

**การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดด้วยวิธี ELISA**  
**Development of ELISA Technique for Fumonisin B<sub>1</sub> Detection in Corn**

อมรา ชินภูติ<sup>1/</sup>

Amara Chinaphuti<sup>1/</sup>

อรุณศรี วงษ์อุไร<sup>1/</sup>

Arunsri Wongurai<sup>1/</sup>

---

**ABSTRACT**

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was developed for Fumonisin B<sub>1</sub> detection. Polyclonal antibodies against Fumonisin B<sub>1</sub> (FmB<sub>1</sub>) were produced in the rabbits after immunizing the animal with FmB<sub>1</sub>-bovine serum albumin. The antibody against FmB<sub>1</sub> was obtained from the rabbit after 5 weeks of immunization. The highest antibody titer was found in the sera of rabbit at the 10<sup>th</sup> week with the titer of 1:25,000. The preparation of FmB<sub>1</sub>-HRP conjugate was achieved by a water soluble carbodiimide method. A direct competitive ELISA was developed using the produced antibody and FmB<sub>1</sub>-HRP conjugate at the concentration of 1:1,000 and 1:2,000 respectively for detection of the FmB<sub>1</sub> in corn samples. The appropriate time for the reaction between FmB<sub>1</sub> and FmB<sub>1</sub>-HRP in competition to bind the antibody at the bottom of the well was 60 minutes. High correlation of ELISA with HPLC data for detection of FmB<sub>1</sub> in naturally contaminated corn samples was obtained with the linear regression equation of  $y = 0.8943x + 0.0904$ . and correlation coefficient of 0.97. The ELISA technique for Fumonisin B<sub>1</sub> detection in corn was successfully developed in this studies and should be further developed as commercial ELISA test kit.

**Key words:** Fumonisin B<sub>1</sub>, polyclonal antibodies, ELISA

**บทคัดย่อ**

พัฒนาวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพด ซึ่งปัจจัยที่จะนำมาใช้ในวิธีการตรวจสอบนั้นคือ แอนติบอดี

---

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

<sup>1/</sup> Postharvest and Processing Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900

สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> และเอ็นไซม์คอนจูเกต (Fumonisin B<sub>1</sub>-HRP conjugate) ได้ผลิตแอนติซีรัมต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> แบบ polyclonal ในกระต่ายพันธุ์ White New Zealand โดยฉีด Fumonisin B<sub>1</sub>-BSA เข้ากระต่ายแบบ intradermal injection หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของแอนติซีรัมจากเลือดที่เจาะทุกสัปดาห์โดยวิธี ELISA พบว่าความเข้มข้นของแอนติซีรัมต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> สูงสุดถึง 1:25,000 ในสัปดาห์ที่ 10 ของการเจาะเลือด และทำการเตรียม Fumonisin B<sub>1</sub>-HRP conjugate โดยวิธี Water Soluble Carbodiimide หลังจากการนั้นได้พัฒนาวิธี Direct Competitive ELISA ขึ้นมาโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดี 1:1,000 และเอ็นไซม์คอนจูเกตความเข้มข้น 1:2,000 ในการทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจหาสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพด และใช้เวลาในการบ่มสารพิษจากตัวอย่างและ Fumonisin B<sub>1</sub>-HRP conjugate ในการแข่งขันกันไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบที่หลุมทดสอบประมาณ 60 นาที ผลของการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดโดยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้กับวิธีมาตรฐาน HPLC พบว่าผลการวิเคราะห์มีความสัมพันธ์กันทางสถิติโดยมีค่า  $r=0.97$  และสมการ linear regression  $y = 0.8943x + 0.0904$  รูปแบบเทคนิค ELISA ที่พัฒนานี้สามารถนำไปตรวจหาสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดได้ และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์ต่อไป

**คำหลัก:** สารพิษ ฟูโมนิซิน บี<sub>1</sub> แอนติบอดี อีไลซา

## คำนำ

ฟูโมนิซิน (fumonisin) เป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheldon, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (Norred, 1993) สารพิษ fumonisin เป็น diester ของ propane-1,2,3-tricarboxylic acid และ 2-amino-12,16-dimethyl-3,5,10,14,15-penta-hydroxyeicosane (Yu and Chu, 1996) fumonisin เกิดตามธรรมชาติมี 2 ชนิดคือ Fumonisin B<sub>1</sub> และ Fumonisin B<sub>2</sub> โดยพบ Fumonisin B<sub>1</sub> เป็น 3 เท่าของ Fumonisin B<sub>2</sub> สารพิษ fumonisin สามารถทำให้เกิดโรคตับและมะเร็งตับในหนู เกิดโรคโลหิตจางในม้า และน้ำท่วมปอดในสุกร ส่วนในมนุษย์ fumonisin ทำให้เกิดโรคมะเร็งที่หลอดอาหารส่วนบน ซึ่งมีรายงานว่าพบในอัฟริกาใต้ อิตาลีและประเทศจีน (Thiel et al., 1992)

เชื้อรา *Fusarium moniliforme* มักจะพบปนเปื้อนอยู่ในข้าวและข้าวโพด รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด โดยเฉพาะในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และวัตถุดิบหลายชนิดที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศเนื่องจากสารพิษตัวนี้เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นหลายประเทศได้มีการกำหนดปริมาณสูงสุดของสารพิษ fumonisin ที่อนุญาตให้ปนเปื้อนได้ในอาหารและอาหารสัตว์ต่างกันไป เช่น FDA กำหนดให้ผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดที่เป็นอาหาร

มีสารพิษปนเปื้อนได้ไม่เกิน 2 มก./กก. ข้าวโพดที่เป็นอาหารสุกร 20 มก./กก. และในอาหารม้าอนุญาตให้ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 5 มก./กก. (Anon,2001) ในประเทศไทยได้เคยมีการสำรวจข้าวโพดพบว่า 44.4% ของตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสาร Fumonisin B<sub>1</sub> ปริมาณ 0.25-1.82 มก./กก. และตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่จะมาจากตลาดท้องถิ่น (Wang *et al.*, 1993)

โดยทั่วไปการวิเคราะห์สารพิษ fumonisin ใช้วิธีการทางเคมี เช่น วิธี HPLC (high performance liquid chromatography) (Bennett and Richard, 1994) และวิธี TLC (thin-layer chromatography) (Rottinghaus *et al.*, 1992) ซึ่งทั้งสองวิธีดังกล่าวจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานมาก เครื่องมือที่ใช้ก็ยุ่งยาก ซับซ้อน และมีราคาแพง ไม่สะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากๆ และสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ ปัจจุบันหลายประเทศได้ทำการพัฒนา วิธีทาง immunological assay มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษ fumonisin เช่นวิธีอีไลซ่า (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) และเป็นวิธีที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง (Pestka *et al.*, 1994) เพราะเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เครื่องมือที่ใช้ไม่ซับซ้อน ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติ สามารถวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน และต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างต่ำมากเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมีสำหรับประเทศไทย โดยกรมวิชาการเกษตรได้ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในการพัฒนาวิธี

ELISA มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซิน และสามารถพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซินสำเร็จรูปขึ้นมาใช้ในประเทศ เพื่อทดแทนการนำเข้า (Chinaphuti *et al.*, 2002)

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อการพัฒนาวิธี ELISA มาใช้ในการตรวจสอบสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในประเทศไทย สำหรับใช้ทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ จึงทำการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> และทำการเตรียมเอ็นไซม์คอนจูเกต (conjugate enzyme) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่จะนำไปใช้ในการตรวจโดยวิธี ELISA

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การผลิตแอนติซีรั่มแบบ Polyclonal เพื่อใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ

#### 1.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้น

นำสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> มาตรฐาน มาเชื่อมต่อกับ bovine serum albumin (BSA) โดยวิธี Water Soluble Carbodiimide (Yu and Chu,1996) โดยสารละลาย 1- ethyl -3,3-dimethylamino-propyl-carbodiimide (EDPC) 1 ก. ในน้ำกลั่น 0.1 มล. แล้วเติมลงในสารผสมระหว่างสารพิษมาตรฐาน Fumonisin B<sub>1</sub> 1 ก. ละลายใน 0.5 มล. ของ conjugate buffer (0.1 M 2-N-morpholinoethane-sulfonic acid, 0.9M NaCl, 0.02%NaN<sub>3</sub>, pH 4.7) และ Bovine serum albumin (3 มล. ละลายในน้ำกลั่น

0.5 มล.) บ่มสารผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. หลังจากนั้นนำสารผสมมาทำการ dialysis ในสารละลาย 0.01M phosphate buffer pH 7.5 เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยน buffer 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำ Fumonisin-BSA มาทำให้แห้ง โดยเครื่อง Lyophilizer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

## 1.2 การฉีดแอนติเจน (Immunization)

### เข้ากระต่าย

ฉีด Fumonisin B<sub>1</sub>- BSA ปริมาณ 500 ไมโครกรัมเข้าที่ด้านหลัง (intradermal injection) กระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 2 เดือน จำนวน 3 ตัว หลังจากการฉีดครั้งแรก 1 เดือน ทำการฉีดกระตุ้น (booster injection) เข้ากล้ามเนื้อกระต่ายโดยใช้ Fumonisin B<sub>1</sub>- BSA ปริมาณเท่ากับการฉีดครั้งแรก ทำการเจาะเลือด กระต่ายหลังการฉีดครั้งแรกประมาณ 1 เดือน และเจาะเลือดติดต่อกันทุกสัปดาห์เป็นเวลา 13 สัปดาห์ แอนติซีรัมที่เก็บได้จะนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ammonium Precipitation ก่อนนำไปใช้

## 1.3 การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรัม

นำแอนติซีรัมที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 มาวัดความเข้มข้น โดยนำมาเจือจาง ด้วย 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 เป็น 1:10, 1:100 1:1,000 1:5,000 1:10,000 1:15,000 1:20,000 1:25,000 และทำการวัดความเข้มข้นโดยวิธี Indirect ELISA ตาม

ขั้นตอนดังนี้

1.3.1 เคลือบหลุมทดสอบ (Micro ELISA plate) ด้วย Fumonisin B<sub>1</sub>- BSA ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัม/มล.ใน 0.01M PBS โดยหยด Fumonisin B<sub>1</sub>- BSA ที่เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม.

1.3.2 ล้างหลุมทดสอบ 3 ครั้งด้วย 0.01M phosphate buffer saline + Tween 20 (PBS-T) แล้วหยด blocking solution (PBS-T+1% BSA) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. แล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง

1.3.3 หยดแอนติบอดีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ลงในหลุมทดสอบปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. แล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง

1.3.4 หยดแอนติบอดีครั้งที่สอง (goat-anti rabbit IgG ความเข้มข้น 1:1,000) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม. แล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง

1.3.5 หยด substrate (tetramethylbenzidine) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ปฏิกริยาจะเกิดเป็นสีฟ้าเข้ม-จาง ตามระดับความเข้มข้นของแอนติซีรัม

1.3.6 หยดปฏิกริยาโดยเติม 50 ไมโครลิตร ของ 0.3M phosphoric acid ปฏิกริยาจะ

เปลี่ยนเป็นสีเหลือง อ่านความเข้มของสีด้วย Micro ELISA Reader ที่ช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร

## 2. การเตรียมสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ผูกติดกับเอ็นไซม์

เอ็นไซม์ที่นำมาใช้ในการผูกติดกับสารพิษคือ เอ็นไซม์ horseradish peroxidase (HRP) โดยใช้วิธี Water - Soluble Carbodiimide ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

2.1 ชั่งสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> มาตรฐาน ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ละลายใน 25 % ethanol 2 มล.

2.2 นำสาร EDPC (1-ethyl-3.3'-dimethylaminopropyl carbodiimide) ปริมาณ 125 มก. ละลายในน้ำ 500 ไมโครลิตร

2.3 นำสารละลายในข้อ 2.2 ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ผสมกับสารพิษที่เตรียมในข้อ 1 จำนวน 2 มล.

2.4 ละลาย 2.4 มก. ของเอ็นไซม์ horseradish peroxidase ใน 25 % ethanol 2 มล.

2.5 ผสมสารจากข้อ 4 ลงในสารผสมข้อ 3

2.6 เติมสาร EDPC ปริมาณ 84 ไมโครลิตร ลงในสารผสมข้อ 5 กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสาร EDPC ปริมาณ 84 ไมโครลิตร ลงในสารผสมอีกครั้ง

2.7 กวนสารผสมที่ 4<sup>๕</sup> เป็นเวลา 12 ชม.

2.8 นำสารผสมทั้งหมดมา dialyzed ใน 0.01 M phosphate buffer เป็นเวลา 96 ชม.

เก็บเอ็นไซม์คอนจูเกตที่ได้ในขวดแก้วสีชา แล้วเก็บไว้ที่ -20 °ซ.

## 3. การทดสอบ Checkerboard Test

ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ แอนติซีรัมบริสุทธ์ และ Fumonisin B<sub>1</sub> เอ็นไซม์คอนจูเกตในการทำปฏิกิริยากัน และให้ผลของปฏิกิริยาที่ชัดเจนด้วยวิธี Direct ELISA โดยนำแอนติซีรัมมาเจือจางใน coating buffer (0.015M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0.035M NaHCO<sub>3</sub> pH 9.6) ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:1,000 1:2,000 1: 4,000 และเจือจางเอ็นไซม์คอนจูเกตด้วย 0.01 M PBS +1% BSA มีความเข้มข้นเป็น 1:1,000 1:2,000 1:4,000 1:8,000 โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

3.1 เคลือบหลุมทดสอบด้วยแอนติบอดีต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร/หลุม ตามแผนผังที่วางไว้ (Figure 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม.

3.2 เทของเหลวในหลุมทิ้งแล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง

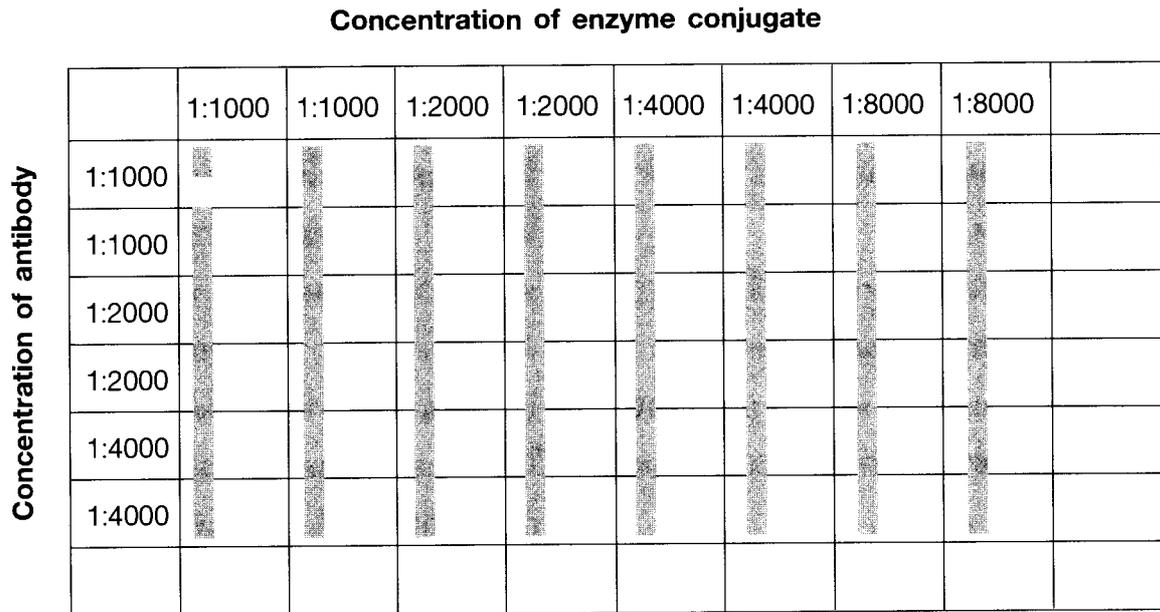
3.3 หยด blocking solution (0.01MPBS + 0.01%BSA) ปริมาณ 150 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบบ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างสอหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง

3.4 หยดเอ็นไซม์คอนจูเกตที่เจือจางระดับต่าง ๆ ลงในหลุมทดสอบตามแผนผังที่วางไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. ล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง

3.5 หยด substrate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ตามลงไป แล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

3.6 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม stopping solution (0.3M phosphoric acid) ลงไปในปริมาณ

100 ไมโครลิตร อ่านผลของปฏิกิริยาด้วย Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และเอ็นไซม์คอนจูเกตในการทำปฏิกิริยา โดยจะใช้หลุมทดสอบเฉพาะ 60 หลุมด้านใน(เส้นทึบ) เท่านั้น เพื่อป้องกันการผิดพลาดที่เกิดจากแสง



**Figure 1.** Layout of fixed well tested for suitable concentration of antiserum and enzyme conjugate : inside opaque line (60) to percent error from light

#### 4. การทดสอบระยะเวลาที่สั้นและเหมาะสมในการบ่มสารพิษกับเอ็นไซม์คอนจูเกต

ทดสอบด้วยวิธี Direct Competitive ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มความเข้มข้น 1:1,000 และความเข้มข้นของเอ็นไซม์คอนจูเกต 1:2,000 ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบในการบ่มสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> กับเอ็นไซม์คอนจูเกต ในการแข่งขันกันที่จะไปจับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ในหลุมทดสอบ คือ 15 30 45 60 และ 90 นาที สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ที่ใช้ในการทดสอบจะใช้

5 ระดับคือ 0 0.25 0.5 1 และ 5 ไมโครกรัม/มล. (ppm) ขั้นตอนการทดสอบดังนี้

4.1 เคลือบหลุมทดสอบแบบแถว 12 หลุม ด้วยแอนติบอดีจำนวน 15 แถว (Figure 2)

4.2 หยดสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ลงในหลุมทดสอบที่เคลือบแอนติบอดีแล้วที่ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม/ระดับความเข้มข้น และหยดเอ็นไซม์คอนจูเกตปริมาณ 50 ไมโครลิตร ตามลงไปทุกหลุมทดสอบทั้ง 15 แถว ตามแผนผัง (Figure 2)

0	0.25	0.5	1	5	Blank	0	0.25	0.5	1	5	Blank
ppm	ppm	ppm	ppm	ppm		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	

**Figure 2.** Twelve tested well with coating

4.3 บ่มสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> กับเอ็นไซม์คอนจูเกต ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 30 45 60 และ 90 นาที ตามลำดับ ทำการทดสอบ 3 แถว ต่อหนึ่งระยะเวลาในการบ่ม

4.4 หลังครบกำหนดเวลาในการบ่มแต่ละระยะเวลา นำหลุมทดสอบทั้ง 3 แถวมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง

4.5 หยด substrate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงไปทุกหลุม บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จึงหยด stopping solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วอ่านผลในช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร

## 5. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพด ระหว่างวิธี ELISA กับวิธี HPLC

นำตัวอย่างข้าวโพดที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ จำนวน 10 ตัวอย่างมาบดให้ละเอียด แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน นำข้าวโพดส่วนที่ 1 ไปตรวจหาปริมาณสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> โดยวิธี ELISA และ ข้าวโพดส่วนที่ 2 ไปตรวจด้วยวิธี HPLC

### 5.1 การวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

วิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดโดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Stack และ Eppeley (1992) โดยนำข้าวโพดที่ละเอียด 25 ก. มาปั่นกับ 75% เมทานอลปริมาณ 50 มล. กรองเอาเฉพาะส่วนใสมาผ่าน SAX column นำส่วน

ที่ elute ได้ มาเติมสาร OPA ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ

### 5.2 การวิเคราะห์โดยวิธี ELISA

สกัดสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> จากข้าวโพด โดยชั่งตัวอย่างข้าวโพดที่บดละเอียด 25 ก. ใส่ใน flask เติมเมทานอล 75 % ที่มีส่วนผสมของ NaCl 4% ลงไป ปริมาณ 75 มล. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ให้ตกตะกอน แล้วเอาเฉพาะส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้นำไปเจือจางเป็น 1:20 ด้วย 0.01 M PBS ได้ทันที

การเตรียมสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> มาตรฐาน โดยนำสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> มาตรฐาน (Sigma Co.,Ltd.) มาเจือจางด้วย 1.5% เมทานอล-น้ำ ให้มีความเข้มข้นเป็น 0 1 10 50 และ 100 ppm

ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA เริ่มด้วยการหยดสารพิษมาตรฐาน Fumonisin B<sub>1</sub> ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบที่เคลือบด้วยแอนติบอดีเรียบร้อยแล้วจำนวน 5 ความเข้มข้นๆ ละ 2 หลุมทดสอบ (2 ซ้ำ) และหยดสารสกัดจากตัวอย่างข้าวโพดที่เตรียมไว้ลงในหลุมทดสอบที่เหลือปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการหยดตัวอย่าง 4 หลุมทดสอบ/ตัวอย่าง (4 ซ้ำ) หลังจากนั้นหยดเอ็นไซม์คอนจูเกตที่

เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 1: 2,000 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ตามลงไปทุกหลุม และบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที ล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วหยด substrate ปริมาณ 100 ไมโครลิตรทุกหลุม บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที หยดปฏิกิริยาโดยเติม stopping solution 100 ไมโครลิตร/หลุม อ่านผลของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารพิษด้วยโปรแกรม Kinetic Calculation แบบ Log-Logit/Log

### ผลการทดลองและวิจารณ์

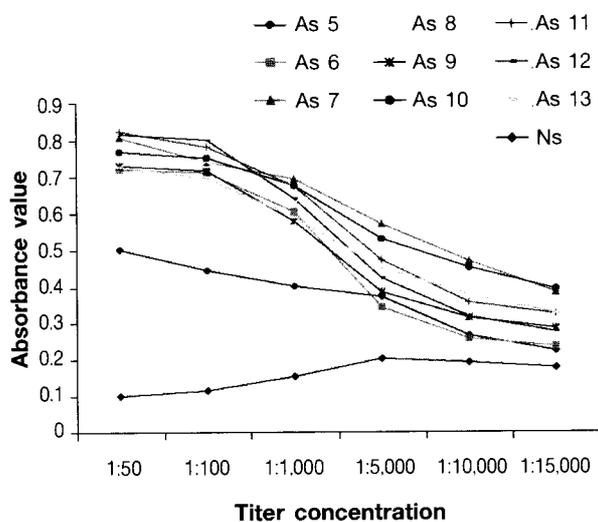
#### 1. การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรัม

นำแอนติซีรัมที่ผลิตได้หลังการเจาะเลือดทั้ง 13 ครั้งมาทำให้บริสุทธิ์แล้ววัดความเข้มข้นการเจาะเลือดสัปดาห์ที่ 1-4 กระจายยังไม่สร้างแอนติซีรัมต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> แอนติซีรัมต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> เริ่มสร้างในสัปดาห์ที่ 5 จนถึงสัปดาห์ที่ 13 ปริมาณความเข้มข้นของแอนติซีรัมพบสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 คือ 1:25,000 (Figure 2) ผลการทดลองนี้ตรงกับงานวิจัยของ Yu และ Chu (1996) ซึ่งรายงานว่าในการผลิตแอนติบอดีต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> กระจายเริ่มสร้างแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 5 และความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 12 เมื่อเปรียบเทียบแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับซีรัมปกติของกระต่ายก่อนฉีดแอนติเจน (Fumonisin B<sub>1</sub>-BSA) พบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนคือ

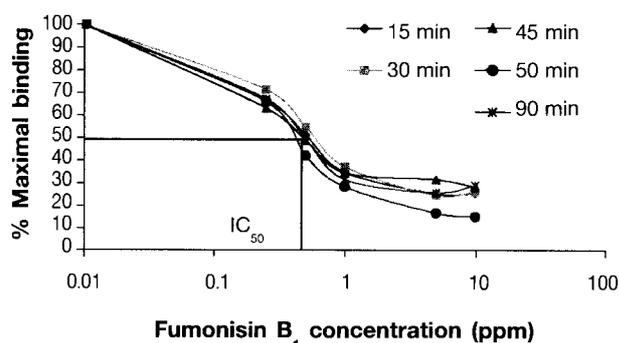
ซีรัมปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสง (absorbance value) ต่ำในทุกระดับความเข้มข้น ขณะที่ซีรัมครั้งที่ 5-13 ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงตามความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อ Fumonisin B<sub>1</sub> (Figure 3) ขณะที่การผลิตแอนติซีรัมต่อสารแอฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ในประเทศไทยสามารถผลิตได้ความเข้มข้นสูงถึง 1: 128,000 (อมราและคณะ, 2549)

#### 2. การเตรียมสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ผูกติดกับเอ็นไซม์

เตรียมสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> - HRP conjugate ได้ทั้งหมดปริมาณ 4.971 ก. และมี ความเข้มข้นสูงถึง 1: 164,000 เมื่อวัดโดยวิธี ELISA



**Figure 3.** Determination of antiserum (As) titers for representative rabbit of 5-13 weeks in comparison to normal serum, (Ns) % maximal binding Fumonisin B<sub>1</sub> concentration (ppm)



**Figure 4.** Comparison the incubation time for the appropriate reaction between Fumonisin B<sub>1</sub> in sample and Fumonisin B<sub>1</sub> – HRP in competition to bind the antibody at the bottom of coated well (the lowest IC<sub>50</sub> value was selected)

### 3. การทดสอบ Checkerboard Test

ความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1: 1,000 ในการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์คอนจูเกตที่เหมาะสม คือ 1: 2,000 ซึ่งให้ผลของปฏิกิริยาที่ชัดเจน และมีค่าความเชื่อมั่นที่ 99 % เมื่อเทียบกับความเข้มข้นระดับอื่น ๆ

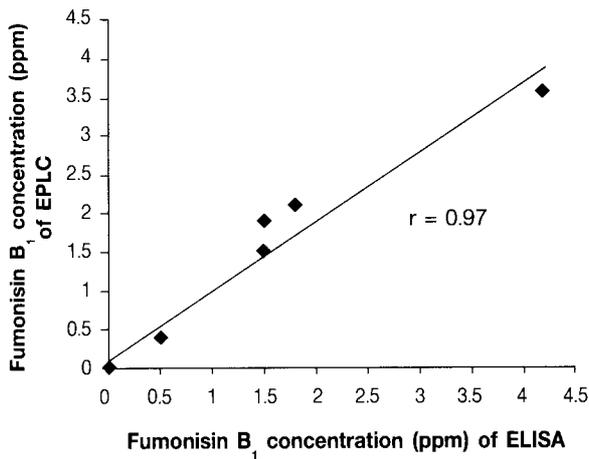
### 4. การทดสอบระยะเวลาที่สั้นและเหมาะสมในการบ่มสารพิษกับเอ็นไซม์คอนจูเกต

ผลจากการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> กับสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> - HRP conjugate ในการแข่งขันกันไปจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ที่หลุมทดสอบที่ระยะเวลา 15 30 45 60 และ 90 นาที พบว่าการบ่มที่ระยะเวลา 60 นาทีจะให้ค่า IC<sub>50</sub> (ค่าความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน ที่

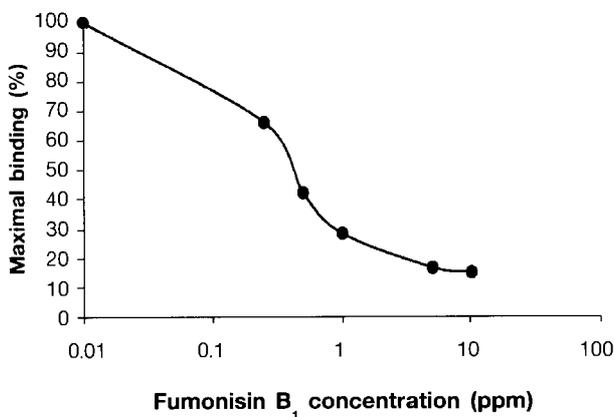
ทำให้ปฏิกิริยาการเกิดสัญญาณยับยั้ง 50%) ต่ำสุดคือที่ 0.5 ppm ขณะที่ระยะเวลาการบ่มที่ 45 30 90 และ 15 นาที มีค่า IC<sub>50</sub> เป็น 0.6 0.7 0.8 และ 0.9 ตามลำดับ (Figure 4) ค่า IC<sub>50</sub> ต่ำ แสดงว่าที่ระยะเวลานั้นทำให้ปฏิกิริยามีความไวในการตรวจจับดีที่สุด ซึ่งระยะเวลาในการบ่มนี้จะแตกต่างกันในแต่ละวิธีการทดสอบ กรณีชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของ TECHNA ใช้ระยะเวลาในการบ่มประมาณ 30 นาที ชุดทดสอบของ NEOGEN ใช้เวลาในการบ่มประมาณ 15 นาที ซึ่งระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกันเนื่องจากการใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและเอ็นไซม์คอนจูเกตต่างกัน

### 5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดระหว่างวิธี ELISA และวิธี HPLC

ปริมาณสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ที่ปนเปื้อนในข้าวโพดตามธรรมชาติ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และวิธี ELISA ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า correlation coefficients = 0.9732 และมีสมการ linear regression ของ  $y = 0.8943x + 0.0904$  (Figure 5) และกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA (standard curve) (Figure 6) Trucksess และ Abouzied (1996) ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบวิธี ELISA และ HPLC ในการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดเช่นกัน และพบว่าวิธี ELISA ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ



**Figure 5.** Correlation of ELISA with HPLC data for analysis of Fumonisin B<sub>1</sub> in naturally contaminated corn samples. Linear regression equation of  $y=0.8943x + 0.0904$  with correlation coefficient of 0.97 was obtained



**Figure 6.** Standard curve of Fumonisin B<sub>1</sub> for Immunoassay by direct competitive ELISA

เท่ากับวิธี HPLC แต่ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า โดยใช้เวลาเพียง 35 นาที และสามารถนำไปใช้ตรวจสอบสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในภาคสนามได้

## สรุปผลการทดลอง

สามารถผลิตแอนติซีรัมต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> และนำมาพัฒนาใช้ในการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ได้ โดยวิธี ELISA ในผลิตผลเกษตรโดยเฉพาะข้าวโพดได้ผลเป็นอย่างดี โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติซีรัมต่อสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 1: 1000 มาเคลือบหลุมทดสอบ (MicroELISA Plate) และใช้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์คอนจูเกตที่ระดับ 1: 2,000 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มสารพิษจากตัวอย่างกับเอ็นไซม์คอนจูเกตคือ 60 นาที และผลของการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในข้าวโพดให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน วิธี ELISA เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัดและแม่นยำ สามารถนำไปใช้ในการตรวจปริมาณสารพิษ Fumonisin B<sub>1</sub> ในผลิตผลเกษตร ทำให้ทราบผลอย่างรวดเร็วว่าผลิตผลเกษตรมีการปนเปื้อนสารพิษหรือไม่ ซึ่งจะได้หาวิธีการจัดการได้ทันท่วงที เพื่อลดความเสียหายทั้งด้านการค้าและด้านสุขภาพของผู้บริโภค

## เอกสารอ้างอิง

อมรา ชินภูติ, ชวเลิศ ตรกรุณาสวัสดิ์ และลิลลี พลานุสร. 2549. หน้า1-14. ใน: รายงานโครงการผลิตชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซินสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์. โครงการวิจัยระดับดีที่ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้การดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร ประจำปี 2549 กรมวิชาการเกษตร.

- Anon. 2001. *Fumonisin Levels in Corn and Corn Products Intended for Human Consumption*. FDA/CFSSAN. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fumongui.html>. November, 20/9/2001.
- Bennett, G.A. and J.L. Richard. 1994. Liquid chromatographic of analysis for the naphthalene dicarboxyaldehyde derivative of fumonisins. *J. AOAC Int.* 77:501-506.
- Chinaphuti, A., C. Trikarunasawat, A. Wongurai and S. Kositcharoenkul. 2002. Production of in – house ELISA test kit for detection of aflatoxin in agricultural commodities and their validations. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 36:179-186.
- Norred, W. P. 1993. *Fumonisins: mycotoxins produced by Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health* 38:309-328.
- Pestka, J. J., J. I. Azcona-Olivera, R.D. Platter, F. Minervini, B. Doko. and A. Visconti. 1994. Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA,GC-MS and HPLC. *J. Food Protection* 57: 167-172.
- Rottinghaus, G.E., C.E. Coatney and H.C. Minor. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:326-329.
- Stack, M.E and R.M. Eppley. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn products. *J. of AOAC Int.* 75(5): 834-837.
- Trucksess, M.W., M.M. Abouzied. 1996. Evaluation and application of immunochemical method for Fumonisin B<sub>1</sub> in corn. Pages 345-367. *In: Immuniassay for Residue Analysis*. R.C. Beier (ed.) American Chemical Society, Washington D.C.
- Thiel, P.G., W.F.O. Marasas, E.W. Sydenham, G.S. Shepard, and W.C.A. Gelderblom. 1992. The implication of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 119: 3-9.
- Wang, D.S., Y.Sugiura., Y.Ueno., P. Buddhanont and M. Suttijit. 1993. A limited survey for the natural occurrence of fumonisins in Thailand. *Thai J. Toxicology* 9: 42-46.
- Yu, Feng-Yiu and F.S. Chu. 1996. Production and characterization of antibodies against Fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Food Protection* 59: 992-997.