expression, a preneoplastic lesion of rat hepatocellular carcinoma, as the end point marker. These results showed that pinocembrin did not present carcinogenicity in rat. Furthermore, the number of GST-P positive foci slightly decreased in rat treated with 10 mg/kg bw of pinocembrin after DEN injection. It could be concluded that pinocembrin lacked carcinogenicity in rat liver and did not present anticarcinogenicity in DEN-induced rat hepatocarcinogenesis.

Key words: *Boesenbergia pandurata*, 5, 7-dihydroxyflavanone, medium-term carcinogenicity test, pinocembrin, GST-P positive foci

* Corresponding author:

Asst. Prof. Dr. R. Wongpoomchai

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Thailand

E-mail: rpuatana@mail.med.cmu.ac.th

Effects of Bran Extracts from Thai Molecular Breeding Rices on Growth and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells

**Supanart Srisala¹, Rodjana Chunhabundit^{2*}, Ratchanee Kongkachuichai³,
Bunyada Jittorntrum¹ and Yupin Visetpanit²**

¹ Nutrition Program, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital and Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

² Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³ Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Rice bran, the outer layer of brown rice, contains biologically active compounds which mediate chemopreventive properties. Thus, in the present study, we evaluated the anti-carcinogenic effects of bran extracts from non-pigmented (Sinlek) and pigmented (Riceberry) rices on human promyelocytic leukemia cell line (HL-60 cells). The results showed that the treatment with rice bran extracts for 24 and 72 hours reduced cell viability in a dose- and time-dependent manner. Riceberry rice bran extract showed higher cytotoxic activity, corresponding with the lower IC₅₀ compared to Sinlek variety. The low concentrations of both rice bran extracts which did not affect cell viability were able to inhibit DNA synthesis, whereas the higher selected concentrations that reduced viable cells could induced apoptosis. The apoptotic events were confirmed by chromatin condensation and nuclear fragmentation in cells after AO/EB nuclear staining as well as dose- and time- dependent increase of caspase activity. The findings suggested that bran extracts of new Thai rice varieties exhibited growth inhibitory effects on the human leukemia cells through cytostatic and cytotoxic mechanism. The results also indicated that killing leukemia cells by rice bran extracts partially involved activation of caspases and induction of apoptosis

Keywords: Rice bran; human leukemia cells; cytotoxicity; cytostatic; apoptosis

Full paper on page 81

* Corresponding author:

Rodjana Chunhabundit

Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital

Mahidol University, Bangkok, Thailand

E-mail: rarch@mahidol.ac.th

Cytoprotective and Cytotoxic Effects of Rice Bran Extracts on H₂O₂-Induced Oxidative Damage in Human Intestinal Caco-2 Cells

Bunyada Jittorntrum¹, Rodjana Chunhabundit^{2*}, Ratchanee Kongkachuichai³, Supanart Srisala¹ and Yupin Visetpanit²

¹ Nutrition Program, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital and Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

² Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³ Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT

Oxidative stress is considered to play a prominent role in the causation of chronic diseases. At present, Rice Science Center, Thailand used plant biotechnology technique to develop new rice strains with increasing nutritive values. Some rice varieties such as Sinlek brown rice and Riceberry pigmented rice showed high levels of antioxidant contents and activities, especially in bran portion. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of these bran extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. Human intestinal Caco-2 cells were co-incubated with the bran extracts and H₂O₂ for 3 h. Cytotoxic effects of both bran extracts were also evaluated and cell viability measured by MTT assay. Cell growth was inhibited in dose- and time-dependent manner by both bran extracts. The doses at which non-toxic and approximate to IC₅₀ were used to determine effects of the rice bran extracts on H₂O₂ induced oxidative stress. Non-toxic concentrations of both bran extracts protected cells against H₂O₂-induced oxidative stress as antioxidant property. On the other hand, high concentrations enhanced oxidative stress mediated reduction of cell viability. This may result from the pro-oxidant activity that express at high concentrations of the extracts. Sinlek bran extract exhibited antioxidant and pro-oxidant activity higher than Riceberry bran. In addition, the high concentrations of both bran extracts inhibited cell growth in dose and time-dependent manner. Further studies are needed to clarify the potential activities and properties of these bran extract before using as supplement in food or medicine.

Keywords: Oxidative stress, cytoprotective, H₂O₂, rice bran, antioxidant, pro-oxidant.

Full paper on page 92

* Corresponding author:

Rodjana Chunhabundit

Research Center, Faculty of Medicine at Ramathibodi Hospital

Mahidol University, Bangkok, Thailand

E-mail: rarch@mahidol.ac.th

Butylated Hydroxytoluene in Edible Vegetable Oils from Local Markets of Chiang Mai and Mae Hong Son and Its Thermal Stability in Different Cooking Conditions

Likhitrungrat C^{1*}, Chokethaworn N¹, and Suttajit M²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

² School of Medical Science, Naresuan University, Phayao, Thailand

ABSTRACT

Butylated hydroxytoluene (BHT) was widely used to protect oxidation and rancidity of food products containing fats and oils since it had high antioxidant activity. In this study, samples of edible vegetable oils from 25 local markets in Chiang Mai province and Mae Hong Son province were determined for BHT contents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results demonstrated that three palm oil samples from the local markets contained BHT in the range of 6.8-86.1 µg/g. The extracts of edible vegetable oil samples had 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in the range of 7.5 to 75.8% which had gallic acid equivalent and BHT equivalent concentrations in the ranges of 6.5 to 65.9 mg/g and 17.2 to 173.0 mg/g, respectively. Three different home-cooking conditions were tested for thermal stability of BHT in the samples of palm oil. It was found that cooking temperatures at 98-100 °C by boiling or stir-frying for 1-15 min lost BHT 24-31% in the oil, while deep frying at 200±10 °C for 5-15 min showed 46-62% loss of BHT.

Keywords: Butylated hydroxytoluene, edible vegetable oil, antioxidant activity

Full paper on page 113

* Corresponding author:
Miss Chananat Likhitrungrat
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Maejo University, Chiang Mai, Thailand
Email: chananat_im@hotmail.com

ปริมาณไนโตรทีนในแฮมสด แฮมย่าง หมูยอ กุนเชียงและไส้กรอกอีสานที่มีจำหน่ายในตลาดของเชียงใหม่

นรรรัตน์ ภัทรารวรรณ และนันท์ฤทธิ์ โชคถาวร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ไนโตรทีนเป็นสารสำคัญของการเกิดไนโตรซามีน ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลายชนิดนิยมใช้ไนโตรทีนเป็นสารถนอมอาหารเพื่อให้รับประทาน ในงานวิจัยนี้ได้หาปริมาณไนโตรทีนที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ แฮมสด แฮมย่าง หมูยอ กุนเชียงและไส้กรอกอีสาน โดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี ผลการศึกษาพบว่าไนโตรทีนในตัวอย่างแฮมสด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 14-173 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); แฮมย่างมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 184 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 129-252 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); หมูยอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 66 (มีค่าระหว่าง 29-101 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); กุนเชียงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 154 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 65-238 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร); และไส้กรอกอีสานมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 29 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร (มีค่าระหว่าง 14-51 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร) ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้ใช้โซเดียมไนโตรทีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สรุปว่าระดับไนโตรทีนในตัวอย่างแฮมย่าง กุนเชียง และแฮมสดบางตัวอย่างมีปริมาณสูงเกินมาตรฐานกำหนด ขณะที่ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ ไส้กรอกอีสานและหมูยอ มีระดับต่ำและปลอดภัยเพียงพอสำหรับการบริโภค

คำสำคัญ: ไนโตรทีน, ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Full paper on page 130

* Corresponding author:

ผศ.ดร.นันท์ฤทธิ์ โชคถาวร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

E-mail: nantarit.c@gmail.com

สถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลใส

กังสดาล สิงห์สูง, เวณิกา เบ็ญจพงษ์*, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, และวีรยา การพานิช

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

น้ำตาลใสเป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิตน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลสด ในการรักษาคุณภาพน้ำตาลใสระหว่างการรองรับน้ำตาลจากงวงมะพร้าว เกษตรกรนิยมใช้ไม้พะยอม หรือไม้เคี่ยม ซึ่งมีสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันบูดตามธรรมชาติ แต่ปัจจุบันมีการนำสารเคมีสังเคราะห์ประเภทวัตถุกันเสียมาใช้แทน การใช้สารเคมีเหล่านี้อย่างไม่เหมาะสมอาจก่อผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภค การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสถานการณ์การใช้วัตถุกันเสียในน้ำตาลใส โดยเก็บตัวอย่างน้ำตาลใสจากเกษตรกรในจังหวัดสมุทรสงคราม นำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวัตถุกันเสียในน้ำตาลใส ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มของซัลไฟต์ จำแนกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิเคราะห์ปริมาณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยเทคนิค Optimized Monier-Williams และสารประกอบในกลุ่มของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ซึ่งจำแนกชนิดและวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวิร์สเฟส

ผลการศึกษาพบว่าในน้ำตาลใสจำนวน 100 ตัวอย่าง พบการเจือปนวัตถุกันเสีย 2 กลุ่ม คือกลุ่มของสารประกอบซัลไฟต์จำนวน 39 ตัวอย่าง มีการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในช่วง 11.01- 2,106.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณเฉลี่ย 377.29 ± 456.68 มก.ต่อ กก. พบการเจือปนวัตถุกันเสียกลุ่มของกรดเบนโซอิกจำนวน 10 ตัวอย่าง ในช่วง 31.37- 1,384.45 มก.ต่อ กก. มีปริมาณเฉลี่ย 286.608 ± 415.68 มก.ต่อ กก. และน้ำตาลใส 2 ตัวอย่าง มีการตกค้างของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และการเจือปนของกรดเบนโซอิก จะเห็นได้ว่าปริมาณวัตถุกันเสียทั้ง 2 กลุ่มที่พบในหลายตัวอย่างมีค่าสูง ดังนั้นควรหามาตรการควบคุมการใช้วัตถุกันเสียทั้งชนิดและปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำตาลใสทั้งน้ำตาลมะพร้าวและน้ำตาลสดมีการใช้วัตถุกันเสียทั้งชนิดและปริมาณถูกต้องตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐานอาหาร หรือหันมาควบคุมการผลิตตามหลักสุขาภิบาลอาหาร เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการเก็บรักษาน้ำตาลใส และส่งเสริมการใช้สารกันบูดจากธรรมชาติ เช่น ไม้เคี่ยม ไม้พะยอม ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น

คำสำคัญ : น้ำตาลใส, วัตถุกันเสีย, ซัลเฟอร์ไดออกไซด์, กรดเบนโซอิก

* Corresponding author:

ผศ.ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

Email: nuwbe@mahidol.ac.th

การปรับปรุงกระบวนการผลิตเครื่องแกงเผ็ดแดงในระดับชุมชน ให้มีคุณภาพและความปลอดภัย

นริศรา ม่วงศรีจันทร์, เวณิกา เบญจพงษ์*, วีรยา การพานิช และปราณี พัฒนกุลอนันต์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

เครื่องแกงเผ็ดแดง เป็นเครื่องปรุงแต่งรสของอาหารที่คนไทยนิยมใช้อย่างแพร่หลาย การผลิตและการเก็บรักษาเครื่องแกงเผ็ดแดงระหว่างรอการจำหน่ายที่ไม่เหมาะสม อาจส่งเสริมการเจริญของสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ทั้งทางจุลินทรีย์ กายภาพ และเคมี โดยเฉพาะการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสถานการณ์ด้านความปลอดภัยของเครื่องแกงเผ็ดแดงที่ผลิตจากแหล่งผลิตระดับชุมชนในเขตพื้นที่ภาคกลาง โดยการรวบรวมข้อมูลของกรรมวิธีการผลิตและสุขาภิบาลการผลิตพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเครื่องแกงเผ็ดแดงมาตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ และนำข้อมูลมาปรับปรุงกระบวนการผลิตเครื่องแกงเผ็ดแดงในระดับชุมชนให้มีคุณภาพและความปลอดภัยรวมทั้งศึกษาการยืดอายุการเก็บของเครื่องแกงเผ็ดแดงที่เก็บในสภาวะแบบเปิดที่อุณหภูมิห้อง

ผลการศึกษาคุณภาพและความปลอดภัยของเครื่องแกงเผ็ดแดงที่ผลิตจากแหล่งผลิตระดับชุมชนพบว่าแหล่งผลิตที่ใช้วัตถุดิบด้วยคุณภาพ และมีสุขาภิบาลการผลิตที่ไม่เหมาะสม เป็นเหตุให้มีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในเครื่องแกงเผ็ดแดงสูง และพบการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเครื่องแกงเผ็ดจากแหล่งผลิตดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกตัวอย่างของเครื่องแกงเผ็ดแดงที่เก็บจากแหล่งผลิตระดับชุมชนมีค่าคอเรเตอร์แอคติวิตีเกินมาตรฐาน มผช.129/2546 (ไม่เกิน 0.85) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ การศึกษาการปรับปรุงกระบวนการผลิตเครื่องแกงเผ็ดแดงพบว่า การปนเปื้อนของ จุลินทรีย์สามารถลดได้โดยการผลิตตามหลักสุขาภิบาลการผลิตที่ดี และยังทำให้ได้เครื่องแกงเผ็ดที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินต่ำ มีอายุการเก็บในภาชนะเปิดที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 9-10 วัน โดยไม่จำเป็นต้องใช้วัตถุกันเสีย และได้ตามมาตรฐาน มผช.129/2546 สามารถใช้ 2 วิธีการร่วมกันคือ การผลิตเครื่องแกงเผ็ดแดงให้มีร้อยละของเกลือเป็น 10 ร่วมกับการให้ความร้อนโดยการคั่วที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นอกจากสามารถควบคุมปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์แล้วการให้ความร้อนยังช่วยลดเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องแกงเผ็ดแดง

คำสำคัญ : เครื่องแกงเผ็ดแดง, การปรับปรุงกระบวนการผลิต, ความปลอดภัย

* Corresponding author:

ผศ.ดร. เวณิกา เบญจพงษ์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

Email: nuwbe@mahidol.ac.th

การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการประเมินการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดไทยที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์

อนงค์ บิณฑวิหค,^{1*} สุภาวิน วัชรมูล,² วิสุทธิ นวลชื่น,³ สุพิชญา ตรีบุญเมือง,³ กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ,³ กรณิศ พัฒนชัย,¹ และสังวร อยู่สว่าง³

¹ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ประเทศไทยพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างอะฟลาทอกซินและมักพบปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพดที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาวิธีการประเมินผลการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์ ด้วยวิธี ELISA และ PCR-RFLP จากการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดจำนวน 200 ตัวอย่างจากแหล่งปลูกในไร่และโรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่น 5 จังหวัดคือ ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ นำมาตรวจวิเคราะห์หาสารพิษปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปวิธีอิมมูโนแอสซาย และนำตัวอย่างข้าวโพดที่ตรวจพบและไม่พบอะฟลาทอกซิน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มไม่พบอะฟลาทอกซิน กลุ่มตรวจพบอะฟลาทอกซิน มากกว่าและน้อยกว่า 20 ppb ตามลำดับ นำตัวอย่างข้าวโพดมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีมากพอที่จะทำพีซีอาร์ทั้ง 3 กลุ่ม นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วย 2% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตัดด้วยเอนไซม์ *HincII* และ *PvuII* จากผลการศึกษาพบว่า ข้าวโพดจากแหล่งปลูกในไร่ จำนวนตัวอย่างที่พบอะฟลาทอกซินปี 1 ร้อยละ 40-100 มากกว่าข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อค้าท้องถิ่น ร้อยละ 25-50 แต่มีปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ที่พบในข้าวโพดจากโรงเก็บพ่อค้าท้องถิ่น (12-172 ppb) สูงกว่าข้าวโพดจากแหล่งปลูกในไร่ (2-6 ppb) ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนอะฟลาทอกซินได้ทั้ง 3 กลุ่ม

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน ข้าวโพด เทคนิคพีซีอาร์

Full paper on page 124

* Corresponding author:

รศ. สพ.ญ. ดร. อนงค์ บิณฑวิหค
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
E-mail: anong_vet@yahoo.com

Chromosome Aberration Analysis in the Medical Personnel Who Regularly Exposed to Formaldehyde Vapor

Vongphachanh K¹, Mevatee U², Puaninta C², Pangjaidee N², Kanchai J¹, and Ruangyuttikarn W^{1*}

¹ Division of Toxicology, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

² Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

ABSTRACT

Inevitable long term exposure to embalming solution or formaldehyde vapor of the medical personnel at the Department of Anatomy, Chiang Mai University has been highly concerned whether it could cause genotoxicity. Therefore, chromosome aberration assay was performed using peripheral blood lymphocytes of the 20 staffs from the Department of Anatomy compared to the lymphocytes of 15 staffs from the Department of Family Medicine who did not expose to formaldehyde vapor. All of them work for 8 hours a day, 5 days a week for the range of 1-37 years. Before venipuncture blood was withdrawn, they were interviewed for demographic, health and nutrition information including their alcohol drinking and smoking habits. Isolated lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium and fetal bovine serum with phytohemagglutinin for 48 hours at 37°C before staining with Giemsa solution. A hundred chromosomal metaphases from each blood samples were examined under light microscope and recorded in a specific report form before data analysis. The results show that the exposed group has higher frequency of chromatid and chromosome aberrations than those of the control group significantly ($p < 0.05$). The exposed group manifested an increase in the chromatid gap, chromatid break and chromatid exchange, whereas chromosome gap, acentric and dicentric fragments were frequent chromosome-type aberrations. Only the chromatid break was found in the control group subjects. This finding indicated the importance of a periodic medical checkup of the medical personnel who regularly exposed to formaldehyde vapor.

Keywords: Formaldehyde, chromosome aberration, lymphocytes, medical personnel

* Corresponding author:

Assoc. Prof. Werawan Ruangyuttikarn,
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand,
E-mail: wruangyu@med.cmu.ac.th

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดมของไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำในหนูถีบจักร

สรียา เรืองพัฒน์พงศ์*, ภาควิชา ศิริอาชีวพัฒนา, เตือนตา เสมาทอง, ชุติรัตน์ บรรจงลิขิตกุล
และวัลลภา อรุณไพโรจน์

ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดมของไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ no. 1 และไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ no. 2 โดยดัดแปลงจากวิธีการทดสอบตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 309 - 2525 เตรียมความเข้มข้นของไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำทั้ง 2 ตัวอย่าง ขนาด 1.5 ppm/0.34 m³ (1.5 mg/L) ฉีดพ่นด้วยเครื่อง atomizer ให้หนูถีบจักร จำนวน 10 ตัว ต่อ 1 ตัวอย่าง สูดดมภายในตู้กระจกระบบปิดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตอาการผิดปกติของหนูทดลองที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังสูดดมไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ no. 1 และ no. 2 พบว่า หนูทดลองทั้งหมดใน 2 กลุ่มมีอาการปกติ และมีชีวิตอยู่รอดจนสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำ no. 1 และ no. 2 ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดมที่ขนาด 1.5 mg/l ในหนูถีบจักร

คำสำคัญ: ไบโอดีเซล, น้ำมันสบู่ดำ, ความเป็นพิษเฉียบพลัน, หนูถีบจักร

* Corresponding author:

สรียา เรืองพัฒน์พงศ์

ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

35 หมู่ 3 เทคโนธานี อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

E-mail: noo_toxmu@hotmail.com

ตะกั่วและแคดเมียมในหอยสองฝา จังหวัดสุราษฎร์ธานี

แจลัม ชนะคช และเอกชัย บุญห่อ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี 84100

บทคัดย่อ

ตะกั่ว แคดเมียม เป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษและมีโอกาสปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ สาเหตุจากอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับโลหะประเภทนี้ รวมทั้งการกำจัดของเสียในชุมชนที่ยังไม่มีการบริหารจัดการเพื่อแยกขยะพิษ มีผลให้สัตว์น้ำสะสมสารเหล่านี้ โดยเฉพาะสัตว์ที่หากินตามโคลนตม จ.สุราษฎร์ธานีเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงหอยสองฝา ได้แก่ หอยนางรม หอยแครง และหอยแมลงภู่ และมีการกระจายสินค้าประเภทหอยจำนวนมากไปสู่จังหวัดใกล้เคียง ดังนั้นเพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัย และความเสี่ยงในการบริโภคหอยสองฝาของ จ.สุราษฎร์ธานี ในช่วงเดือนกรกฎาคม - กันยายน ปี 2552 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สุราษฎร์ธานี จึงได้ศึกษาการปนเปื้อนของตะกั่วและแคดเมียมในหอยสองฝา โดยทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรม หอยแมลงภู่ หอยแครง หอยขาว และน้ำจากการลวกหอย จากร้านอาหารและแหล่งขายส่งใน จ.สุราษฎร์ธานี รวมทั้งหมด 48 ตัวอย่าง พบว่าแคดเมียมในหอยแครงมากที่สุด เฉลี่ย 0.97 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาพบในหอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยขาว เฉลี่ย 0.67, 0.16 และ 0.15 มก./กก. ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานแคดเมียมของสำนักงานอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (ไม่เกิน 4.0 มก./กก.) ส่วนสารตะกั่วพบในหอยแครงมากที่สุด เฉลี่ย 0.21 มก./กก. รองลงมาพบในหอยแมลงภู่ หอยขาว หอยนางรม และน้ำจากการลวกหอย เฉลี่ย 0.17, 0.15, 0.09 และ 0.01 มก./กก. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (ไม่เกิน 1.0 มก./กก.) และเมื่อคำนวณเป็นปริมาณของโลหะหนักที่ผู้บริโภคได้รับเข้าสู่ร่างกายโดยการบริโภคอาหารในหนึ่งสัปดาห์ (WDI) พบว่าปริมาณความเข้มข้นของแคดเมียมและตะกั่วในหอย มีโอกาสเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภคอยู่ในช่วง 35.70-230.86 และ 21.42-49.98 ไมโครกรัมต่อคนต่อสัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าสูงสุดที่ได้รับต่อสัปดาห์แล้วไม่ทำให้เกิดอันตราย (PIWI) จะเห็นได้ว่าปริมาณแคดเมียมและตะกั่วที่สะสมในหอยสองฝาจากแหล่งขายของ จ.สุราษฎร์ธานียังอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: ตะกั่ว, แคดเมียม, หอยนางรม, หอยแครง, หอยแมลงภู่, หอยขาว

* Corresponding author:

นางแจลัม ชนะคช

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สุราษฎร์ธานี

ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84100

E-mail: Chalame.c@dmasc.mail.go.th

Establishment of a Cadmium Induced Renal Tubular Damaged Rats Model for Investigating the Effect of *Thunbergia laurifolia* Lindl. Leaves Extract on Cadmium Renal Toxicity

Morkmek N¹, Lertprasertsuke N², and Ruangyuttikarn W^{1*}

¹ Division of Toxicology, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand

² Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

ABSTRACT

Thunbergia laurifolia Lindl. or Rang Jert is a Thai medicinal herb used as an antidote for several poisonous agents. A rats' model of cadmium induced renal tubular damage was established for testifying the effect of Rang Jert leaves extract on cadmium renal toxicity. Male Wistar rats were treated orally once a day for seven days with cadmium chloride solution at the concentrations of 22 (low) and 44 (high) mg/kg BW which are one-fourth and a half doses of the reported LD50, respectively. Rats' urine was collected by the metabolic cages on every other day for cadmium quantification using flame atomic absorption spectrophotometer. Creatinine levels was also measured based on the Jaffe reaction. On the last day of cadmium administration, rats were sacrificed and the kidney was dissected for histopathological examination. The results showed an increasing of cadmium concentrations in the urine of both rats-treated cadmium groups (290.83 and 518.06 µg Cd/g creatinine in low and high cadmium exposure groups, respectively) compared with a non-treated group (33.14 µg Cd/g creatinine). The kidney of rats-treated low level of cadmium showed slightly degenerative tubular cells and casts in the lumen whereas rats treated with high concentrations of cadmium showed slightly tubular cells necrosis with pyknotic nucleus. In order to observe more prominent of renal tubular damage, cadmium concentration and/or cadmium exposure time will be increased before prophylactic and antagonistic effects experiments with Rang Jert leaves extract. The results from Rang Jert study will be used to increase renal clearance of cadmium for those with high cadmium exposure.

Keywords: Cadmium, rat, histology, kidney, *Thunbergia laurifolia* Lindl.

* Corresponding author:

Assoc. Prof. Werawan Ruangyuttikarn,
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand,
E-mail: wruangyu@mail.med.cmu.ac.th

Comparative In Vitro Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Different Assays and Cell Types

Kulthong K. and Maniratanachote R.

National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency, Thailand

ABSTRACT

Silver nanoparticles have been used in numerous commercial products including clothes, personal care products and wound dressings to protect from bacteria. Meanwhile there is increasing concern in that exposure to these nanoparticles may cause a potential adverse effect to human. Several investigations in cultured cells demonstrated different results. There is no standard method to determine cytotoxicity of these nanoparticles so far. The most frequently used method is MTT assay since this technique has been recommended by ISO standard method. In this study, the MTT assay was compared with others such as MTS and crystal violet assays to determine cytotoxicity of silver nanoparticles in L929 cells. In addition, cytotoxicity of silver nanoparticles by using MTT assay in different cell types such as A549 and A431 cells were also determined. Silver nanoparticles were suspended in the solution media by using a non-toxic concentration of Tween-80. Each assay was performed in the same conditions. The results showed that among these three assays, MTS was the most sensitive assay followed by MTT and crystal violet. Using MTT assay, there was small variation in cytotoxicity of silver nanoparticles among L929, A549 and A431 cells. Therefore, to address cytotoxic effects of these nanoparticles, several assays in certain cell types were necessary.

Keywords: Silver nanoparticles, cytotoxicity, MTT assay

* Corresponding author:

Dr. R. Maniratanachote

National Nanotechnology Center,

National Science and Technology Development Agency,

Thailand Science Park, Pathum Thani 12120

E-mail: rawiwan@nanotec.or.th

DNA Extraction from Buccal Cells for Determination of Nucleotide Polymorphism at rs 1800497 Position in Dopamine D2 Receptor Gene

Pitsinee Inthi¹, Manit Srisuraphanont², Surinporn Likhitsatien², Lertlakana Bhoopat³, and Tanin Bhoopat^{1*}

¹ Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

² Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

³ Department of Pathology Faculty of Medicine, Chiang Mai University

ABSTRACT

Substance use disorder is influenced by complex genetic and environmental factors. Many studies found that genetics may play an important role in the development of alcohol dependence. Twin and family history studies revealed that genetics affect a heritability of alcoholism approximately 50-60%. The neurotransmitter in brain especially dopamine may associate with rewarding system that might increase risk in alcohol dependence. The dopamine D2 receptor gene (*DRD2*) allelic status may influence on development of alcohol dependence due to the change in number of receptor. This study aimed to demonstrate that buccal cells could be used as an alternative source of DNA for PCR-RFLP based method to determine the allelic status of *DRD2*. The DNA samples were extracted from buccal cells using proteinase K and 5% chelex solution, then amplified by PCR method with some modification of the primer sequence. The optimization for annealing temperature was performed. Our PCR system using an annealing temperature at 56 °C yielded the most specific amplified DNA of approximately 200 ng/μl. The PCR product was digested with TaqI restriction enzyme at 65 °C overnight. The digested product was separated in 8.5% polyacrylamide gel electrophoresis for genotyping.

Keywords: Alcohol dependence, PCR-RFLP, *DRD2*, buccal cells.

Full paper on page 119

* Corresponding author:
Professor Dr. Tanin Bhoopat
Department of Forensic medicine,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand 50200
E-mail: tbhoopat@mailmed.cmu.ac.th

Development of Spectrophotometric Assay for D-Penicillamine Using Solid Phase-Mediated Ninhydrin Reaction

Saehuan C¹ and Rojanarata T²

¹ Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok,.

² Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom.

ABSTRACT

A spectrophotometric assay has been developed for measuring D-penicillamine used for the treatment of metal-poisoning and rheumatoid arthritis in capsule formulation. The method based on the initial binding of D-penicillamine via disulfide bond onto the Thiopropyl Sepharose 6B resin and the subsequent ninhydrin reaction with amine group of drug. This reaction produced a purple color in the supernatant which was measured at 570 nm. It was found that binding step of drug onto the resin greatly enhanced the method sensitivity so that the D-penicillamine of less than 100 µg/ml could be assayed by this method whereas a direct ninhydrin reaction with D-penicillamine solution failed to quantitate the drug at such low concentrations. For the assay of drug in the range of 25 - 125 µg/ml, the optimal drug-resin binding was achieved by shaking 1 ml drug solution with 20 mg resin at pH 7 for 30 min. After supernatant was removed, 200 µl of 1% w/v ninhydrin was added to the resin to form the color with the aid of 5-min heating and the obtained color supernatant was kept on ice to stabilize the color prior to spectrophotometry. After optimization, the calibration curve showed a satisfactory second-order polynomial relationship with r^2 of 0.9893. In addition, this assay was not interfered by penicillamine disulfide, which is a major impurity frequently found with the drug. Hence, this method was of great practical value for further validation and possibly used as an alternative assay for D-penicillamine and other aminothiols compounds in pharmaceutical laboratory.

Keywords: Spectrophotometric assay, D-penicillamine, solid phase, ninhydrin reaction

* Corresponding author:
Dr. Choedchai Saehuan,
Department of Medical Technology,
Faculty of Allied Health Sciences,
Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.
E-mail: choedcgau1@yahoo.com

โครงการต้นแบบการจัดการความเสี่ยงสารเคมีอันตราย: กรณีสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสี ในโรงงานขนาดกลางและขนาดเล็กในจังหวัดนนทบุรี และปทุมธานี

ขวัญยืน ศรีเปารยะ^{1*}, ธงชัย ศรีนพคุณ², ชชาติ เจียมไชยศรี², สุวินิตย์ ทองหนู¹, เตือนใจ นุชเทียน¹, ผ่องพรรณ หมอกมิด¹, จีรภา ศิลาเกษ¹, ยพพา จันทรคำทรัพย์¹, สุธา วิเชียรเพชร³, เสรี อติภัทระ⁴, สพร สารอรุณ⁴, สมจินต์ พิลิก⁵, นุปผา กวินวสิน⁵, ประนอม แสงแก้ว⁶, ภาณุละ อาวัชนากร⁶, สขาวดี โลกะกะลิน⁶, เฮเลน อารมย์ดี⁴, และ สมมล ปวีตรานนท์¹

¹ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ² มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ³ กรมควบคุมมลพิษ ⁴ กรมโรงงานอุตสาหกรรม

⁵ การนิคมอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย ⁶ กรมป้องกันและบรรเทาสาธารณภัย

บทคัดย่อ

โครงการต้นแบบการจัดการความเสี่ยงจากการแพร่กระจายสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม จากโรงงานผลิตและผสมสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและผลิตภัณฑ์ในจังหวัดนนทบุรีและปทุมธานี เป็นกรณีศึกษาของสารเคมีรั่วไหลหรืออุบัติเหตุ โดยใช้การจำลองด้วยคอมพิวเตอร์ และพัฒนาระบบอินเตอร์เฟซที่สามารถนำมาใช้สร้างมาตรการจัดการเมื่อเกิดเหตุฉุกเฉิน โดยได้จัดทำฐานข้อมูลพร้อมใช้ดำเนินการประกอบด้วยกฎหมายที่เกี่ยวข้องและผู้เกี่ยวข้องทั้งหมด ข้อมูลรายชื่อโรงงาน กระบวนการผลิตหลัก ข้อมูลชนิดสารและข้อมูล MSDS ของสารในกระบวนการผลิตของแต่ละโรงงาน พิกัดตำแหน่งที่ตั้งโรงงาน ข้อมูลเกณฑ์ความปลอดภัยจากการได้รับสัมผัสสารของคน ข้อมูลสัมภาษณ์เชิงลึกเกี่ยวกับการจัดการเหตุฉุกเฉินจากสารเคมีของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในเขตพื้นที่ และใช้โปรแกรมสร้างแบบจำลองการแพร่กระจายของสารเคมีในอากาศ และในน้ำ แล้วนำไปทำอินเตอร์เฟซและเขียนโปรแกรมด้วยภาษา XML ผลการศึกษา คือได้ฐานข้อมูลพร้อมใช้ที่ผนวกกับโปรแกรมทำเป็นโมเดลระบบฐานข้อมูลต้นแบบ ซึ่งได้เผยแพร่และทำงานบน web และยังได้ข้อมูลสรุปการสัมภาษณ์เชิงลึกเกี่ยวกับการจัดการเหตุฉุกเฉินจากสารเคมีของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในเขตพื้นที่ เพื่อใช้ประกอบการจัดทำแผนพัฒนานุเคราะห์ของกรมป้องกันและบรรเทาสาธารณภัย

คำสำคัญ : แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ อุบัติภัยสารเคมีรั่วไหล โรงงานผลิตสารกำจัดศัตรูพืช โรงงานผลิตสี จังหวัดนนทบุรี จังหวัดปทุมธานี

* Corresponding author:

คุณขวัญยืน ศรีเปารยะ

ฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

E-mail: kwanyuen@yahoo.com

การศึกษาความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ของเกษตรกร จังหวัดปทุมธานี

ขวัญยืน ศรีเปารยะ¹, อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์², ผ่องพรรณ หมอกมิด¹, จีรภา ศิลาเกษ¹,
ลักขณา ลือประเสริฐ³, และสมล ปิตรานนท์³

¹ ฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

² ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

³ สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ใช้วิธีการตรวจสอบบ่งชี้ชีวภาพจากเกษตรกรเพื่อเป็นเครื่องมือประเมินสุขภาพเบื้องต้นของกลุ่มเกษตรกรสวนผักที่สัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ต.บางเค็ด อ.เมือง จ.ปทุมธานี เปรียบเทียบกับกลุ่มเกษตรกรที่ไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในจังหวัดเดียวกัน จำนวน 92 คน พบระดับเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในเลือดเกษตรกรกลุ่มที่ใช้สาร (6,423±656 IU/ml) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้ (6,570 ± 509 IU/ml) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.23$) และค่าเฉลี่ยความถี่การเกิดไมโครนิวเคลียสระหว่างกลุ่มเกษตรกรที่ใช้สาร (6.13 ± 9.19 ไมโครนิวเคลียสต่อ 1,000 binucleated cells) ไม่แตกต่างจากกลุ่มเกษตรกรที่ไม่ใช้สาร (4.82 ± 4.60 ไมโครนิวเคลียสต่อ 1,000 binucleated cells) ส่วนระดับโคลีนเอสเตอเรสในซีรัมในกลุ่มเกษตรกรใช้สารและไม่ใช้สารมีค่าเฉลี่ย 2,924 ± 593 mU/ml และ 3,215 ± 638 mU/ml ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.026$) และพบว่าปริมาณการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่เกษตรกรใช้อ้อยู่ในช่วง 0.015-0.543 มิลลิกรัมต่อคนต่อปี ดังนั้นการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการตรวจวัดการเกิดผลกระทบจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชก่อนเกิดอาการทางคลินิกนั้นเป็นสัญญาณเตือนภัยให้เกษตรกรไทยได้ตระหนักถึงความสำคัญของสุขภาพไปพร้อมกับรายได้จากการประกอบอาชีพ

คำสำคัญ : สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เกษตรกร จังหวัดปทุมธานี

* Corresponding author:

คุณผ่องพรรณ หมอกมิด

ฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

E-mail: pmokmued@hotmail.com

การประเมินสุขภาพการผลิตรายน้ำตาลมะพร้าวระดับชุมชน ในจังหวัดสมุทรสงคราม

จันทร์ฉาย ประกอบศิลป์, เวณิกา เบ็ญจพงษ์*, นริศรา ม่วงศรีจันทร์, และวีรยา การพานิช

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

น้ำตาลมะพร้าวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำตาลโตนดที่ปาดจากงวงมะพร้าวไปเคี่ยว ส่วนใหญ่เป็นการผลิตระดับชุมชนที่มีขนาดเล็ก อาศัยความชำนาญ หรือภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมา แต่กระบวนการผลิตในปัจจุบันเริ่มมีการเปลี่ยนรูปแบบจากเดิม ซึ่งบางขั้นตอนหากไม่มีการควบคุมตามหลักสุขภาพการผลิอาหารอาจก่อการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์ เพื่อควบคุมการผลิตให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าวที่ปลอดภัยต่อการบริโภค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการประเมินข้อบกพร่องของกระบวนการผลิตน้ำตาลมะพร้าวระดับชุมชน เพื่อเป็นข้อมูลในการควบคุมและปรับปรุงการผลิตน้ำตาลมะพร้าวให้มีความปลอดภัย โดยทำการศึกษากิจการผลิตรายน้ำตาลมะพร้าวทั้งกระบวนการ ตั้งแต่การเตรียมน้ำตาลโตนดไปจนถึงการเคี่ยวและขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว ในแหล่งผลิตรายน้ำตาลมะพร้าว 30 รายใน 3 อำเภอของจังหวัดสมุทรสงคราม ผลการศึกษาพบว่า มีหลายขั้นตอนในกระบวนการผลิตที่ไม่ถูกต้องตามหลักสุขภาพการผลิในเรื่องต่างๆ ดังนี้ 1) สุขลักษณะของสถานที่ผลิต โดยพบว่าที่ตั้งและสภาพแวดล้อมของอาคารผลิอยู่ใกล้ที่พักอาศัย หรือสถานที่เลี้ยงสัตว์ ไม่มีฝาผนังกันป้องกันฝุ่นละออง 2) อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต พบการเลือกใช้วัสดุที่ไม่เหมาะสม เช่น บรรจุน้ำหรือภาชนะรองรับน้ำตาลทำจากพลาสติกที่ไม่ทนความร้อน อุปกรณ์ที่พื้นผิวต้องสัมผัสอาหารทำจากวัสดุซึ่งทำความสะอาดยาก เครื่องจักรที่ใช้ในการปั่นน้ำตาลมีการออกแบบไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิ การบำรุงรักษา ทำความสะอาด และจัดเก็บอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิไม่ถูกต้องหลักสุขภาพการผลิ มีการจัดเก็บอุปกรณ์ที่ทำความสะอาดแล้วปะปนกับอุปกรณ์ที่ยังไม่ได้ทำความสะอาด 3) สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่เหมาะสม ผู้ผลิส่วนใหญ่นิยมใช้มือเปล่าในการสัมผัสน้ำตาลในขั้นตอนที่น้ำตาลผ่านความร้อนแล้วโดยไม่ทำความสะอาด 4) การเก็บรักษาสารผลิตภัณฑ์ระหว่างรอจำหน่ายไม่เหมาะสม เช่น ไม่ปกปิดมิดชิด การวางผลิตภัณฑ์บนพื้น ซึ่งข้อบกพร่องดังกล่าวจำเป็นต้องได้รับการแก้ไขปรับปรุงให้เป็นไปตามสุขภาพการผลิที่ดี จึงจะก่อให้เกิดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำตาลมะพร้าว

คำสำคัญ: สุขภาพการผลิ, น้ำตาลมะพร้าว, จังหวัดสมุทรสงคราม

Full paper on page 136

* Corresponding author:

ผศ.ดร. เวณิกา เบ็ญจพงษ์

สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม 73170

Email: nuwbe@mahidol.ac.th

Development of a Guideline for Alcohol Analysis in Forensic Specimens by Gas Chromatography- Headspace in Thailand

Ampika Leelapojanaporn^{1*}, Werawan Ruangyuttikarn², Kamon Foihirun³, Uthane Thongtang¹, Witchuda Wichayanareaphon¹, Pranida Kigpituck¹, Janthana Raruenrom¹, and Prapaijit Kaikaew¹

¹ Toxicology and Chemistry Division, Central Institute of Forensic Science (CIFS), Bangkok, Thailand

² Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

³ Regional Medical Sciences Center, Chon Buri, Chon Buri, Thailand

ABSTRACT

The first goal of The Forensic Toxicology Network of Thailand (FTNT) is to develop an internationally acceptable standard of practice. The aim of this study was to develop the national guideline for alcohol analysis in forensic specimens by GC-HS in Thailand. A questionnaire was firstly drafted and sent to 17 toxicology laboratories prior to modification of the original guideline or SOP of alcohol analysis of the Regional Medical Sciences Center, Chon Buri, Thailand. Information from international toxicology laboratories was reviewed and compared to the data obtained from Thai laboratories. In March 2009, all data were presented and discussed between attending FTNT members and TIAFT's executive committee in order to reach an unanimous conclusion. This is the first guideline of FTNT. Details of the guideline were written in Thai and distributed to all members of FTNT.

Keywords: Guideline, alcohol analysis, gas chromatography

* Corresponding author:

Pol. Lt. Col. Ampika Leelapojanaporn
Toxicology and Chemistry Division,
Central Institute of Forensic Science,
Bangkok, Thailand
E-mail: ampikalee@moj.go.th