

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยเทคนิค

Competitive Lateral Flow Immunoassay

Development of Aflatoxin B1 Determination Method

by Competitive Lateral Flow Immunoassay

เนตรา สมบูรณ์แก้ว^{1/*} ศุภรา อัคระสาระกุล^{1/} สุพี วนศิริกุล^{1/} ขวเลิศ ตีร์กรณาสวัสดิ์^{1/}

Nettra Somboonkaew^{1/*} Suppara Aukkasarakul^{1/} Suphi Wanasirakul^{1/}

Chawalert Trikarunasawat^{1/}

Received 19 May 2023/Revised 21 Jun. 2023/Accepted 29 Jun. 2023

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a prototype test kit using competitive lateral flow immunoassay technique for the visual qualitative assessment of aflatoxin B1 (AFB1) contamination in agricultural produces. We found that the prototype test kit had the limit of detection (LOD) and cut off values for buffer solution of 0.5 and 5.0 ng/ml, respectively. Whilst for peanut extract, the kit had the LOD and cut off values at 1.0 and 8.0 ng/ml, respectively. The accuracy and precision of the test results of prototype assays in peanut extract were within the acceptable range. Result of AFB1 contamination assessment using the prototype test kit was consistent with the HPLC analysis. The percentage accuracy of the test kit was 93.33%. Overall, the test results showed that the prototype test kit was rapid, accurate and reliable. The kit could be used in the initial assessment or monitoring of AFB1 contamination. After demonstrating the prototype test kit to the Plant Quarantine officials, we received the feedback opinion that the kit was convenient to use, the extraction method was simple, gave quick results which were easy to assess and the cost was economical.

Keywords: assessment, contamination, mycotoxin, strip test kit

^{1/}กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/}Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author: nettra.doa@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซิน บี1 ด้วยเทคนิค competitive lateral flow immunoassay (CLFIA) สำหรับตรวจประเมินการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 (Aflatoxin B1; AFB1) ด้วยการแปลผลเชิงคุณภาพด้วยสายตาจากการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบนี้พบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบมีประสิทธิภาพในการตรวจจับสาร AFB1 ในตัวอย่างสารละลายยับเพอร์และสารสกัดถั่วลิสง (limit of detection: LOD) 0.5 และ 1.0 นาโนกรัม/มล. และค่า cut off 5.0 และ 8.0 นาโนกรัม/มล. ตามลำดับ ผลการทดสอบค่าความถูกต้องและแม่นยำของชุดตรวจสอบต้นแบบในการตรวจจับสารแอฟลาทอกซิน บี 1 ในสารสกัดถั่วลิสงมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลการประเมินการปนเปื้อน AFB1 โดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ผลิตมีความสอดคล้องกับผลวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ได้ค่าร้อยละความถูกต้องของชุดตรวจสอบ 93.33 ดังนั้น จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าชุดตรวจสอบสาร AFB1 ด้วยวิธี CLFIA ที่พัฒนา มีความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจประเมินเบื้องต้นหรือเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสาร AFB1 ได้ และเมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปสาธิตให้แก่เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชทดสอบใช้ ได้รับข้อคิดเห็นว่าเป็นชุดตรวจสอบที่ใช้สะดวก ให้ผลรวดเร็ว ขั้นตอนการสกัดสารและวิธีการตรวจไม่ซับซ้อน และค่าใช้จ่ายไม่สูง

คำสำคัญ: การปนเปื้อน, การประเมิน, ชุดตรวจสอบแบบตลับ, สารแอฟลาทอกซิน บี1

บทนำ

แอฟลาทอกซิน (aflatoxins) เป็นสารทุติยภูมิ (toxic secondary metabolites) สร้างขึ้นโดยเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ที่สร้างสารพิษได้ เช่น *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* เป็นต้น เชื้อราเหล่านี้มักพบปนเปื้อนผลผลิตการเกษตรตั้งแต่ในแปลงปลูก ระหว่างการเก็บเกี่ยวจนถึงการเก็บรักษาผลผลิต และเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเชื้อราจะสร้างสารแอฟลาทอกซิน ซึ่งตามธรรมชาติมี 4 ชนิด คือ แอฟลาทอกซิน บี1 (AFB1) แอฟลาทอกซิน บี2 (AFB2) แอฟลาทอกซิน จี1 (AFG1) และแอฟลาทอกซิน จี2 (AFG2) โดย *A. flavus* เป็นเชื้อราที่สร้างสาร AFB1 เป็นหลัก มีสัดส่วนที่พบมากกว่าสารแอฟลาทอกซินชนิดอื่น ๆ (Ingenbleek et al., 2019) และมีความเป็นพิษรุนแรงมากกว่าแอฟลาทอกซินชนิดอื่น ๆ ซึ่ง International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้สารแอฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ Group I เนื่องจาก ทำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ การพัฒนาอวัยวะของทารกเกิดความผิดปกติ ระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ และก่อให้เกิดมะเร็งตับเป็นต้น (IARC, 2012) ทำให้หลายประเทศกำหนดปริมาณสารแอฟลาทอกซินสูงสุดที่อนุญาตให้พบได้ในอาหาร (maximum levels: ML) ซึ่งอาจมีค่าที่แตกต่างกัน เช่น คณะกรรมาธิการยุโรปได้ระบุค่า ML ของ AFB1 สำหรับถั่วลิสง ไม่เกิน 8 ไมโครกรัม/กก. และแอฟลาทอกซินรวม ไม่เกิน 15 ไมโครกรัม/กก. (European Commission, 2010) ส่วนประเทศที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น ซึ่งเหมาะแก่การเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษพบปัญหาการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินสูง จึงมีการกำหนดค่า ML ของสารแอฟลาทอกซินสูงกว่า Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (1995) ได้กำหนดให้มีแอฟลาทอกซิน

ปนเปื้อนในธัญพืชรวมถึงถั่วลิสงไม่เกิน 15 ไมโครกรัม/กก. สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2563 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 414 พ.ศ. 2563 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน อนุญาตให้มีสารแอฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารรวมถึงถั่วลิสงได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัม/กก. (กระทรวงสาธารณสุข, 2563)

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษในสินค้าเกษตรมีทั้งวิธีการอ้างอิงหรือการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล (reference or confirmatory methods) เช่น วิธี thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) และ liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS) เป็นต้น (Wolf and Schweigert, 2018) ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถระบุและคำนวณปริมาณสารพิษที่พบในเชิงปริมาณได้ เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับสำหรับออกใบรับรองในการนำเข้าหรือส่งออก แต่มีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ ใช้เครื่องมือเฉพาะ และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์สูงเพื่อลดปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) เพื่อใช้สำหรับการตรวจคัดกรองอย่างรวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ เช่น วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ซับซ้อน สามารถตรวจวิเคราะห์หลายตัวอย่างพร้อมกันได้ ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ ใช้เวลาในการวิเคราะห์และค่าใช้จ่ายน้อยกว่า (Moon *et al.*, 2012) ซึ่งวิธีการตรวจคัดกรองเหล่านี้เหมาะสมอย่างมากสำหรับการคัดเลือกวัตถุดิบก่อนที่จะนำไปแปรรูปเป็นอาหารและอาหารสัตว์

ปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจสอบสาร AFB1 แบบ competitive lateral flow immunoassay (CLFIA) ซึ่งเป็นรูปแบบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้แผ่นกระดาษ nitrocellulose membrane (NCM) เป็นตัวรองรับปฏิกิริยา วิธีการนี้สามารถอ่านผลเชิงคุณภาพได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธี ELISA โดยใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที เท่านั้น สำหรับในประเทศไทย มีการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูง จึงมีการพัฒนาชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซินชนิด CLFIA ขึ้นเองภายในประเทศ ในช่วงต้นทศวรรษ 2540 โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้พัฒนาชุดตรวจสอบชนิด CLFIA ซึ่งมีความไวในการตรวจหาสารแอฟลาทอกซินที่ระดับ 40 ไมโครกรัม/กก. อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าภายใน 20 นาที (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, ม.ป.ป.) และต่อมา Khapanya *et al.* (2017) รายงานผลการพัฒนาชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซินชนิด B1 B2 G1 และ G2 แบบ CLFIA โดยใช้ monoclonal antibody clone 4G6 พบว่า ชุดตรวจสอบให้ผลตรงกับการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยมีค่า cut off ที่ 20 ไมโครกรัม/กก. อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันไม่พบการให้บริการหรือวางจำหน่ายชุดตรวจสอบที่ผลิตในประเทศ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบชนิด CLFIA โดยใช้ polyclonal antibody ที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตร เพื่อทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศและหน่วยงานต่าง ๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดกรองผลิตผลเกษตรในเบื้องต้น เพื่อลดการปนเปื้อนสาร AFB1 ก่อนนำเข้ามายังประเทศไทยหรือก่อนนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารและอาหารสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

การเตรียมสารละลายสำหรับประกอบชุดตรวจสอบ เริ่มจากติดฉลากสารละลายอนุภาคทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตรกับแอนติบอดีต่อสารแอฟลาทอกซิน บี1 (IgG-AFB1) โดยนำ IgG-AFB1 ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 80-100 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายอนุภาคทองที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 8.2-8.5 ปริมาตร 10 มล. ผสมสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะเติมสารละลาย 10% bovine serum albumin (BSA) จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ. เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย gold diluted buffer (20mM borate buffer + 0.25% Tween20 + 1%BSA + 0.05%sodium azide +10%Sucrose) ปริมาตร 1.0-1.5 มล. ดำเนินการตามขั้นตอนของ อมรา และคณะ (2557) โดยปรับวิธีการบางส่วนให้เหมาะสม

นำสารละลาย IgG-AFB1-colloidal gold conjugate ที่เข้มข้นเหมาะสมมาบน conjugate released pad (CRP) ที่มีขนาดกว้าง 0.7 ซม. เพื่อทดสอบหาปริมาณ IgG-AFB1-colloidal gold conjugate ต่อระยะการระบาย ระหว่าง 6-10 ไมโครลิตร/ชม. และนำไปลดความชื้นที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 2 ชม. ทดสอบขีดเส้น control line (C) ด้วยการตรึง goat anti rabbit IgG (GAR, Sigma-Aldrich, Israel) และเส้น test line (T) ด้วยการตรึง AFB1-BSA บนแผ่น NCM 3 ชนิด ได้แก่ AE99 Immunopore RP และ FF120HP ขนาดกว้าง 2.5 ซม. ที่ติดลงบนแผ่นรอง (backing card) โดยใช้ดินสอทำเครื่องหมายเส้น C และเส้น T ห่างกัน 0.5 ซม. นำปากกาหมึกซึมขนาดหัวปากกา 0.7 มม. จุ่ม GAR ความเข้มข้น 0.25-1.25 มก./มล. ขีดตรงตำแหน่งเส้น C และใช้ปากกาอีกด้ามจุ่ม AFB1-BSA ความเข้มข้น 0.25-1.25 มก./มล. ขีดตรงตำแหน่งเส้น T แต่ละเส้นใช้อัตรา

สารละลาย 1 ไมโครลิตร/ชม. จากนั้น นำแต่ละแผ่นที่เตรียมไว้ประกอบกัน และตัดให้เป็นแถบทดสอบกว้าง 4 มม. นำแต่ละแถบทดสอบประกอบเข้ากับตลับพลาสติก เก็บในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์พร้อมถุงสารกันความชื้น และเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ. จนกว่าจะนำมาทดสอบขั้นต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดตัวอย่างและวิธีการทดสอบสารสกัด

นำตัวอย่างเมล็ดถั่วลิสงดิบ จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีสาร AFB1 และ 30 ตัวอย่างที่ทราบปริมาณการปนเปื้อนของสาร AFB1 มาบดให้ละเอียด ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างละ 10 ก. เติมน้ำหรือน้ำเกลือหรือเอทานอล ที่ความเข้มข้น 50-70% โดยปริมาตร ปริมาตร 20 มล. ปั่นด้วยเครื่อง vortex นาน 3 นาที หรือเขย่าด้วยมือนาน 3 นาที เทส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ชนิดเซลลูโลส ขนาดรูพรุน 20-25 ไมโครเมตร ความหนา 205 ไมโครเมตร และนำสารสกัดแต่ละตัวอย่างปริมาตร 80 ไมโครลิตร หยดลงในช่องหยดตัวอย่าง หลังจาก 10-15 นาที จึงอ่านผลทดสอบโดยประเมินผลด้วยสายตา หากชุดตรวจสอบปรากฏแถบสีบริเวณเส้น C แต่ไม่ปรากฏสีที่เส้น T แสดงว่า ตัวอย่างนั้นมีสาร AFB1 ในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับค่า cut off ของชุดตรวจสอบ รายงานเป็นผลบวก (positive result) แต่ถ้าชุดตรวจสอบปรากฏสีทั้งเส้น C และ T แสดงว่า ตัวอย่างทดสอบไม่มีสาร AFB1 หรือมีในปริมาณน้อยกว่าค่า cut off ของชุดตรวจสอบ รายงานเป็นผลลบ (negative result) แสดงใน Figure 1 และทดสอบเพื่อหาชนิดและปริมาณของสารละลายบัฟเฟอร์ (diluent buffer) เพื่อใช้เจือจางสารพิษมาตรฐานหรือตัวอย่างสารสกัดก่อนหยดลงชุดตรวจสอบ 4 ชนิด ได้แก่ phosphate buffer saline (PBS), PBS + Tween20, polyethylene glycol (PEG) และ PBS + 2% Triton® X-100 Surfactant (TX)

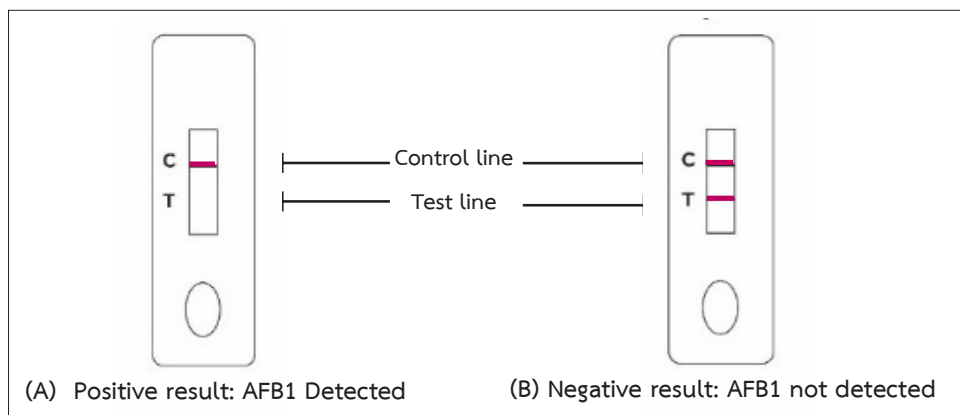


Figure 1 (A) Positive and (B) Negative results of qualitative competitive lateral flow immunoassay

3. การทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ

3.1 การทดสอบค่าต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจได้ (limit of detection, LOD)

ค่า LOD ของสาร AFB1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ (diluent buffer) ทดสอบโดยเติมสารพิษมาตรฐาน AFB1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS + 1% TX + 25% Methanol สารพิษมาตรฐานมีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ระหว่าง 0.0-100.0 นาโนกรัม/มล. หยดสารแต่ละความเข้มข้นลงในชุดตรวจสอบและแปลผลด้วยสายตา ประเมินค่าต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถแสดงผลได้ โดยอ่านผลจากระดับความเข้มข้นของสาร AFB1 ที่ทำให้เส้น T มีสีจางลงเมื่อเปรียบเทียบกับเส้น T ที่ AFB1 เข้มข้น 0.0 นาโนกรัม/มล. จากนั้น นำชุดตรวจสอบต้นแบบมาวัดความเข้มสีเส้น T ด้วยเครื่อง RapidScan development starter kit (Pacific Image Electronics, Taiwan) และแปลผลจากค่าสีระบบ RGB เป็นค่าความเข้มสี (color intensity) ด้วยโปรแกรม Rapid test view pro

ค่า LOD ของสาร AFB1 ในสารสกัดถั่วลิสงทดสอบโดยใช้สารสกัดถั่วลิสงที่ไม่มีการปนเปื้อน

ของสาร AFB1 เป็นสารละลายแทนสารละลายบัฟเฟอร์และเติมสารพิษมาตรฐาน AFB1 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0-20.0 นาโนกรัม/มล. หยดสารแต่ละความเข้มข้นลงในชุดตรวจสอบและแปลผลด้วยสายตา ประเมินค่าต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถแสดงผลได้ โดยอ่านผลจากระดับความเข้มข้นของสาร AFB1 ที่ทำให้เส้น T มีสีจางลงเมื่อเปรียบเทียบกับเส้น T ที่ AFB1 เข้มข้น 0.0 นาโนกรัม/มล.

3.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจสอบ (method validation)

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบสาร AFB1 กับวิธี HPLC นำตัวอย่างถั่วลิสงดิบจำนวน 15 ตัวอย่าง จากตลาดสด ซุปเปอร์มาร์เก็ต เกษตรกร และร้านค้าออนไลน์มาตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ รวม 60 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบผลกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และคำนวณหาร้อยละความถูกต้องของชุดตรวจสอบตามสมการด้านล่าง (มาศวลัย และคณะ, 2556)

$$\text{ร้อยละความถูกต้องของชุดตรวจสอบ} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ชุดตรวจสอบให้ผลตรงกับวิธีมาตรฐาน} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด}}$$

3.3 การนำชุดตรวจสอบไปทดลองใช้ในภาคสนาม

นำชุดตรวจสอบต้นแบบประเมินการปนเปื้อนสาร AFB1 ในตัวอย่างถั่วลิสงที่สุ่มตรวจจากด่านตรวจพืช จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่นำเข้าจากต่างประเทศผ่านด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร โดยทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และสถิติวิธีการสกัดตัวอย่างและการใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบให้แก่เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทดลองใช้งาน เพื่อรับฟังข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะจากผู้ทดลองใช้งานจริง

4. การคำนวณต้นทุนการผลิตชุดตรวจสอบ

คำนวณต้นทุนการผลิตชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้น โดยคำนวณเฉพาะจากค่าวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ไม่รวมค่าใช้จ่ายอื่น ๆ คำนวณจากการผลิตชุดตรวจสอบจำนวน 700 ชิ้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของสารละลาย IgG-AFB1-colloidal gold conjugate ที่เหมาะสมสำหรับระบายบนแผ่น CRP พบว่า การละลายตะกอนของด้วย gold diluted buffer ปริมาตร 1.5 มล. จะได้สารละลาย IgG-AFB1-colloidal gold conjugate ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ไม่ทำให้มีสารส่วนเกินไปกระทบต่อการปรากฏของเส้น C และเส้น T ขณะที่อัตราที่เหมาะสมสำหรับการระบาย IgG-AFB1-colloidal gold conjugate บนแผ่น CRP คือ 6 ไมโครลิตร/1 ซม. ซึ่งเป็นอัตราต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับ AFB1-BSA และ GAR

การทดสอบชนิดของ NCM ที่เหมาะสมในการผลิตชุดตรวจสอบ โดยพิจารณาจากอัตราการไหลของสารละลายบน NCM ที่ทำให้เกิด

เส้น C พบว่า เวลาที่ทำให้เกิดเส้น C บน NCM ชนิด AE99 FF120HP และ Immunopore RP เท่ากับ 3.38 3.30 และ 3.36 นาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน และยังให้สีเส้น C และ T โกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาราคาและปริมาณสินค้าในท้องตลาด พบว่า NCM ชนิด AE99 มีปริมาณการจำหน่ายมากในท้องตลาด และมีราคาต่ำกว่า จึงเลือก AE99 สำหรับพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

การทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย GAR และ AFB1-BSA ที่ใช้จริงที่เส้น C และเส้น T โดยให้ผลชัดเจน และทำให้ได้ค่า LOD และค่า cut off ที่ชัดเจน พบว่า ควรใช้สารละลาย GAR และ AFB1-BSA ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 และ 0.40 มก./มล. ตามลำดับในอัตรา 1 ไมโครลิตร/ซม. และเมื่อทดสอบชุดตรวจสอบด้วยสารพิษมาตรฐาน AFB1 เข้มข้น 0.0 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 นาโนกรัม/มล. ที่เจือจางด้วย PBS + 1%TX + 25% Methanol พบว่า ความเข้มข้น 0.0 นาโนกรัม/มล. ทำให้เส้น T มีสีชัดเจนระดับเดียวกับเส้น C สีของเส้น T จางลงเมื่อความเข้มข้นของสารพิษเพิ่มขึ้น และไม่ปรากฏสีเมื่อสารพิษมาตรฐาน AFB1 เข้มข้น 5.0 นาโนกรัม/มล. (Figure 2)

2. การสกัดตัวอย่างจากผลิตผลเกษตร

การสกัดตัวอย่างถั่วลิสงดิบบดละเอียด ปริมาณ 10 ก. ด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 50-65% เปรียบเทียบกับสารละลายเมทานอลเข้มข้น 50-70% โดยปริมาตร พบว่า สารสกัดจากเอทานอลเคลื่อนที่บนแถบทดสอบเร็วกว่าสารสกัดจากเมทานอลเล็กน้อย แต่ตัวอย่างสารสกัดที่ปนเปื้อนสาร AFB1 ที่สกัดจากเมทานอลทำให้เส้น T มีสีจางกว่า แสดงถึงปริมาณของ AFB1 ที่ถูกสกัดออกมาสูงกว่า เมทานอลจึงมีประสิทธิภาพในการสกัดสาร AFB1 ได้มากกว่าเอทานอล รวมทั้ง

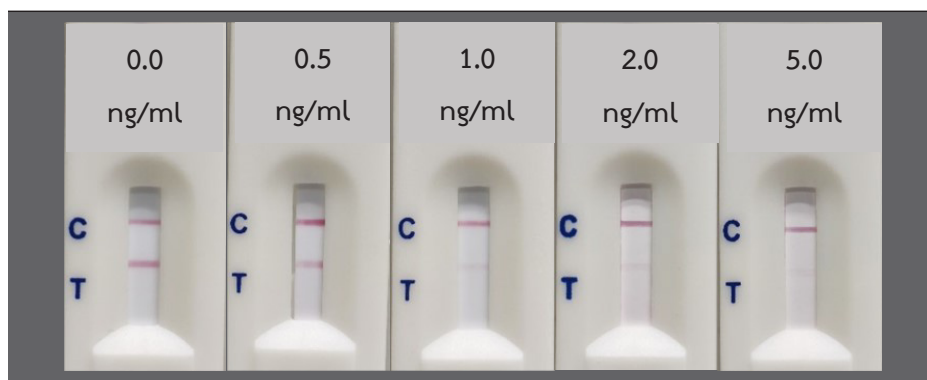


Figure 2 The prototype test kits with control (C) and test (T) lines fixed with GAR 0.25 mg/ml and AFB1-BSA 0.40 mg/ml after testing with AFB1 standard solutions at the concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 ng/ml diluted with PBS + 1%Triton® X-100 Surfactant + 25%Methanol

ยังมีราคาถูกกว่าเอทานอล ดังนั้น จึงเลือกใช้สารละลายเมทานอลในการสกัดสาร AFB1 และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเมทานอลระหว่าง 50-70% โดยปริมาตร ไม่พบความแตกต่างของประสิทธิภาพในการสกัดสาร AFB1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อมรา และคณะ (2557) จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 50% โดยปริมาตร ซึ่งต่ำที่สุดในการสกัดสาร AFB1 อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารสกัดที่ได้ยังมีความเข้มข้นของเมทานอลสูง จึงต้องเจือจางด้วย diluent buffer เพื่อลดผลกระทบของเมทานอลที่จะไปรบกวนปฏิกิริยาบนแถบทดสอบ และพบว่า PBS + 2%TX เหมาะสมกับการเจือจางสารสกัดถั่วลิสงก่อนหยดลงชุดตรวจสอบ โดยมีอัตราส่วนระหว่างสารสกัดถั่วลิสง : PBS + 2%TX เท่ากับ 1:1 จากนั้น จึงนำสารสกัดถั่วลิสงที่เจือจางแล้วปริมาตร 80 ไมโครลิตร หยดลงในชุดตรวจสอบ และแปลผลทดสอบเชิงคุณภาพด้วยสายตาต่อไป

3. ประสิทธิภาพชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.1 ค่าต่ำสุดที่ตรวจสอบได้

การเจือจางสารพิษมาตรฐาน AFB1 ด้วย PBS + 1%TX + 25%Methanol ทำให้เกิดค่า cut off ของ AFB1 ที่ความเข้มข้น 5.0 นาโนกรัม/มล. และค่าต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบต้นแบบ

จะตรวจพบได้ (LOD) อยู่ที่ 0.5 นาโนกรัม/มล. เนื่องจาก ให้ค่าความเข้มสีของเส้น T จางลงแตกต่างกับเส้น T ที่ AFB1 เข้มข้น 0.0 นาโนกรัม/มล. อย่างชัดเจน (Figure 3) เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาวัดความเข้มสีเส้น และแปลผลจากค่าสีระบบ RGB พบว่า เส้น T ที่ AFB1 เข้มข้น 0.0 0.5 1.0 2.0 5.0 และ 10.0 นาโนกรัม/มล. มีค่าความเข้มสีที่ระดับ 1,950 1,083 603 338 254 และ 103 ตามลำดับ เมื่อหาความสัมพันธ์ของค่าความเข้มสีของเส้น T และความเข้มข้นของสาร AFB1 มาตรฐาน ได้ค่า $R^2 = 0.9905$ (Figure 4) การแปลผลด้วยเครื่อง RapidScan ร่วมกับโปรแกรม Rapid test view pro สอดคล้องกับการแปลผลด้วยสายตา โดยพบว่า เส้น T ของชุดตรวจสอบที่ 0.5 นาโนกรัม/มล. มีค่าน้อยกว่าที่ 0.0 นาโนกรัม/มล. ประมาณ 44.5% จึงสามารถระบุได้ว่าที่ 0.5 นาโนกรัม/มล. เป็นค่าต่ำสุด (LOD) ที่ชุดตรวจสอบต้นแบบจะตรวจได้ สำหรับค่า LOD ในการตรวจประเมินสารสกัดถั่วลิสงอาจให้ค่าแตกต่างจากค่า LOD ที่ทดสอบด้วยสารพิษมาตรฐาน AFB1 เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ อาจรบกวนปฏิกิริยาบนแถบทดสอบ (ศุภรดา และคณะ, 2564) เช่น ปริมาณเมทานอลที่ใช้สกัด ความเป็นกรด-ด่าง สารสำคัญอื่น ๆ ในเมล็ดถั่วลิสง เป็นต้น การหาค่า LOD สำหรับ

ทดสอบกับสารสกัดถั่วลิสง ด้วยการเติมสารพิษ
มาตรฐาน AFB1 เข้มข้น 0.0 1.0 5.0 8.0
10.0 และ 20.0 นาโนกรัม/มล. ลงในสารสกัด

ถั่วลิสงที่ปลอดจากสาร AFB1 พบว่า ชุดตรวจ
สอบต้นแบบมีค่า LOD เท่ากับ 1.0 นาโนกรัม/มล.
และมีจุด cut off ที่ 8.0 นาโนกรัม/มล. (Figure 5)

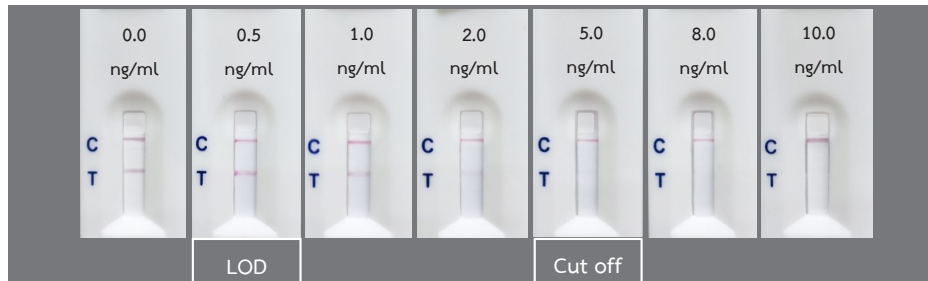


Figure 3 Levels of limit of detection (LOD) at 0.5 ng/ml and cut off at 5.0 ng/ml of the prototype test kits after testing with AFB1 standard solution at the concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0 and 10.0 ng/ml

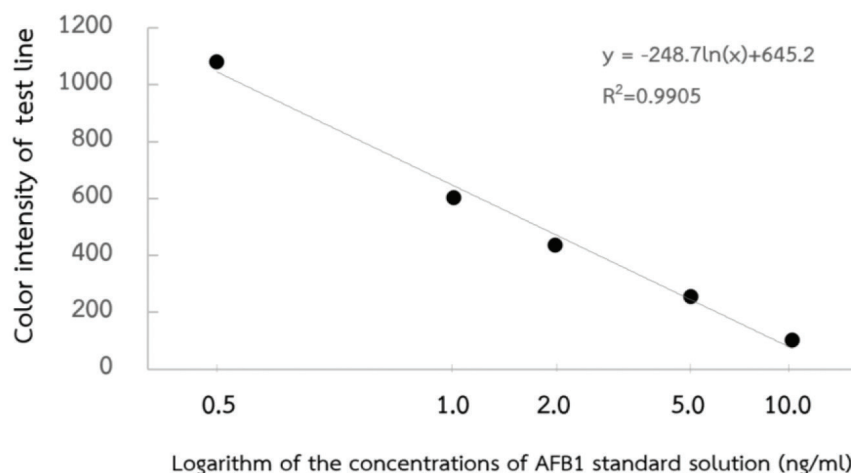


Figure 4 Color intensity of the test line (T) after testing with AFB1 standard solution at the concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 ng/ml analyzed by RapidScan development starter kit and interpreted by Rapid test view pro program

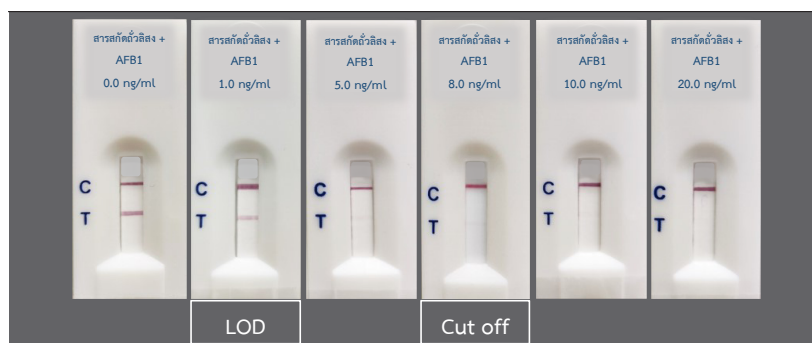
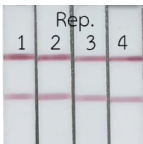
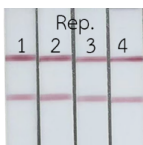
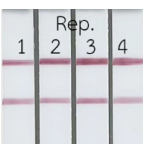


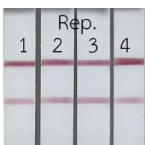
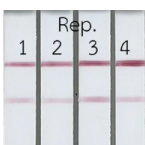
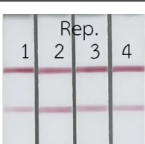
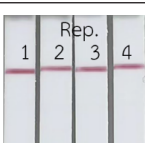
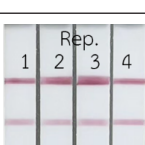
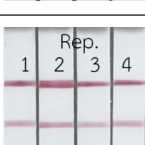
Figure 5 The limit of detection (LOD) at 1.0 ng/ml and cut off at 8.0 ng/ml of the prototype test kits after testing with the peanut extract spiked with AFB1 standard solution at the concentrations of 0.0, 1.0, 5.0, 8.0, 10.0 and 20.0 ng/ml

3.2 ความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ

ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในตัวอย่างถั่วลิสงที่วิเคราะห์ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบให้ผลตรงกับผลการตรวจการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จำนวน 56 จาก 60 ซ้ำ (Table 1) มีความถูกต้องของชุดตรวจสอบ 93.33 % โดยมีความแม่นยำในการตรวจสอบสารที่ต้องการมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (มาศวลัย และคณะ, 2556)

Table 1 The amount of aflatoxin B1 (AFB1) detection by HPLC compared to competitive lateral flow immunoassay (CLFIA) in raw peanut samples

Peanut sample	AFB1: HPLC analysis*	AFB1: CLFIA analysis
sample 1	Not detected	
sample 2	465.17 µg/kg	
sample 3	Not detected	
sample 4	Not detected	
sample 5	4.98 µg/kg	

Peanut sample	AFB1: HPLC analysis*	AFB1: CLFIA analysis
sample 6	0.75 µg/kg	
sample 7	33.46 µg/kg	
sample 8	2.10 µg/kg	
sample 9	Not detected	
sample 10	247.46 µg/kg	
sample 11	Not detected	
sample 12	Not detected	
sample 13	Not detected	
sample 14	Not detected	
sample 15	Not detected	

* In-house method TE-CH-025 based on AOAC (2019) 991.31, 994.08 , LOD 0.25 µg/kg

3.3 การนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปใช้ในภาคสนาม

ผลจากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบตรวจการปนเปื้อนสาร AFB1 ในถั่วลิสงนำเข้าพบว่า ชุดตรวจสอบทั้งหมดให้ผลตรงกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่วิเคราะห์โดยกองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งมีหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพตัวอย่างสินค้านำเข้า ณ ด่านตรวจพืช นอกจากนี้ได้สาธิตวิธีการใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบให้แก่เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช พร้อมให้ทดลองใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบ พบว่าเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชมีความพึงพอใจกับชุดตรวจสอบ เนื่องจาก วิธีการสกัดตัวอย่างและวิธีการ

ตรวจสอบไม่ซับซ้อน ประหยัดเวลา และประหยัดค่าใช้จ่ายเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

4. ต้นทุนการผลิตชุดตรวจสอบ

ต้นทุนการผลิตชุดตรวจสอบสำหรับตรวจประเมินสารอะฟลาทอกซิน ปี1 ชนิด CLFIA จำนวน 700 ชุด มีค่าใช้จ่ายรวม 45,630 บาท หรือเท่ากับ 65.19 บาท/ 1 ชุดตรวจสอบ โดยคำนวณต้นทุนเฉพาะค่าวัสดุ ไม่รวมค่าใช้จ่ายอื่น ๆ มีรายละเอียดดังแสดงใน Table 2 ขณะที่ชุดตรวจสอบนำเข้าจากต่างประเทศ ราคาเฉลี่ย 400-450 บาท/ชุดตรวจสอบ (ราคา ณ ปี พ.ศ. 2565)

Table 2 Cost of CLFIA production for Aflatoxin B1 detection

Descriptions	Cost of 700 pieces*	Cost/piece*
Buffers	1,680.00	2.40
Gold	4,720.00	6.74
Antibody	330.00	0.47
AFB1-BSA	9,950.00	14.21
Goat Anti-Rabbit IgG (GAR)	858.00	1.23
AFB1 Standard	860.00	1.23
Methanol	260.00	0.37
Microtube	600.00	0.86
Nitrocellulose Membrane	1,980.00	2.83
Backing Card	1,170.00	1.67
Absorbent Pad	396.00	0.57
Conjugate Released Pad	363.00	0.52
Sample Pad	363.00	0.52
Plastic Cassette	8,960.00	12.80
Tips	1,300.00	1.86
Pens for GAR and AFB1-BSA	8,500.00	12.14
Silica Gel	700.00	1.00
Air-tight Box	2,640.00	3.77
Total	45,630.00	65.19

*Unit = Baht

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาชุดตรวจสอบชนิด competitive lateral flow immunoassay เพื่อใช้ในการตรวจประเมินการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในผลิตภัณฑ์เกษตรด้วยการแปลผลเชิงคุณภาพด้วยสายตา สามารถประเมินสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ค่าต่ำสุด 0.5 นาโนกรัม/มล. และมีค่า cut off ที่ 5.0 นาโนกรัม/มล. สำหรับค่า LOD ในการตรวจประเมินสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในสารสกัดถั่วลิสง มีค่า 1.0 นาโนกรัม/มล. และมีค่า cut off ที่ 8.0 นาโนกรัม/มล. ผลการนำไปทดสอบตรวจประเมินการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในถั่วลิสงดิบ พบว่า ต้องมีการเจือจางสารสกัดถั่วลิสงก่อนที่จะนำไปหยดลงชุดตรวจสอบด้วยสารละลาย PBS+2%Triton® X-100 surfactant ในอัตราตัวอย่างสารสกัด:สารเจือจางเท่ากับ 1:1 ผลการประเมินการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน บี1 ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบที่ผลิตได้ด้วยการแปลผลเชิงคุณภาพด้วยสายตา มีความสอดคล้องกับผลวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีค่าร้อยละความถูกต้อง 93.33 และมีความแม่นยำในการตรวจสอบสารสกัดจากตัวอย่างถั่วลิสงมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยมีต้นทุนการผลิต 65.19 บาทต่อ 1 ชุด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณจากเงินรายได้การดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และขอขอบคุณกองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช เชียงของ ผศ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบริษัท SERVE SCIENCE จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. 2563. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 (พ.ศ. 2563) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. *ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137 ตอนพิเศษ 118ง*. ลงวันที่ 20 พฤษภาคม 2563.
- มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ วลัยลักษณ์ เมธาภัทร และ สุขศรี อังบริบูรณ์ไพศาล. 2556. การพัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิดทราบผลเร็วสำหรับคลอแรมเฟนิคอลในเกล็ดเคมีภัณฑ์. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 55(4): 214-223.
- ศุภรดา จันทาทิน อนุมาศ บัวเขียว กิตตินันท์ โกมลภิส อุมพร พิมพ์พิทักษ์ ทรงจันทร์ ภูทอง และ นันทิกา คงเจริญพร. 2564. การทดสอบความใช้ได้ของชุดแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดแครโคโตพามีนตกค้างในตัวอย่างเนื้อสุกรและอาหารสุกร. *วารสารแก่นเกษตร*. 49(3): 721-732.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ม.ป.ป. ชุดตรวจวินิจฉัยโรคแอฟลาทอกซินบีหนึ่ง ใน: 1 ทศวรรษ สวทช. ชุดตรวจวินิจฉัยโรคฝีมือคนไทย. แหล่งข้อมูล: <https://www.nstda.or.th/asean-india-dl/sites/default/files/20120716-diagnosis-made-Thailand.pdf>. สืบค้น: 16 มิถุนายน 2566.
- อมรา ชินภูติ ศุภรา อัคคะสารกุล อัจฉราพร ศรีจุฑานุสุพี วนศิริกุล และ เนตรา สมบูรณ์แก้ว. 2557. การผลิตชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซิน เอ็ม1 แบบ DC-ELISA, IDC-ELISA และ Lateral Flow เพื่อการขยายผลเชิงพาณิชย์. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม เงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 57 หน้า.
- AOAC. 2019. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of AOAC. International. 21st Edition, AOAC., Washington DC.
- European Commission. 2010. Commission regulation (EU) No 165/2010 amending regulation (EC) no 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*. L 50/8-12.

- Ingenbleek, L., M. Sulyok, A. Adegboye, S.E. Hossou, A.Z. Koné, A.D. Oyedele, C.K.J. Kisito, Y.K. Dembélé, S. Eyangoh, P. Verger, J.C. Leblanc, B. Le Bizec and R. Krska. 2019. Regional sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria reveals the presence of 164 mycotoxins and other secondary metabolites in foods. *Toxins*. 11(54): 1-24.
- IARC. 2012. Aflatoxins. pp. 225-248. *In*: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks on humans. Mono100-23. Lyon, France. Available at: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/%E2%80%A6/mono100F-23.pdf>. Accessed: June 22, 2022.
- Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. 1995. Codex Alimentarius Commission, General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed CXS 193-1995 Amended in 2019. 66 p.
- Khapanya, W., R. Hongprayoon, and A. Chinaphuti. 2017. Development of one-step immunochromatographic strip for the detection of total aflatoxin in corn sample based on monoclonal antibody clone 4G6. *Journal of ISSAAS*. 23(1): 24-32.
- Moon, J., G. Kim and S. Lee. 2012. A gold nanoparticle and aflatoxin B1-BSA conjugates based lateral flow assay method for the analysis of aflatoxin B1. *Materials*. 5(4): 634-643.
- Wolf, K. and F.J. Schweigert. 2018. Mycotoxin Analysis: A Focus on Rapid Methods. Partnership for Aflatoxin Control in Africa, African Union Commission, Addis Ababa, Ethiopia. The Partnership for Aflatoxin Control in Africa (PACA). 56 p.