

การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในเส้นใยบุหรี่ไทยและต่างประเทศ An analysis of Aflatoxin levels in Thai and foreign cigarette fibers

พิชญ์ชาญ ศรีเจริญ^{1,2}, ทิตยา มีชัย¹, จินตพัฒน์ นทีวัฒนา², เจน มโนนุกุล^{1,*}

Phitchan Sricharoen, Titiya Meechai, Jintapat Nateewattana and Jane Manonukul*

¹ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานครบุรี ทวีวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10170

² สาขาวิชาเทคโนโลยีสุขภาพ เครื่องสำอางและการชะลอวัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
บางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800

¹ Faculty of Medicine, Bangkokthongburi University, Thawi Watthana, Bangkok 10170, Thailand

² Division of Health, Cosmetic and Anti-Aging Technology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology
Phra Nakhon, Bangkok 10800, Thailand

* Corresponding author: Email: jane.man@bkkthong.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงอัลตราโซนิกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างบุหรี่ ทั้งที่ผลิตในประเทศไทยและนำเข้าจากต่างประเทศ การศึกษาได้พิจารณาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด ได้แก่ ปริมาณของสารละลาย เวลาการสกัด ชนิดของสารละลาย และอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการสกัดอะฟลาทอกซินจากตัวอย่างบุหรี่คือการใช้สารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไนโตรและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 v/v ด้วยปริมาตร 60 มิลลิลิตร และใช้เทคนิคอัลตราโซนิกสกัดเป็นเวลา 40 นาที ผลการศึกษาไม่พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในตัวอย่างบุหรี่ ทั้งจากประเทศไทยและต่างประเทศ แม้จะเก็บรักษาไว้นานถึง 12 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบุหรี่ที่จำหน่ายทั่วไปมีความปลอดภัยในด้านการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินสำหรับผู้บริโภค

คำสำคัญ:

อะฟลาทอกซิน; การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก; เอชพีแอลซี; บุหรี่

Abstract

This research employed an ultrasonic extraction technique to quantify Aflatoxin levels in cigarette samples. Parameters evaluated for optimal extraction conditions included solvent volume, extraction time, solvent type, and suitable solvent ratios. The results indicated that the most effective conditions for Aflatoxin extraction from cigarette samples were achieved using a solvent mixture of acetonitrile and methanol in a 1:1 v/v ratio, with a volume of 60 milliliters, and extraction conducted via ultrasonic equipment for 40 minutes. Analysis of both Thai and international

Correspondence to: Jane Manonukul

Faculty of Medicine, Bangkokthongburi University
Thawi Watthana, Bangkok 10170, Thailand
E-mail: jane.man@bkkthong.ac.th

J Med Glob 2024 Sep; 3(3)

Website: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/JMedGlob>

ISSN: 2821-918X (Online)

Received 26 August 2024; revised 21 November 2024; accepted 11 December 2024

How to cite this article: Phitchan Sricharoen, Titiya Meechai, Jintapat Nateewattana and Jane Manonukul. An analysis of Aflatoxin levels in Thai and foreign cigarette fibers. J Med Glob. 2024 Sep;3(3): 65-69.

cigarette samples revealed no detectable levels of Aflatoxin in any sample, even after storage for up to 12 months. These findings suggested consumer safety concerning Aflatoxin contamination in cigarettes.

Keywords: Aflatoxin; Ultrasonic extraction; HPLC; Cigarette

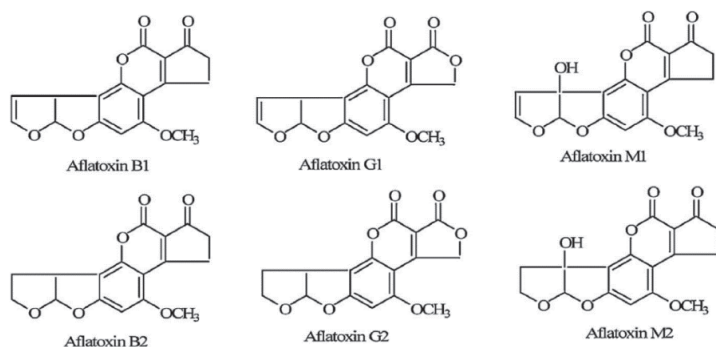
บทนำ

Aflatoxin เป็นสารพิษก่อมะเร็งในร่างกายที่เกิดผลกับอวัยวะ เช่น ตับ ไต ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ และภูมิคุ้มกัน เป็นสารพิษที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ในสภาวะที่มีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา Aflatoxin สามารถปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด เช่น เมล็ดถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มะพร้าว เครื่องเทศ รวมถึงผลิตภัณฑ์แปรรูปอาหาร ไม่ว่าจะเป็นอาหารของคนหรือสัตว์⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังยากที่จะกำจัดด้วยความร้อนในการปรุงอาหาร เนื่องจากสามารถทนความร้อนได้ถึง 260 องศาเซลเซียส โดยทั่วไป Aflatoxin จะถูกทำลายด้วยวิธีทางเคมี เช่น ด่างและกรดเข้มข้น หรือการใช้รังสี แต่ยังคงไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ทั้งหมด และมักตกค้างอยู่ในอาหารที่เก็บรักษาไม่ถูกวิธี Aflatoxin ที่พบในธรรมชาติมีอยู่ 4 ชนิด คือ B1, B2, G1 และ G2 รวมถึง M1⁽²⁾

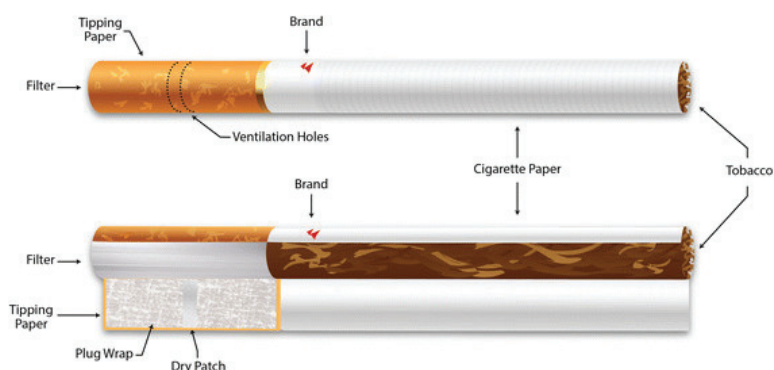
Aflatoxin B1 เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในตับของสัตว์ทดลอง จึงอาจก่ออันตรายต่อมนุษย์ได้ ประเทศไทยกำหนดให้การปนเปื้อนไม่เกิน 20 ไมโครกรัม

ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 20 พีพีบี ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 และกำหนดให้การปนเปื้อนของ Aflatoxin ในถั่วลิสงไม่เกิน 15 พีพีบี โดยคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ จากภาพที่ 1 สูตรที่เรียกตามอักษรนี้ หมายถึงเมื่ออยู่ใต้แสง UV B (ประกอบด้วย B1 และ B2) จะเรืองแสงสีฟ้า ส่วน G จะเรืองแสงสีเขียว และ M หมายถึง Aflatoxin ที่พบในนมวัว โดยเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของ Aflatoxin B ในอาหารผ่านกลไกของร่างกาย

บุหรี่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ผลิตมาจากใบยาสูบขยเป็นเส้นละเอียด แล้วขึ้นรูปเป็นมวน (ภาพที่ 2)⁽³⁾ และบรรจุเก็บในซองเพื่อส่งไปยังท้องตลาด และวางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้า ร้านสะดวกซื้อ และร้านโชห่วย ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ความชื้นและอุณหภูมิ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเฉพาะ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* เชื้อราเหล่านี้จะสร้าง Aflatoxin สำหรับบุหรี่ยาสูบในท้องตลาดมีหลายยี่ห้อและมีระยะเวลาวันหมดอายุแตกต่างกัน โดยบุหรี่ยาสูบไทยมีวันหมดอายุ 6 เดือน ในขณะที่บุหรี่ยาสูบต่างประเทศ มีวันหมดอายุ 1 ปี



ภาพที่ 1 สูตรเคมีของ Aflatoxin [1]



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของบุหรี่ยาสูบ [3]

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เป็นเครื่องมือสำหรับแยกและวิเคราะห์สารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบบนเฟสคงที่ (stationary phase) โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาไป สารแต่ละชนิดจะถูกแยกออกมาเป็นส่วน ๆ ในเวลาที่ต่างกัน โดยสารที่แยกออกมาแต่ละชนิดจากคอลัมน์จะผ่านเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด (detector) ซึ่งสัญญาณที่บันทึกได้จะแปลผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่มีลักษณะเป็นพีค (peak) ในการวิเคราะห์ผลจะนำพื้นที่ใต้พีคของแต่ละสารมาคำนวณ ผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ก็จะทราบปริมาณของสารในตัวอย่าง ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค HPLC ในการแยกและตรวจวัดปริมาณ Aflatoxin เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารในปริมาณต่ำ (< 1 ng) โดยต้องทำการเปลี่ยน Aflatoxin ให้เป็นอนุพันธ์อื่นก่อน (derivatization) แล้วจึงตรวจวัดการเรืองแสงด้วย fluorescence detector ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบที่มีความถูกต้องแม่นยำ⁽⁴⁻⁷⁾

การสกัดอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) จากเส้นใยพุทรีไทยและต่างประเทศ โดยใช้เทคนิคอัลตราโซนิก (ultrasonic-assisted extraction, UAE) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดย UAE ใช้คลื่นอัลตราโซนิกสร้างแรงเฉือนและโพรงอากาศ (cavitation) เพื่อเพิ่มอัตราการถ่ายโอนมวล ลดเวลาและปริมาณตัวทำละลายที่ใช้⁽⁸⁾ ในการสกัดอะฟลาทอกซินจากเส้นใยพุทรีทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ร่วมกับการตั้งค่าความถี่คลื่นอัลตราโซนิกที่ 20-40 kHz หลังการสกัดอะฟลาทอกซินจะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ช่วยให้สามารถเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเส้นใยพุทรีจากแหล่งต่าง ๆ ได้อย่างแม่นยำ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อระดับการปนเปื้อน ได้แก่ สภาพอากาศ การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และกระบวนการผลิตในแต่ละพื้นที่ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาปริมาณ Aflatoxin โดยใช้เทคนิค HPLC ในเส้นใยพุทรีไทยและพุทรีต่างประเทศ การศึกษา Aflatoxin ในเส้นใยพุทรีมีความสำคัญ เนื่องจาก Aflatoxin เป็นสารพิษที่อาจปนเปื้อนในวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ใบยาสูบ ซึ่งมีผลต่อสุขภาพผู้บริโภค หากได้รับในปริมาณที่สูงเกินไป

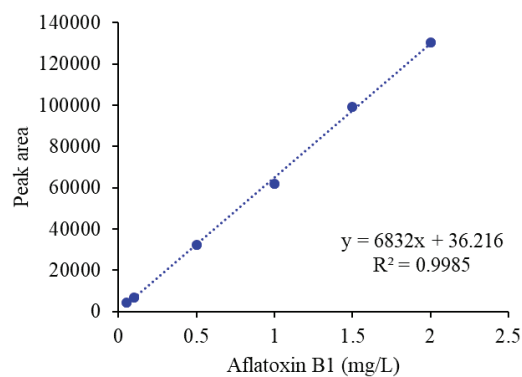
วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการสกัด Aflatoxin จากตัวอย่างพุทรี นำตัวอย่างใบยาสูบที่แกะออกมาจากพุทรี น้ำหนัก 1 กรัม สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างเอซีโตนไทรลกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 v/v ปริมาตร 60 มิลลิลิตร โดยทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกนาน 40 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณ Aflatoxin ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เฟสคงที่ชนิด Symmetry® C18 ขนาด 3.9x150 มม. 5 µm ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ เป็นสารละลายผสมระหว่างอะซีโตนไทรล เมทานอล และน้ำ (15:15:70 v/v/v) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีปริมาตรฉีด 10 ไมโครลิตร Aflatoxin ถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 360 นาโนเมตร และความยาวคลื่นการคายแสงที่ 440 นาโนเมตร การทดลองดำเนินการซ้ำ 3 ครั้งสำหรับตัวอย่างแต่ละชนิด

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด Aflatoxin จากพุทรี

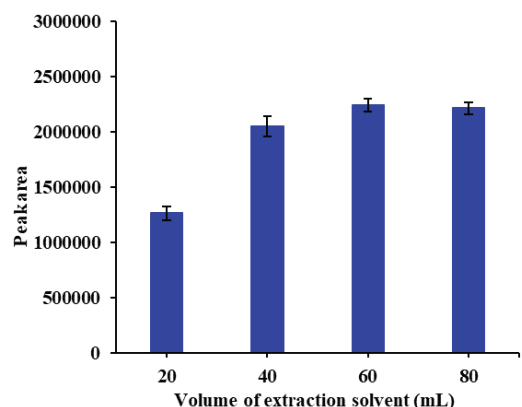
ทำการเตรียมสารมาตรฐาน Aflatoxin B1 ที่ความเข้มข้น 0.05 – 2 mg/L แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC จากภาพที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐาน Aflatoxin B1 ซึ่งเป็นโมเดลในการวิเคราะห์นี้ ได้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 6832x + 36.216$ โดยที่ $R^2 = 0.9985$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($R^2 \geq 0.995$) และจะนำสมการเส้นตรงของการหาปริมาณ Aflatoxin B1 มาใช้เป็นตัวอ้างอิงในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบยาสูบจากพุทรีโดยเทคนิคการสกัดแบบอัลตราโซนิก



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐาน Aflatoxin B1

ผลของปริมาตรตัวทำละลาย

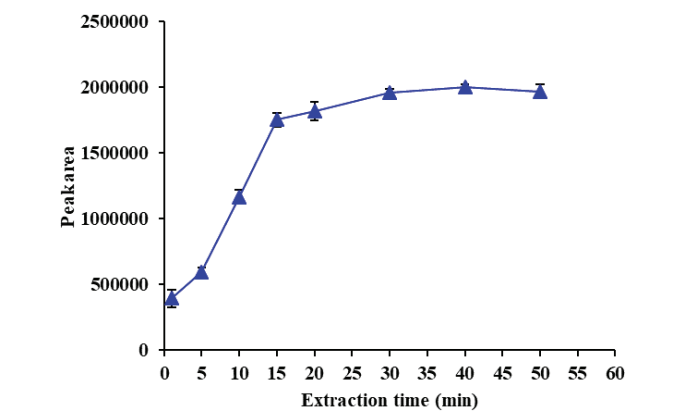
ในการสกัด Aflatoxin B1 จากตัวอย่างพุทรี เพื่อกำหนดปริมาตรขั้นต่ำที่จำเป็นในการสกัด Aflatoxin B1 อย่างสมบูรณ์ การทดลองนี้จะใช้ปริมาตรการสกัดด้วยตัวทำละลายเอซีโตนไทรลกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20, 40, 60 และ 80 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัดนาน 30 นาที ภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่าพื้นที่พีคของสารวิเคราะห์เพิ่มขึ้นตามปริมาตรการสกัดที่เพิ่มขึ้นจาก 40 ไปถึง 60 มิลลิลิตร และมีค่าคงที่ที่ 80 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรการสกัดของตัวทำละลายเอซีโตนไทรลกับเมทานอลในอัตราส่วน 40:60 v/v จึงถูกกำหนดไว้ที่ 60 มิลลิลิตร



ภาพที่ 4 ผลของปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ผลของเวลาในการสกัด

ในการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด Aflatoxin B1 จากตัวอย่างใบยาสูบในบุหรืโดยใช้เทคนิคอัลตราโซนิกสกัดที่เวลา 1-50 นาที ผลการทดลองจากภาพที่ 5 พบว่าการสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลา จาก 1 นาที ถึง 40 นาที หลังจากนั้นปริมาณ Aflatoxin B1 เปลี่ยนแปลงน้อยมาก ดังนั้นเวลาในการสกัด 30 นาทีจึงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดเพราะให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีที่สุด



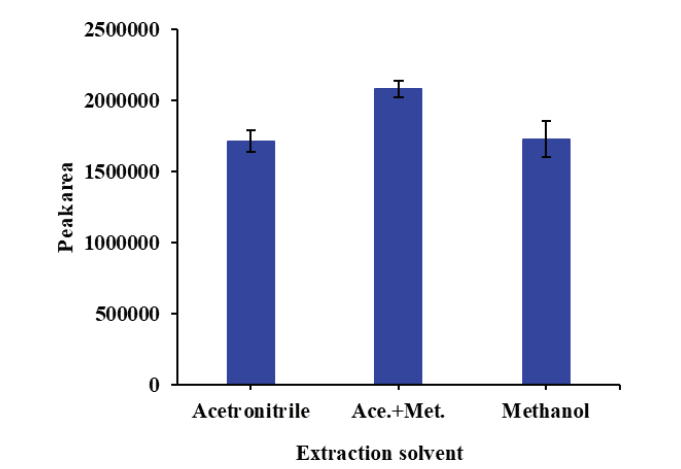
ภาพที่ 5 ผลของเวลาในการสกัด

ผลของชนิดตัวทำละลายในการสกัด

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้โดยทั่วไปสำหรับ Aflatoxin B1 ได้แก่ อะซิโตนไไตรล์ และ เมทานอล จากภาพที่ 6 ชนิดตัวทำละลายในการสกัดให้ปริมาณ Aflatoxin B1 ของทั้ง อะซิโตนไไตรล์ และ เมทานอล ไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังตรวจสอบอัตราส่วนผสมอย่างง่ายของ 1:1 อะซิโตนไไตรล์ และ เมทานอล ผลลัพธ์นี้สามารถสังเกตได้ว่าพื้นที่พีคสูงสุดได้มาจากการใช้ 1:1 อะซิโตนไไตรล์ และ เมทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดภายใต้เงื่อนไขการทดลองเดียวกัน และถูกใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดในการทดลองต่อไป

ปริมาณ Aflatoxin B1 ในบุหรืที่ผลิตในประเทศไทยและนำเข้าจากต่างประเทศ

จากการสุ่มตัวอย่างบุหรืทั้งที่ผลิตในประเทศไทย จำนวน 5 ยี่ห้อ และผลิตในต่างประเทศ จำนวน 5 ยี่ห้อ จากร้านค้าทั่วไป โดยไม่ได้คำนึงถึงสถานะการเก็บรักษาบุหรืของแต่ละร้านค้า เพื่อที่จะทราบผลการวิจัยในสถานะจริงของผู้บริโภค ทำการตรวจวัดในวันที่ซื้อบุหรืมา ในวันที่ตั้งบุหรืทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 เดือน 6 เดือน และ 1 ปี จากตารางที่ 1 พบว่า ทุกตัวอย่างไม่ว่าจะเก็บไว้เป็นเวลานานสูงสุด 12 เดือน ก็ไม่พบ Aflatoxin B1 เลย ทั้งนี้อาจเกิดจากผู้ผลิตบุหรืมีมาตรฐานในการผลิตที่ดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค การออกแบบผลิตภัณฑ์ตลอดจนการขนส่งและการเก็บสินค้าของร้านค้า ย่อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ Aflatoxin B1 ทั้งสิ้น จากการทดลองทำให้เชื่อได้ว่า บุหรืที่ขายในท้องถิ่นไม่พบเชื้อ Aflatoxin B1 เลยในทุกตัวอย่างบุหรื



ภาพที่ 6 ผลของชนิดตัวทำละลายในการสกัด

ตารางที่ 1 ปริมาณ Aflatoxin B1 ในใบยาสูบที่ผลิตในประเทศไทย (T) และนำเข้าจากต่างประเทศ (F)

ตัวอย่างบุหรื	Aflatoxin B1 (mg/g)			
	Day 1	1 Month	6 Months	12 Months
T1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
T2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
T3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
T4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
T5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = not detected

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกในการสกัดหาปริมาณ Aflatoxin จากตัวอย่างบุนหรี โดยมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด ได้แก่ ปริมาตร ตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด ชนิดของตัวทำละลาย และอัตราส่วนที่เหมาะสม ของตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด Aflatoxin จาก ตัวอย่างบุนหรีคือการสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไไตรล์ กับเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 v/v ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก นาน 40 นาที จากการสุ่มตัวอย่างบุนหรีไทยและต่างประเทศมาวิเคราะห์หาปริมาณ Aflatoxin พบว่าไม่มีตัวอย่างไหนที่ตรวจพบ Aflatoxin เลย ถึงแม้จะเก็บตัวอย่าง ไว้จนถึง 12 เดือนก็ตาม ทำให้เชื่อได้ว่าผู้บริโภคมีความปลอดภัยต่อเชื้อ Aflatoxin ในบุนหรี

เอกสารอ้างอิง

1. Jiang Y, Ogunade IM, Vyas D, Adesogan AT. Aflatoxin in dairy cows: toxicity, occurrence in feedstuffs and milk and dietary mitigation strategies. *Toxins*. 2021;13:283.
2. Campos-Avelar I, Colas de la Noue A, Durand N, Cazals G, Martinez V, Strub C, Fontana A, Schorr-Galindo S. *Aspergillus flavus* growth inhibition and aflatoxin b1 decontamination by streptomyces isolates and their metabolites. *Toxins*. 2021;13:340.
3. Stratton J, Shiplo S, Ward M, Babayan A, Stevens A, Edwards S. Assessing contraband tobacco in two jurisdictions: a direct collection of cigarette butts. *BMC Public Health*. 2016;16:622.
4. Areej Zuhair A, Mrwa Thamer H, Maha Muhamed K, Adel Saadi ALS, Noor Ibrahim K. Determination of Aflatoxins in feed by HPLC and PCR. *J Food Pharm Sci*. 2020;8:315-23.
5. Kim HJ, Lee MJ, Kim HJ, Cho SK, Park HJ, Jeong MH. Analytical method development and monitoring of Aflatoxin B1, B2, G1, G2 and Ochratoxin A in animal feed using HPLC with fluorescence detector and photochemical reaction device. *Cogent Food Agriculture*. 2017;3:1419788.
6. Hetmanski MT, Scudamore KA. A simple quantitative HPLC method for determination of Aflatoxins in cereals and animal feedstuffs using gel permeation chromatography clean-up. *Food Additives Contaminants*. 1989;6:35-48.
7. Gazioğlu I, Kolak U. Method validation for the quantitative analysis of Aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) and Ochratoxin A in processed cereal-based foods by HPLC with fluorescence detection. *J AOAC Int*. 2015;98:939-45.
8. Gholizadeh S, Mirzaei H, Khandaghi J, Afshar Mogaddam MR, Javadi A. Ultrasound-assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. *J Food Comp Analysis*. 2022;114:104831.