

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 3

Standard Methods for Food Analysis

Volume III

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3

Standard Methods for Food Analysis Volume III



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
www.dmsc.moph.go.th



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐาน
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร
เล่มที่ 3

Standard Methods
for Food Analysis

Volume III



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3

Standard Methods for Food Analysis, Volume III

รหัส : DMScBQSF-201502-A

พิมพ์ครั้งที่ 1 : สิงหาคม 2558 จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN: 978-616-11-2608-7

สงวนลิขสิทธิ์

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี

<http://www.dmsc.moph.go.th/dmsc/home.php>

โทรศัพท์/โทรสาร 0 2951 1021

http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/Index_Main.htm

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ

ที่อยู่ 314-316 ถนนบำรุงเมือง ป้อมปราบฯ กรุงเทพมหานคร 10100

โทรศัพท์ 0-2223-3351, 0-2223-5548

โทรสาร 0-2621-2910, 0-2621-2911

คำปรารภ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ของประเทศ มีความสำคัญต่อการกำกับดูแลคุณภาพตามกฎหมาย ซึ่งเป็นบทบาทหนึ่งของการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของชาติ และเป็นการแสดงความโปร่งใสในการดำเนินงาน สามารถสร้างความเข้มแข็งในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานของผลิตภัณฑ์สุขภาพ ในกรณีที่เกิดปัญหาด้านคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จะต้องใช้ผลการตรวจวิเคราะห์ซึ่งใช้วิธีมาตรฐานของประเทศในการตัดสิน ทั้งนี้ เพื่อลดปัญหาการโต้แย้งทางกฎหมายเรื่องผลการตรวจวิเคราะห์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เป็นหน่วยงานในสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีอำนาจหน้าที่ในการกำหนดและพัฒนาคุณภาพ มาตรฐาน และวิธีการตรวจวิเคราะห์และเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านอาหาร ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพ และความปลอดภัยให้เป็นไปตามกฎหมายและเป็นหลักฐานทางคดี รวมทั้งมีความน่าเชื่อถือ ตลอดจนการยอมรับทั้งในระดับประเทศและนานาชาติ และเมื่อมีการเข้าสู่ประชาคมอาเซียน ในปี 2558 จะมีการนำเข้าและส่งออกอาหารมากขึ้น จึงจำเป็นต้องมีมาตรฐานด้านการตรวจวิเคราะห์ที่ดีไว้รองรับ ดังนั้น สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงได้จัดทำหนังสือวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารขึ้น โดยดำเนินการจัดทำต่อเนื่องมาแล้วจำนวน 2 เล่ม เล่มนี้เป็นเล่มที่ 3 มีการเพิ่มเติมวิธีวิเคราะห์ทั้งด้านเคมี จุลชีววิทยา และชีวโมเลกุล และพัฒนาให้เป็นผลงานเชิงนวัตกรรมของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้หน่วยงานในสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ห้องปฏิบัติการภาครัฐ สถาบันการศึกษา ตลอดจนผู้ประกอบการและบริษัทเอกชน สามารถนำไปใช้ในการอ้างอิง ควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร เป็นประโยชน์ในการส่งเสริมเศรษฐกิจด้านอาหาร การคุ้มครองผู้บริโภค การแก้ไขปัญหาสาธารณสุขของประเทศ และการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีแก่ประชาชนต่อไป



(นายแพทย์อภิชัย มงคล)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

7 กรกฎาคม 2558

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	9
นิยามและคำย่อ	11
รหัสวิธี	13
DMSc F 1042: การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ	15
DMSc F 1043: การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรท และซัลเฟตในน้ำ	21
DMSc F 1044: การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำ	27
DMSc F 1045: การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แคดเมียม โครเมียม ทองแดง แมงกานีส นิกเกิล สังกะสี และเงินในน้ำ	31
DMSc F 1046: การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ	35
DMSc F 1047: การวิเคราะห์ปริมาณใยอาหารทั้งหมดในอาหาร โดย Enzymatic-Gravimetric Method	39
DMSc F 1048: การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มในน้ำส้มสายชู โดยวิธี Titration	45
DMSc F 1049: การตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรดในซอสบางชนิด โดยวิธี Titration	49
DMSc F 1050: การวิเคราะห์ค่าของกรดในน้ำมันและไขมัน	53
DMSc F 1051: การวิเคราะห์ Phenolic Antioxidants ในน้ำมัน, ไขมัน และเนย	57
DMSc F 1052: การวิเคราะห์สารโพลาร์ในน้ำมันและไขมัน, โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	63
DMSc F 1053: การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมตในผักผลไม้	69
DMSc F 1054: การวิเคราะห์ปริมาณ 3-chloro-1, 2- propanediol (3-MCPD) ในอาหารและส่วนผสมอาหาร	77

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	85
นิยามและคำย่อ	87
รหัสวิธี	87
DMSc F 2015: วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในน้ำ และน้ำแข็งโดยวิธี MPN	89
DMSc F 2016: วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร	119
DMSc F 2017: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium botulinum</i> ในอาหาร	151
DMSc F 2018: วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ	161
DMSc F 2019: วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ชนิดที่มีความเป็นกรด	177
วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	191
รหัสวิธี	193
DMSc F 4001: การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี CTAB พื้นฐาน	195
DMSc F 4002: การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Basic silica method	201
DMSc F 4003: Qualitative endogenous gene testing: <i>lectin</i> (by means of Polymerase Chain Reaction)	207
DMSc F 4004: Qualitative endogenous gene testing: the chloroplast <i>trnL</i> intron (by means of Polymerase Chain Reaction)	215
DMSc F 4005: Qualitative endogenous gene testing: <i>Invertase</i> (by means of Polymerase Chain Reaction)	223
DMSc F 4006: Qualitative endogenous gene testing: <i>hmgA</i> (by means of real-time Polymerase Chain Reaction)	231

DMSc F4007:	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: CaMV-35S promoter (by means of Polymerase Chain Reaction)	239
DMSc F 4008:	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA : NOS-terminator (by means of Polymerase Chain Reaction)	247
DMSc F 4009:	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: nptII (by means of Polymerase Chain Reaction)	255
ภาคผนวก		
	รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1	263
	รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2	265

วิธีมาตรฐานทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. นางสาวจารุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล | ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร |
| 2. นางกนกพร อธิสุข | ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหาร
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) |
| 3. นางนิภารัตน์ ลักษณ์สมยา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางสาวสุวรรณี ชีรภาพธรรมกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางกัญญา พุกสุ่น | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 6. นางสาวปุษยา แสงวิรุฬห์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 7. นางสาวจิตผกา สันทัดรบ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 8. นางสาวอรุณี ดนุศล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 9. นางสาวกรรณิกา จิตติยศรา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |



นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. “H₂O” หมายถึง น้ำกลั่น (distilled water) ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ
2. สารเคมี (reagents) ทั้งหมดเป็น reagent grade ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ
3. กรด และด่าง หมายถึง กรด และด่าง ที่มีความเข้มข้นดังในตาราง ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ

ความเข้มข้น	
Sulfuric acid	95.0-98.0% H ₂ SO ₄
Hydrochloric acid	36.5-38.0% HCl
Nitric acid	69.0-71.0% HNO ₃
Fuming nitric acid	≥ 90% HNO ₃
Acetic acid	≥ 99.7% CH ₃ COOH
Hydrobromic acid	47.0-49.0% HBr
Ammonium hydroxide	28-30% NH ₃
Phosphoric acid	≥ 85% H ₃ PO ₄

4. การใช้สัญลักษณ์ (ตัวเลข + ตัวเลข) หลังชื่อของสารเคมี เช่น HCl (1+2) หมายถึง สารผสมระหว่าง HCl 1 หน่วยปริมาตร กับ H₂O2 หน่วยปริมาตร
5. คำย่อที่ใช้ และคำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
AAS	Atomic absorption spectrometer
Ac	acetyl, CH ₃ CO-
diam.	diameter
FAAS	Flame atomic absorption spectrophotometer
g	gram
g	gravity in centrifuging
GC	Gas Chromatograph
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer
HPLC	High performance liquid chromatograph
hr	hour
id	inner diameter or dimension



Abbreviation	Word/คำเต็ม
kg	kilogram
L	liter
LC	Liquid Chromatograph
m	Meter, milli – as prefix
M	Molar
Me	Methyl, CH ₃ .
MeOH	Methanol, CH ₃ OH
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
MS	Mass spectrometer
MW	molecular weight
MΩ	megaohm
N	Normal
ng	nanogram
-OAc	acetate
-OCN	cyanate
od	outer diameter or dimension
ppm	part per million
ppb	part per billion
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
wt	Weight
μg	Microgram (10 ⁻⁶ g)
μL	Microliter (10 ⁻⁶ L)
μm	Micron, micrometer (10 ⁻⁶ m)
/	per
%	percent
>	more than
<	less than
≥	equal to and more than
≤	equal to and less than



วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F1042	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่างๆ ยกเว้นน้ำเสีย	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	I	15
DMSc F 1043	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย	ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรท และซัลเฟต	I	21
DMSc F 1044	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย	ตะกั่ว	I	27
DMSc F 1045	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้น น้ำเสีย	เหล็ก แคดเมียม โครเมียม ทองแดง แมงกานีส นิกเกิล สังกะสี และเงิน	I	31



รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1046	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย	สารหนู	I	35
DMSc F 1047	อาหาร	ใยอาหารทั้งหมด	I	39
DMSc F 1048	น้ำส้มสายชู	กรดน้ำส้ม	I	45
DMSc F 1049	ซอส	ความเป็นกรด	I	49
DMSc F 1050	น้ำมันและไขมัน	ค่าของกรด	I	53
DMSc F 1051	น้ำมัน ไขมัน และเนย	Phenolic Antioxidants	I	57
DMSc F 1052	น้ำมันและไขมัน	สารโพลาร์	I	63
DMSc F 1053	ผัก ผลไม้	สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมต	II	69
DMSc F 1054	อาหาร	3-chloro-1, 2- propanediol (3-MCPD)	II	77



DMSc F 1042: การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ
pH value of water

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) ของน้ำหรือสารละลายที่เป็น aqueous solution

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012. p. 4-91 to 4-96.

3. หลักการ (Principle)

การวัด pH คือการวัดสภาพความเป็นกรดหรือเป็นด่างของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย (aqueous solution) โดยการวัดความต่างศักย์ที่เกิดขึ้น (potential) ระหว่างอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode) กับอิเล็กโทรดตรวจวัด (sensing electrode) อิเล็กโทรดจะเปลี่ยนความต่างศักย์ที่เกิดจากไฮโดรเจนไอออน (ion potential) ให้เป็นความต่างศักย์ไฟฟ้า (electronic potential) แล้วขยายให้สูงขึ้น

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 pH meter
- 4.2 Combination pH electrode
- 4.3 ขวดพลาสติก

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 สารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH 4.00, 7.00 และ 10.00
- 5.2 สารละลาย 3 M KCl



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างน้ำ : สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง : สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.3 บรรจุน้ำที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันลงในขวดพลาสติกตัวอย่างละ 2 ขวด วัด pH ได้ทันทีเมื่ออุณหภูมิเท่ากับ $25 \pm 1^\circ\text{C}$

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 สร้าง calibration curve ที่ pH 4.0, 7.0 และ pH 7.0, 10.0 บันทึกค่า slope
- 7.2 จุ่ม electrode ในขวดที่ 1 กวนเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ยก electrode ขึ้น ซับให้แห้ง
- 7.3 จุ่ม electrode ในขวดที่ 2 อ่านค่า pH โดยกด read รอจนเครื่องอ่านค่า (หยุดนิ่ง)
- 7.4 ล้าง electrode ด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษเนื้อนุ่ม
- 7.5 ในกรณีที่ค่าไม่หยุดนิ่งให้เตรียมตัวอย่างใหม่ 4 ขวด จุ่ม electrode ในขวดที่ 1, 2, 3 และ 4 และอ่านค่าของขวดที่ 4

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

รายงานค่าความเป็นกรด-ด่าง ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบ accuracy โดยวัดสารละลายบัฟเฟอร์จาก difference source ความแตกต่างจากค่าจริง ไม่เกิน 0.1 pH unit
- 9.2 วัด 2 ซ้ำ (duplicate) ทุก 10 ตัวอย่าง (กรณีน้อยกว่า 10 ตัวอย่าง ให้วัด duplicate 1 ชุด) โดยวัดแบบ random เพื่อตรวจสอบค่า precision โดยค่า precision ไม่เกิน 0.1 pH unit
- 9.3 ตัวอย่างที่ผลการวัดไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานต้องทำการวัดซ้ำโดยนำตัวอย่างใหม่มาวัด (new portion) เพื่อยืนยันผล โดยค่า precision ต้องไม่เกิน 0.1 pH unit รายงานค่าแรกถ้าเกิน 0.1 ให้ calibrate เครื่องใหม่และใช้ตัวอย่างใหม่



10. รายละเอียดอื่น

อ้างอิงจากแนวทางการตรวจสอบและสอบเทียบเครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อการรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มกราคม 2557 หน้า 56-58

10.1 การตรวจสอบทุกครั้งที่ใช้งาน–การตรวจสอบสภาพของ electrode เกณฑ์ยอมรับ relative slope $\geq 95\%$ โดย

10.1.1 ปรับเครื่องให้พร้อมทำงานด้วย working standard buffer 7.0 และ 4.0

10.1.2 วัดค่า Potential และอุณหภูมิของสารละลาย working standard buffer 4.0 และ 7.0

10.1.3 คำนวณค่า measures slope และ relative slope

$$\text{Measured slope} = \frac{\text{potential difference}}{\text{pH difference}}$$

$$\text{Relative slope} = \frac{\text{Measured slope} \times 100}{\text{Theoretical slope}}$$

$$\text{Theoretical slope ที่ } 25^{\circ}\text{C} = 59.13 \text{ mV/pH}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

Working standard buffer (value)	Read value	
	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	mV
4.01	25	175.00
7.00	25	5.00

$$\text{Relative slope} = \frac{[(175-5)/3] \times 100}{59.6} = 95.18\%$$



10.2 การบำรุงรักษา

- 10.2.1 เลือกชนิด electrode ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง
- 10.2.2 วิธีล้าง electrode ให้แช่ในสารละลาย 0.1M HCl หรือ 0.1M HNO₃ นาน 30 min และเก็บโดยแช่ในสารละลาย 3M KCl
- 10.2.3 กรณีใช้ electrode ใหม่ที่ไม่เคยใช้งานให้ปฏิบัติดังนี้
 - 10.2.3.1 แช่ electrode ใน H₂O ทิ้งไว้ 24 hr
 - 10.2.3.2 เปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 5-10 min หรือตามที่กำหนดในคู่มือ
 - 10.2.3.3 ติดตั้ง electrode ล้างให้สะอาดด้วย H₂O และซับให้แห้งด้วยกระดาษนุ่ม ตั่งอุณหภูมิตามที่กำหนดบนขวดสารละลาย buffer ที่เลือกใช้
 - 10.2.3.4 จุ่ม electrode ในสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH 7.0 กรณีใช้เครื่องที่มี probe วัดอุณหภูมิให้จุ่ม probe นั้นในสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ด้วย
 - 10.2.3.5 ปรับปุ่มปรับเทียบ (calibrate) ให้ได้ค่า pH 7.0
 - 10.2.3.6 ล้าง electrode ให้สะอาดด้วย H₂O และซับให้แห้งด้วยกระดาษนุ่ม จุ่ม electrode ในสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH 4.0 หรือ pH 9.0 ปรับปุ่ม slope ให้ได้ค่า pH ตามค่าของสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ ที่เลือกใช้
 - 10.2.3.7 ตรวจสอบอีกครั้งโดยเปลี่ยนสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ใหม่
- 10.2.4 ข้อควรระวังในการใช้ electrode เพื่อยืดอายุการใช้งาน
 - 10.2.4.1 กรณีหยุดใช้งานชั่วคราวในระยะสั้น สามารถแช่ electrode ใน H₂O หรือสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH 4.0 ให้กดปุ่ม standby และรักษาระดับสารละลายเกลือภายในให้สูงกว่าระดับน้ำข้างนอก ส่วนการเก็บ electrode ในระยะยาว ควรเก็บโดยแช่ในสารละลายชนิดเดียวกับที่บรรจุใน electrode
 - 10.2.4.2 ระวังไม่ให้มีฟองอากาศใน electrode ถ้าพบฟองอากาศให้เขย่าแรงๆ ตามแนวตั้งของ electrode เพื่อไล่ฟองอากาศนั้นออกทางด้านบน หรือเปลี่ยนสารละลายที่บรรจุใน electrode ใหม่
 - 10.2.4.3 ค่า pH แกว่งตลอดเวลา แสดงว่าอาจมีคราบไขมันหรือโปรตีนเคลือบที่ผิว electrode ให้เช็ดออกเบา ๆ ด้วยสลิหรือผ้านุ่มชุบ acetone หรือ alcohol และแช่ electrode ใน H₂O ทิ้งไว้สักครู่



- 10.2.4.4 ห้ามทำความสะอาด electrode ในอ่างน้ำความถี่สูง (ultrasonic bath) เพราะแรงสั่นสะเทือนจะทำลายโครงสร้างภายในของ electrode
- 10.2.4.5 ควรเปลี่ยนสารละลาย KCl บ่อย ๆ เพื่อป้องกันผลจากการรบกวนด้วยสารปนอื่น ๆ จึงควรเลือกใช้ KCl ที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก ในกรณีที่พบว่ามีการปนเจือปนมากควรใช้ล้าง H_2O ภายใน electrode หลาย ๆ ครั้ง
- 10.2.4.6 เปิดช่องระบายอากาศตอนบน electrode เมื่อวัด pH และปิดช่องนี้เมื่อเลิกใช้งาน
- 10.2.4.7 ขวดสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์เมื่อเลิกใช้แล้วควรปิดขวดให้แน่น เพื่อป้องกันไม่ให้สัมผัสกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และป้องกันเชื้อรา หากพบว่ามีการขึ้นห้ามใช้เด็ดขาด นอกจากนี้สารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ที่ใช้แล้วหรือเทออกจากขวดแล้ว ห้ามเทกลับลงในขวดอีก



**DMSc F 1043: การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรท และซัลเฟต
ในน้ำ**
**Determination of fluoride, chloride, nitrate and sulfate
in water**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ (Fluoride; F^-) คลอไรด์ (Chloride; Cl^-) ไนเตรท (Nitrate; NO_3^-) และซัลเฟต (Sulfate; SO_4^{2-}) ในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย โดย Ion Chromatograph (IC)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012. p. 4-5 to 4-7.

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างน้ำซึ่งผ่านการกรองอนุภาคที่ใหญ่กว่า $0.45 \mu m$ เมื่อนำมาฉีดเข้าไปในเครื่อง IC สารละลาย eluent จะพาตัวอย่างเข้าไปใน column เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนภายใน column ไอออนแต่ละชนิดจะถูกแยกจากกันตามความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออน จากนั้นจะออกจาก column เข้าสู่ suppressor เพื่อลดค่า background เป็นการช่วยปรับให้สามารถตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าที่เกิดจากไอออนที่สนใจได้ดีขึ้น ขณะที่ค่าการนำไฟฟ้าที่เกิดจาก eluent จะลดลง ใน suppressor ไอออนที่แยกออกมาจะมีสภาพเป็นกรดเมื่อผ่านเข้าไปในเครื่องตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าจะเกิดสัญญาณซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น chromatogram กำหนดหาปริมาณของไอออนแต่ละชนิดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.2 Ion chromatograph - conductivity detector
- 4.3 Ultrasonic bath
- 4.4 Beaker



- 4.5 Micropipette ขนาด 50, 100, 200, 500 และ 1,000 μl
- 4.6 Membrane filter ขนาด 0.45 μm
- 4.7 Volumetric flask ขนาด 10, 50 ml และ 1L
- 4.8 Syringe พลาสติกขนาด 10 ml

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

5.1 สารมาตรฐาน (Standards)

5.1.1 สารละลายมาตรฐาน F^- 1,000 mg/L

5.1.2 สารละลายมาตรฐาน Cl^- 1,000 mg/L

5.1.3 สารละลายมาตรฐาน NO_3^- 1,000 mg/L

5.1.4 สารละลายมาตรฐาน SO_4^{2-} 1,000 mg/L

5.1.5 intermediate standard solution F^- 100 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน F^- ตั้งคั่น ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.1.6 working standard solution:

5.1.6.1 working standard solution F^- ความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 mg/L: ปิ่เปิด intermediate standard solution F^- 100 mg/L ปริมาตร 200, 400, 600 และ 800 μl ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.1.6.2 working standard solution Cl^- ความเข้มข้น 1.0, 10, 20 และ 40 mg/L: ปิ่เปิด intermediate standard solution Cl^- 1,000 mg/L ปริมาตร 50, 500, 1,000 และ 2,000 μl ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.1.6.3 working standard solution NO_3^- ความเข้มข้น 0.23, 0.9, 1.8 และ 2.7 mg/L: ปิ่เปิด intermediate standard solution NO_3^- 1,000 mg/L ปริมาตร 50, 200, 400 และ 600 μl ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O



- 5.1.6.4 working standard solution SO_4^{2-} ความเข้มข้น 1.0, 10, 20 และ 40 mg/L:
ปิเปต intermediate standard solution SO_4^{2-} 1,000 mg/L ปริมาตร 50, 500,
1,000 และ 2,000 μl ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml เจือจาง
และปรับปริมาตรด้วย H_2O

สามารถปิเปตปริมาตรสารละลายมาตรฐานลงใน volumetric flask ให้ได้ช่วงความเข้มข้นอื่น
ที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์

- 5.2 eluent 12 mM NaOH: ปิเปต 50% w/w NaOH 630 μl ลงใน volumetric flask
ขนาด 1 L เจือจางด้วย H_2O ปรับปริมาตร และ degas ใน ultrasonic bath ก่อนนำไปใช้
(เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน) สามารถเลือก eluent ชนิดอื่น ๆ ให้เหมาะสมกับชนิด column
ที่เลือกใช้ เช่น สารละลายผสม sodium bicarbonate-sodium carbonate

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างน้ำ: สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง: สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
6.3 เทตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันใส่ beaker ดูดด้วย syringe กรองผ่าน membrane filter
ขนาด 0.45 μm ลงในหลอดพลาสติกของเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ แล้วฉีดเข้าเครื่อง IC

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 สภาวะเครื่อง IC

detector: total conductivity <10 μS

column: anion-exchange (analytical 4 × 250 mm, guard 4 50 mm)

eluent: 12 mM NaOH

injection volume: 50 μl

flow rate: 1 ml/min

เตรียมความพร้อมของเครื่อง IC ให้ eluent ไหลผ่าน column รอเครื่องทำงานตามสภาวะ
กำหนด baseline คงที่ประมาณ 30 นาที



7.2 ทดสอบ system suitability ของเครื่องก่อนใช้งาน

ฉีดสารละลายมาตรฐาน (mixed solution) 5 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 1 ระดับของ F^- , Cl^- , NO_3^- (คำนวณเป็น N) และ SO_4^{2-} เท่ากับ 2, 20, 1.8 และ 20 mg/L ตามลำดับ หรือความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการใช้งาน ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของแต่ละไอออน แสดงเป็น chromatogram คำนวณ %RSD ของ retention time และ peak area เกณฑ์ยอมรับ < 1.0 และ < 2.5 % ตามลำดับ

7.3 สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

7.3.1 ฉีด blank (น้ำ) ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน

7.3.2 ฉีด working standard solution ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายมาตรฐานแต่ละไอออน แสดงเป็น chromatogram

7.3.3 สร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละไอออนให้ peak area อยู่บนแกน y ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอยู่บนแกน x คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (correlation of determination; R^2) เกณฑ์ยอมรับ > 0.995

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ปริมาณแต่ละไอออน จากสูตร

$$\begin{aligned}
 C \text{ (mg/L)} &= A \times RF \times D \\
 \text{เมื่อ } A &= \text{peak area} \\
 RF \text{ (response factor)} &= \frac{\text{ความเข้มข้นสารมาตรฐาน}}{\text{peak area สารมาตรฐาน}} \\
 D &= \text{dilution factor}
 \end{aligned}$$

8.2 รายงานปริมาณแต่ละไอออน ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) เลขนัยสำคัญ 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 วิเคราะห์ control sample และ plot ลงใน quality control chart

9.2 ทุกชุดตัวอย่าง (ชุดละไม่เกิน 10 ตัวอย่าง) วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%



10. รายละเอียดอื่น

ข้อมูล Recovery และ repeatability

ไอออน	ปริมาณไอออน (mg/L)	% recovery	% RSD
F ⁻	0.20 - 1.6	91 - 102	1.1 - 4.2
Cl ⁻	1.0 - 40	94 - 102	0.4 - 2.6
NO ₃ ⁻ กำหนดเป็น N	0.23 - 2.3	96 - 107	0.7 - 3.1
SO ₄ ²⁻	1.0 - 40	98 - 103	0.4 - 3.5



DMSc F 1044:

การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำ

Determination of lead in water

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว (Lead; Pb) ในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย โดย graphite furnace atomic absorption spectrometer (GFAAS)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012. p. 3-28 to 3-33

3. หลักการ (Principle)

เทคนิค GFAAS เป็นการวัดแร่ธาตุที่มีปริมาณน้อยมาก (ระดับ ppb) โดยการให้ความร้อนจากกระแสไฟฟ้า (electrothermal) แก่ graphite furnace ซึ่งทนความร้อนได้สูงมาก การให้ความร้อนมี 3 ระดับ (หรือมากกว่า) ระดับแรก เป็นการทำให้ตัวอย่างน้ำบน graphite ระเหยแห้ง ระดับที่ 2 ความร้อนที่สูงขึ้นจะทำลาย organic matter และสารอื่นๆ ระดับที่ 3 ความร้อนที่สูงกว่าระดับที่ 2 จะทำให้ธาตุกลายเป็นอะตอมได้อย่างสมบูรณ์และการ absorb แสงจะดีขึ้น

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 GFAAS
- 4.2 Hot plate ชนิดปรับความร้อนได้
- 4.3 Beaker ขนาด 10, 25 และ 50 ml
- 4.4 Measuring pipette ขนาด 1 ml
- 4.5 Micropipette ขนาด 2-50 μ L พร้อม tip
- 4.6 Volumetric flask ขนาด 10 และ 100 ml
- 4.7 Volumetric pipette ขนาด 10 ml



5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega \cdot cm$

5.1 สารมาตรฐาน (Standards)

5.1.1 สารละลายมาตรฐาน Pb 1,000 mg/L

5.1.2 Intermediate standard solution 5 mg/L: เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน Pb 1,000 mg/L 200 เท่า ด้วย H_2O

5.1.3 Working standard solution: ให้ได้ช่วงความเข้มข้น 5, 10, 12, 15 และ 20 $\mu g/L$ (เตรียม standard 1 จุดโดยใช้ Intermediate standard solution เครื่องจะ automix)

5.2 HNO_3 65% (w/w)

5.3 HNO_3 0.5%: เจือจาง HNO_3 65% (w/w) 0.5 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างน้ำ: สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง: สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ปิเปตตัวอย่าง 10 ml ใส่ใน beaker ขนาด 25 ml

7.2 เติม 0.05 ml HNO_3 65% (w/w) (ประมาณ 2 หยด) digest บน hot plate ในตู้ดูดควัน (ระวังอย่าให้เดือด) จนปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 5 ml ทิ้งให้เย็น ถ่ายสารละลายตัวอย่าง ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ล้าง beaker ด้วย H_2O รวมน้ำล้างใน volumetric flask ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง ปรับปริมาตรด้วย H_2O และเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7.3 วิเคราะห์ blank และ spiked sample ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

7.4 วัดปริมาณ Pb ด้วย GFAAS

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

คำนวณปริมาณ Pb จากสูตร

$$C = (C_0 - C_B) \times F$$

เมื่อ

C	=	ความเข้มข้น Pb ในตัวอย่าง (mg/L)
C_0	=	ความเข้มข้น Pb ในสารละลายตัวอย่าง (mg/L)
C_B	=	ความเข้มข้น Pb ในสารละลาย method blank (mg/L)
F	=	dilution factor



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ก่อนสร้างกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ตามที่คู่มือของเครื่องกำหนด
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution 1 จุด หลังการวัด ตัวอย่างทุก 10 - 12 ตัวอย่าง
- 9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
- 9.4 วิเคราะห์ blank spiked เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์การยอมรับ (ตามตาราง)

QC ชนิดต่าง ๆ	เกณฑ์การยอมรับ
check standard	90 - 110%
spiked sample	ใช้ control chart ในการควบคุมคุณภาพ
duplicate analysis	% RPD $\leq$ 28

10. รายละเอียดอื่น

เก็บรักษาตัวอย่างใช้ HNO_3 ให้ pH < 2



DMSc F 1045:

**การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แคดเมียม โครเมียม ทองแดง
แมงกานีส นิกเกิล สังกะสี และเงิน ในน้ำ**

**Determination of iron, cadmium, chromium, copper,
manganese, nickel, zinc and silver in water**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณโลหะเหล็ก (Iron; Fe) แคดเมียม (Cadmium; Cd) โครเมียม (Chromium; Cr) ทองแดง (Copper; Cu) แมงกานีส (Manganese; Mn) นิกเกิล (Nickel; Ni) สังกะสี (Zinc; Zn) และเงิน (Silver; Ag) ในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย โดย flameatomic absorption spectrometer (FAAS)

2. เอกสารอ้างอิง (References)

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012. p. 3-25 to 3-28.

3. หลักการ (Principle)

เทคนิค AAS ในการหาปริมาณโลหะและแร่ธาตุ อาศัยหลักการใช้ความร้อนไปทำให้สารประกอบโลหะและแร่ธาตุเปลี่ยนเป็นอะตอม (atomization) อะตอมเหล่านี้จะดูดกลืนแสง (absorb) ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยค่า absorbance จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนอะตอม

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 Flame Atomic Absorption Spectrometer
- 4.2 Hot plate ชนิดปรับความร้อนได้
- 4.3 Beaker ขนาด 50, 250 ml
- 4.4 Measuring pipette ขนาด 2, 10 ml
- 4.5 Micropipette ขนาด 5-50, 50, 100, 200, 500 μ l พร้อม tip



4.6 Volumetric flask ขนาด 25, 50, 100 และ 1,000 ml

4.7 Volumetric pipette ขนาด 100 ml

4.8 กระดาษกรอง No.1 ขนาด 70 mm

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าและน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 HNO_3 65% (w/w)

5.2 HNO_3 1% : เจือจาง HNO_3 65% (w/w) 10 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 1 L

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

5.3.1 สารละลายมาตรฐาน Fe 1,000 mg/L

5.3.2 สารละลายมาตรฐาน Cd 1,000 mg/L

5.3.3 สารละลายมาตรฐาน Cr 1,000 mg/L

5.3.4 สารละลายมาตรฐาน Cu 1,000 mg/L

5.3.5 สารละลายมาตรฐาน Mn 1,000 mg/L

5.3.6 สารละลายมาตรฐาน Ni 1,000 mg/L

5.3.7 สารละลายมาตรฐาน Zn 1,000 mg/L

5.3.8 สารละลายมาตรฐาน Ag 1,000 mg/L

5.3.9 Intermediate standard solution 100 mg/L: เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 10 เท่า ด้วย H_2O

5.3.10 Working standard solution (mg/L) เจือจาง intermediate standard solution Fe, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn และ Ag ด้วย HNO_3 1% ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ให้ได้ช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่ต้องการวัด (ตามตาราง)

standard solution	ความเข้มข้นของ	
	working standard solution (mg/L)	ปริมาตรของ intermediate standard solution (μl)
Fe	0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8	25, 50, 100, 200 และ 400
Cd, Mn	0.02, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4	25, 50, 100, 150 และ 200
Cr, Cu, Ni, Zn, Ag	0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4	25, 50, 100, 150 และ 200



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างน้ำ : สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง : สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ปิเปตตัวอย่างมา 200 ml ใส่ใน beaker ขนาด 250 ml
- 7.2 เติม 2.0 ml HNO_3 65% (w/w) digest บน hot plate ในตู้ดูดควัน (ระวังอย่าให้เดือด) จนปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 10 ml
- 7.3 ทิ้งให้เย็น ถ่ายสารละลายตัวอย่าง ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ล้าง beaker ด้วย H_2O หลาย ๆ ครั้ง รวมน้ำล้างใน volumetric flask ปรับปริมาตร และเขย่าผสม ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (ถ้าตัวอย่างมีตะกอนต้องกรองก่อน)
- 7.4 วิเคราะห์ blank และ spiked sample ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
- 7.5 วัดปริมาณ Fe, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn และ Ag ด้วย FAAS

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

คำนวณปริมาณโลหะจากสูตร

$$\begin{aligned} C &= (C_0 - C_B) \times F \\ \text{เมื่อ } C &= \text{ความเข้มข้นของโลหะในตัวอย่าง (mg/L)} \\ C_0 &= \text{ความเข้มข้นของโลหะในสารละลายตัวอย่าง (mg/L)} \\ C_B &= \text{ความเข้มข้นของโลหะในสารละลาย method blank (mg/L)} \\ F &= \text{dilution factor} \end{aligned}$$

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of the results)

- 9.1 ก่อนสร้างกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ตามที่คู่มือของเครื่องกำหนด
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution 1 จุด หลังการวัดตัวอย่าง ทุก 10-12 ตัวอย่าง
- 9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
- 9.4 วิเคราะห์ blank spiked เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เหนือการยอมรับ (ตามตาราง)



QC ชนิดต่าง ๆ	เกณฑ์การยอมรับ
check standard	within + 20%
spiked sample	ใช้ control chart ในการควบคุมคุณภาพ
duplicate analysis	% RPD $\leq$ 20

10. รายละเอียดอื่น

เก็บรักษาตัวอย่างใช้ HNO_3 ให้ pH < 2



DMSc F 1046:

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ

Determination of arsenic in water

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารหนู (Arsenic; As) ในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ยกเว้นน้ำเสีย โดย hydride generation atomic absorption spectrometer (HGAAS)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012. p. 3-38 to 3-39.

3. หลักการ (Principle)

สารหนูที่อยู่ในรูป As^{3+} ในน้ำเมื่อทำปฏิกิริยากับ sodium borohydride ($NaBH_4$) ในสถานะที่เป็นกรดอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบไฮไดรด์ซึ่งอยู่ในรูปของแก๊ส (AsH_3) แก๊สนี้จะถูกแก๊สอาร์กอนพาไปยัง quartz cell ที่ร้อนเกิดการแตกตัวจนได้อะตอมอิสระ อะตอมเหล่านี้จะดูดกลืนแสงและถูกวัดปริมาณโดยเครื่อง AAS สารหนูที่อยู่ในรูป As^{5+} ต้องเปลี่ยนให้เป็น As^{3+} ด้วย KI และ ascorbic acid ก่อนทำปฏิกิริยากับ $NaBH_4$

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 HGAAS
- 4.2 Hot plate ชนิดปรับความร้อนได้
- 4.3 Beaker ขนาด 10, 50, 250 ml
- 4.4 Micropipette ขนาด 2-50, 20-100 μ l พร้อม tip
- 4.5 Volumetric flask ขนาด 25, 50, 100, 1000 ml
- 4.6 Volumetric pipette ขนาด 25 ml
- 4.7 ขวดแก้วสีชา หรือ volumetric flask สีชา



5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่า และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 HCl 37% (w/w)

5.2 1.5% HCl: เจือจาง HCl 37% (w/w) 15 ml ปรับปริมาตรเป็น 1 L

5.3 3% sodium borohydride solution ($NaBH_4$): ละลาย 3 g ใน 1% NaOH 100 ml

5.4 สารละลายผสมของ 5% KI และ 5% ascorbic acid: ละลาย KI 2.5 g และ ascorbic acid 2.5 g ใน volumetric flask ขนาด 50 ml เก็บใส่ขวดสีชาหรือที่มืด (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

5.5 สารมาตรฐาน (standards)

5.5.1 สารละลายมาตรฐาน As 1,000 mg/L

5.5.2 Intermediate standard solution 5 mg/L: เตรียมโดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน As 1,000 mg/L 200 เท่าด้วย H_2O

5.5.3 Working standard solution: 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 mg/L เตรียมโดยปิเปต intermediate standard solution 5 mg/L ปริมาตร 0, 10, 20, 40, 60 และ 80 μl ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 1.5% HCl

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างน้ำ: สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง: สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ปิเปตตัวอย่าง 25 ml ใส่ beaker ขนาด 50 ml ระเหยบน hot plate ในตู้ดูดควัน (ระวังอย่าให้เดือด) ให้เหลือประมาณ 10 ml ถ่ายใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml

7.2 เติม HCl 37% (w/w) 1 ml

7.3 เติมสารละลายผสมของ 5% KI และ 5% ascorbic acid 1 ml เก็บไว้ในที่มืดหรือขวดสีชาอย่างน้อย 30 min เพื่อรีดิวซ์ As^{5+} เป็น As^{3+} ปรับปริมาตรด้วย H_2O

7.4 วิเคราะห์ blank และ spiked sample ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

7.5 วัดปริมาณสารหนูด้วย HGAAS



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

คำนวณปริมาณ As จากสูตร

$$C = (C_0 - C_B) \times F$$

เมื่อ

$$C = \text{ความเข้มข้น As ในตัวอย่าง (mg/L)}$$

$$C_0 = \text{ความเข้มข้น As ในสารละลายตัวอย่าง (mg/L)}$$

$$C_B = \text{ความเข้มข้นของ As ในสารละลาย method blank (mg/L)}$$

$$F = \text{dilution factor}$$

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of the results)

- 9.1 ก่อนสร้างกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ตามที่คู่มือของเครื่องกำหนด
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution 1 จุด หลังการวัด ตัวอย่างทุก 10 - 12 ตัวอย่าง
- 9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวน ตัวอย่าง
- 9.4 วิเคราะห์ blank spiked เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์การยอมรับ (ตามตาราง)

QC ชนิดต่าง ๆ	เกณฑ์การยอมรับ
check standard	90 - 110 %
spike sample	ใช้ control chart ในการควบคุมคุณภาพ
duplicate analysis	% RPD $\leq$ 28

10. รายละเอียดอื่น

เก็บรักษาตัวอย่าง ใช้ HNO_3 ให้ได้ pH <2



DMSc F 1047: การวิเคราะห์ปริมาณใยอาหารทั้งหมดในอาหาร
โดย Enzymatic-Gravimetric Method
Determination of total dietary fiber in foods
by Enzymatic-Gravimetric Method

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณใยอาหารทั้งหมดในอาหาร โดย enzymatic – gravimetric method

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 985.29 Total Dietary Fiber in Foods. Codex-Adopted-AOAC Method

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างอาหารแห้ง 2 ชุต (portion) ถ้ามีปริมาณไขมันมากกว่า 10% ให้สกัดไขมันออกก่อน นำมา gelatinize ด้วย Termamyl (heat stable α -amylase) หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ protease และ amyloglucosidase เพื่อกำจัดโปรตีนและแป้ง เติม ethanol เพื่อตกตะกอน soluble dietary fiber กรองและล้างตะกอนที่ได้ หลังจากทำตะกอนให้แห้งชั่งน้ำหนัก นำตัวอย่าง ชุตที่ 1 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตัวอย่างชุตที่ 2 นำมาวิเคราะห์ปริมาณใยอาหาร ทั้งหมดคือ น้ำหนักตะกอนที่เหลือหลังจากที่หักน้ำหนักโปรตีนและเถ้าออก

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.2 ตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven)
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven)
- 4.4 ระบบสุญญากาศ (vacuum source) พร้อมชุดกรองสารละลายตัวอย่าง และภาชนะสำหรับ ใส่และย่อยตัวอย่าง (digestion flask)
- 4.5 เครื่องบดหรือปั่นตัวอย่าง
- 4.6 อ่างน้ำร้อนชนิดน้ำเดือด (boiling water bath) และชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบมีระบบเขย่า (thermostat shaking water bath) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 60°C



- 4.7 pH meter
- 4.8 เตาเผา (muffle furnace)
- 4.9 Fritted Crucible ขนาด 30 ml ทำด้วย borosilicate glass ที่ฐานมี filter Porosity No. 2 (Pyrex No. 32940, coarse, ASTM 40-60 μm หรือ Tecator part No. 1000-1001 standard crucible หรือเทียบเท่า) ก่อนใช้งานให้ทำความสะอาด และเผาที่ 525°C เป็นเวลา 1 hr ทิ้งให้เย็นลงประมาณ 130°C หรือต่ำกว่า แช่ crucible ในน้ำ และฉีดล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง
- 4.10 โถดูดความชื้นพร้อมสารดูดความชื้น (desiccator with desiccant)

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

- 5.1 Acetone
- 5.2 98% Ethanol (v/v) (technical grade)
- 5.3 8% Ethanol: เติม H_2O 207 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 1 L ปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol ผสมให้เข้ากัน (อาจเตรียมโดยผสม H_2O และ 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร)
- 5.4 Phosphate buffer 0.08 M, pH 6.0: ชั่ง sodium phosphate dibasic, anhydrous (Na_2HPO_4) 1.400 g (หรือ dihydrate 1.753 g) และ sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 9.68 g (หรือ dihydrate 10.94 g) ละลายด้วย H_2O 700 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L ตรวจสอบค่า pH ด้วย pH meter เก็บในขวดสีชาและไว้ในตู้เย็น
- 5.6 HCl 0.325 M: เจือจาง 1M HCl 325 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 1 L
- 5.7 NaOH 0.275 M: ชั่ง NaOH 11 g ละลายด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 1 L
- 5.8 Celite, acid-washed
- 5.9 เอนไซม์ 3 ชนิดได้แก่
 - 5.9.1 Termamyl solution (heat stable α -amylase) เก็บในตู้เย็น
 - 5.9.2 Protease เก็บในตู้เย็น
 - 5.9.3 Amyloglucosidase เก็บในตู้เย็นหรืออาจใช้ชุดเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (Sigma Chemical Co., Kit No. TDF-100 หรือเทียบเท่า) เก็บในตู้เย็น



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 เตรียมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยการบดตัวอย่างโดยใช้ cyclone mill หรือ mortar (กรรบด) แรงผ่านตะแกรงขนาด 0.3-0.5 mm
- 6.2 ชั่งตัวอย่าง 30 g อบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 70°C เวลา 18 ± 2 hr เก็บในภาชนะที่มีฝาปิด และเก็บใน desiccator จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหาร
- 6.3 ชั่งตัวอย่างที่อบแล้วมา 0.5-1 g จำนวน 2 ชุดในภาชนะย่อยตัวอย่าง (digestion flask) แต่ละชุดควรมีน้ำหนักต่างกัน ไม่เกิน 20 mg (ตัวอย่างที่มีไขมัน มากกว่า 10% และตัวอย่างอาหารผสม (mixed diet) ให้สกัดไขมันออกโดยใช้ petroleum ether สกัด 3 ครั้ง ครั้งละ 25 ml)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

ทุกครั้งที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างให้ทำ blank 2 ชุด ควบคู่ไปด้วยทุกครั้งเพื่อตรวจวัดปริมาณ residue ใน reagent ซึ่งมีผลต่อค่า dietary fiber ในตัวอย่าง

- 7.1 ชั่ง celite ประมาณ 0.5 g จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน fritted crucible ที่เตรียมไว้อบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 130°C จนได้น้ำหนักคงที่ (ประมาณ 2 hr) ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งและบันทึกน้ำหนัก
- 7.2 เติม phosphate buffer pH 6.0 (ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้) 50 ml ลงใน digestion flask ปรับ pH ของสารละลายตัวอย่างเป็น 6.0 ± 0.2 เขย่าเบาๆ ให้ตัวอย่างกระจายสม่ำเสมอ
- 7.3 เติม Termamyl solution (heat stable α - amylase) 0.1 ml (100 μl) แล้วปิด flask ด้วย aluminium foil
- 7.4 บ่มตัวอย่างโดยนำ digestion flask ตั้งในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 min โดยเริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของสารละลายใน digestion flask ถึง $95-100^{\circ}\text{C}$ (โดยปกติจะใช้เวลาในการบ่มทั้งหมดไม่เกิน 30 min ในระหว่างการบ่มให้เปิดระบบเขย่า digestion flask เบา ๆ ทุก ๆ 5 min
- 7.5 ทิ้งให้ digestion flask เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง และนำมาปรับ pH ให้เป็น 7.5 ± 0.2 โดยเติมสารละลาย 0.275 N NaOH 10 ml
- 7.6 เติม protease 5 mg แต่เนื่องจาก protease ที่ใช้มีลักษณะเป็นผงและมักจะติดอยู่ที่ spatula ดังนั้น จึงเตรียมเป็นสารละลาย โดยชั่ง protease 50 mg ใส่ใน phosphate buffer 1 ml แล้วจึงปิเปตมา 0.1 ml ใส่ใน digestion flask นิดล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างภาชนะด้วยน้ำกลั่น ปิด flask ด้วย aluminium foil



- 7.7 บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิแบบมีระบบแช่อย่างต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 min (เริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของสารละลายข้างใน digestion flask ถึง 60°C) เปิดระบบแช่อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการบ่ม
- 7.8 ทิ้งให้สารละลายตัวอย่างใน digestion flask เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4 - 4.6 โดยเติม 0.325 M HCl ประมาณ 10 ml
- 7.9 เติมสารละลาย amyloglucosidase 0.3 ml นิดล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างภาชนะด้วยน้ำกลั่น แล้วปิด flask ด้วย aluminium foil
- 7.10 บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิแบบมีระบบแช่อย่างต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 min (เริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของสารละลายใน digestion flask ถึงอุณหภูมิ 60°C) เปิดระบบแช่อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการบ่ม
- 7.11 เติม 95% ethanol ซึ่งอุ่นไว้แล้วที่ 60°C ปริมาตร 280 ml หรือประมาณ 4 เท่าของปริมาตรของสารละลาย ตัวอย่าง (วัดปริมาตรก่อนนำไปอุ่นที่ 60°C) ใส่ใน digestion flask ทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 1 hr
- 7.12 นำ crucible และ celite ที่ซั่งไว้แล้วในข้อ 7.1 มาทำให้ celite เรียบ ติดกับฐานของ crucible ด้วย 78% ethanol 10 ml โดยใช้ขวดฉีด (wash bottle) ลงบน celite เปิดระบบกรองสุญญากาศ
- 7.13 กรองสารละลายตัวอย่างใน digestion flask ที่ผ่านการตกตะกอนแล้วในข้อ 7.11 ลงใน crucible ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.12 ล้างตะกอนด้วย 78% ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 20 ml, 95% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 10 ml และ acetone 2 ครั้ง ครั้งละ 10 ml ครั้งแรกของการล้างให้นิดล้างด้านข้างของ digestion flask เพื่อให้ residue ที่ติดอยู่ลงไป ใน crucible ให้หมด
- 7.14 อบ crucible ที่มี celite และ residue ที่ได้จากข้อ 7.13 ในตู้อบร้อนอุณหภูมิ 105°C หรือในตู้อบสุญญากาศอุณหภูมิ 70°C ค้างคืน (ประมาณ 18 hr) แล้วทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งและบันทึกน้ำหนัก
- 7.15 นำ residue ชุดที่หนึ่ง มาหาปริมาณโปรตีนที่เหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์ (indigestible protein) โดยชูดึง celite และ residue ใส่ลงในหลอดย่อยตัวอย่างขนาด 250 ml แล้ววิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน residue โดยวิธี Kjeldahl
- 7.16 นำ residue ชุดที่สองหาปริมาณเถ้าโดยนำมาเผาในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 525°C เป็นเวลา 5 hr แล้วทิ้งให้ crucible เย็นลงต่ำกว่า 250°C แล้วจึงนำออกจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)



8. การคำนวณและรายงานผล (Calculation and expression of results)

การหาค่า Blank

$$\begin{aligned} B &= \text{Blank (g)} = RB - PB - AB \\ \text{เมื่อ } RB &= \text{ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก residue ของ blank 2 ชุด (g)} \\ PB &= \text{น้ำหนักของโปรตีนใน residue ของ blank ชุดที่นำมาหาโปรตีน (g)} \\ AB &= \text{น้ำหนักของเถ้าใน residue ของ blank ชุดที่นำมาหาเถ้า (g)} \end{aligned}$$

$$\text{Total Dietary Fiber, \%} = [(R - P - A - B) \times 100] / W$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } R &= \text{ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก residue ของตัวอย่าง 2 ชุด (g)} \\ P &= \text{น้ำหนักโปรตีนใน residue ของตัวอย่าง ชุดที่นำมาหาโปรตีน (g)} \\ A &= \text{น้ำหนักเถ้าใน residue ของตัวอย่างชุดที่นำมาหาเถ้า (g)} \\ B &= \text{น้ำหนัก blank (g)} \\ W &= \text{ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวอย่าง 2 ชุด (คำนวณเป็นน้ำหนักตัวอย่างที่ยังไม่อบแห้ง) (g)} \end{aligned}$$

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the Quality of Test Results)

9.1 วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง

9.2 ทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (enzyme purity) โดยทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ทุก lot ของเอนไซม์ หรือทุก 6 เดือน โดยใช้ตัวอย่างดังแสดงในตาราง

Test samples for enzyme purity

Test sample	Activity tested	Test portion weight, g	Expected recovery, %
Citrus pectin	Pectinase	0.1	95-100
Stractan (larch gum)	Hemicellulase	0.1	95-100
Wheat starch	Amylase	1.0	0-1
Corn starch	Amylase	1.0	0-2
Casein	Protease	0.3	0-2
β -Glucan (barley gum) ^a	β -Glucanase	0.1	95-100

^aSigma Chemical Co. or Megazyme International Ireland, Ltd.

10. รายละเอียดอื่น

ไม่ฉีดล้าง acetone ลงใน digestion flask ซึ่งทำด้วยพลาสติก เพราะ acetone มีฤทธิ์กัดกร่อนพลาสติก จะทำให้ภาชนะเสียหายได้



DMSc F 1048:

**การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มในน้ำส้มสายชู
โดยวิธี Titration**

Determination of acetic acid in vinegar by titration

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มในน้ำส้มสายชู

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 930.35 Vinegars (1) J. Total Acids and K. Nonvolatile Acids

3. หลักการ (Principle)

ปริมาณกรดน้ำส้ม หาได้โดยไทเทรตโดยตรงกับสารละลายมาตรฐาน NaOH โดยใช้ phenolphthalein เป็น indicator

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่อง Potentiometer

4.1.1 Compact titrator: 716 DMS titrino

4.1.2 Magnetic swing-out stirrer: 728 Stirrer

4.1.3 Electrode: combined pH glass electrode

4.1.4 Exchange unit

4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 Beaker ขนาด 10 และ 100 ml

4.5 Burette ขนาด 50 ml

4.6 Cylinder ขนาด 100 ml

4.7 Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 ml

4.8 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 200 ml

4.9 Pipette ขนาด 10, 25 และ 50 ml

4.10 Volumetric flask ขนาด 100, 250 และ 1,000 ml



5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าหรือดีกว่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำกลั่นปราศจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

5.1 1 M NaOH: ชั่ง NaOH 40 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml ละลายด้วย H_2O แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1000 ml และปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2 0.5 M NaOH: ปิเปต 1 M NaOH 50 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.3 0.1 M NaOH: ปิเปต 1 M NaOH 25 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 250 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.4 Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$), KHP: primary standard (ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ $105^\circ C$ นาน 2 hr)

5.5 95% Ethanol

5.6 Phenolphthalein TS: ชั่ง phenolphthalein 1 g ลงใน beaker ขนาด 10 ml ละลายด้วย 95% ethanol แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol

5.7 สารละลายมาตรฐาน 1M NaOH

Standardization: ชั่ง KHP 5 g (ทราบน้ำหนักแน่นอน, W) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml เติมน้ำ H_2O 75 ml เขย่าให้ละลาย แล้วไทเทรตด้วย 1 M NaOH โดยใช้เครื่อง potentiometer หรือ หยด phenolphthalein TS 1 - 2 หยด แล้วไทเทรตโดยใช้ burette ขนาด 50 ml จนถึงจุดยุติจะได้สารละลายสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรที่ใช้ (V)

$$NaOH (M) = \frac{W \times 1000}{V \times 204.223}$$

เมื่อ W = น้ำหนักของ KHP (g)
V = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ml)

5.8 Standard buffer pH 4, 7 และ 10

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างประมาณ 2 - 3 หน่วยบรรจุ เทผสมลงในภาชนะที่สะอาดให้ได้ตัวอย่างประมาณ 200 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 ตรวจสอบเครื่อง potentiometer ก่อนใช้งาน

7.1.1 ทำการตรวจสอบ electrode โดยใช้ standard buffer 4, 7 และ 10

7.1.2 ล้าง electrode ประมาณ 2 - 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่น

7.1.3 จุ่ม electrode ลงในน้ำกลั่นให้อ่านค่าได้ประมาณ pH6

7.2 Total acids

7.2.1 ปิเปตตัวอย่าง 10 ml ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml

7.2.2 เติม H_2O 40 ml หยด phenolphthalein TS ประมาณ 2 - 3 หยด แล้วไทเทรตด้วย 0.5 M NaOH โดยใช้ burette ขนาด 50 ml จนถึงจุดยุติ (บันทึกปริมาตรที่ใช้เป็น V1)

7.3 Nonvolatile acids

7.3.1 ปิเปตตัวอย่าง 10 ml ลงใน evaporated dish ขนาด 200 ml

7.3.2 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งบน water bath

7.3.3 เติม H_2O ประมาณ 5-10 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งบน water bath ดำเนินการซ้ำอีกอย่างน้อย 5 ครั้ง

7.3.4 ละลาย residue ด้วย H_2O ประมาณ 200 ml แล้วถ่ายลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml หยด phenolphthalein TS ประมาณ 2 - 3 หยด

7.3.5 ไทเทรตด้วย 0.1 M NaOH (บันทึกปริมาตรที่ใช้เป็น V2)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กรณีสัมสายชูเทียม

ปริมาณกรดน้ำส้ม (g/100 ml) คำนวณได้จาก Total acids = $V1 \times \text{molarity of NaOH} \times 0.6$

8.2 กรณีสัมสายชูหมักหรือกลั่น

ปริมาณกรดน้ำส้ม (g/100 ml) คำนวณได้จาก Total acids – Nonvolatile acids

Nonvolatile acids (g/100 ml) = $V2 \times \text{molarity of NaOH} \times 0.6$

8.3 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณกรดน้ำส้มในหน่วย g/100 ml ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทำการวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง



DMSc F 1049: การตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรดในซอสบางชนิด
โดยวิธี Titration
Determination of acidity in sauce by titration

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรดในซอสบางชนิด (ซอสพริก ซอสมะเขือเทศ ซอสมะละกอ หรือซอสเผิง)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 942.15 Acidity (Titratable) of Fruit Products B. Glass Electrode Method

3. หลักการ (Principle)

ความเป็นกรดหาได้โดยไทเทรตโดยตรงกับสารละลายมาตรฐาน NaOH โดยใช้เครื่อง potentiometer

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่อง Potentiometer

4.1.1 Compact titrator: 716 DMS titrino

4.1.2 Magnetic swing-out stirrer: 728 Stirrer

4.1.3 Electrode: combined pH glass electrode

4.1.4 Exchange unit

4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.3 Beaker ขนาด 10 และ 100 ml

4.4 Burette ขนาด 50 ml

4.5 Cylinder ขนาด 100 ml

4.6 Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml

4.7 Pipette ขนาด 10, 25 และ 50 ml

4.8 Volumetric flask ขนาด 100, 250 และ 1,000 ml



5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าหรือดีกว่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำกลั่นปราศจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

5.1 1 M NaOH: ชั่ง NaOH 40 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml ละลายด้วย H_2O แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1000 ml และปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2 0.5 M NaOH: ปิเปต 1 M NaOH 50 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.3 Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$) KHP: primary standard (ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ $105^\circ C$ นาน 2 hr)

5.4 95% Ethanol

5.5 Phenolphthalein TS: ชั่ง phenolphthalein 1 g ลงใน beaker ขนาด 10 ml ละลายด้วย 95% 95% ethanol แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วย ethanol 95%

5.6 สารละลายมาตรฐาน 1 M sodium hydroxide

Standardization: ชั่ง KHP 5g (ทราบน้ำหนักแน่นอน, W) ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 ml เติม H_2O 75 ml เขย่าให้ละลาย แล้วไทเทรตด้วย 1 M NaOH โดยใช้เครื่อง potentiometer หรือหยด phenolphthalein TS 1 - 2 หยด แล้วไทเทรตโดยใช้ burette ขนาด 50 ml จนถึงจุดยุติจะได้สารละลายสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรที่ใช้ (V)

$$NaOH (M) = \frac{W \times 1000}{V \times 204.223}$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } W &= \text{น้ำหนักของ KHP (g)} \\ V &= \text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ml)} \end{aligned}$$

5.7 Standard buffer pH 4, 7 และ 10

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างประมาณ 2 - 3 หน่วยบรรจุ เทผสมลงในภาชนะที่สะอาดให้ได้ตัวอย่างประมาณ 200 ml คนหรือกวนจนตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 7.1 ตรวจสอบเครื่อง potentiometer ก่อนใช้งาน
 - 7.1.1 ทำการตรวจสอบ electrode โดยใช้ standard buffer 4, 7 และ 10
 - 7.1.2 ล้าง electrode ประมาณ 2 - 3 ครั้งด้วย H_2O
 - 7.1.3 จุ่ม electrode ลงใน H_2O ให้อ่านค่าได้ประมาณ pH6
- 7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 - 20 g ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 ml
- 7.3 เติม H_2O 50 ml พร้อมเปิดเครื่อง magnetic swing-out stirrer เพื่อทำการกวนตัวอย่างด้วยความเร็วปานกลาง
- 7.4 จุ่ม electrode (4.1.3) ลงในตัวอย่าง
- 7.5 ทำการไทเทรตอย่างรวดเร็วโดยการสั่งให้เครื่องปล่อย 0.1 M NaOH เพื่อให้อ่านค่าได้ประมาณ pH6
- 7.6 ค่อย ๆ ปล่อย 0.1 M NaOH อย่างช้า ๆ จนได้ประมาณ pH 7
- 7.7 ทำการไทเทรตจนถึงจุดยุติ ได้ pH ประมาณ 8.1 ± 0.2
- 7.8 บันทึกปริมาตรที่ใช้ (V1)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ความเป็นกรดคำนวณเป็นกรดอะซิดิก (%) =
$$\frac{V1 \times \text{molarity of NaOH} \times 0.006 \times 100}{\text{Weight of sample (g)} \times 0.1}$$

8.2 การรายงานผล

รายงานผลความเป็นกรดคำนวณเป็นกรดอะซิดิก หน่วยร้อยละโดยน้ำหนักทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ทำการตรวจสอบ electrode ทุกครั้งที่ใช้งาน โดยวัดค่า measured slope แล้วคำนวณหาค่า relative slope ซึ่งค่า relative slope ที่คำนวณได้ต้องไม่น้อยกว่า 95%
- 9.2 ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง



DMSc F 1050:

การวิเคราะห์ค่าของกรดในน้ำมันและไขมัน

Determination of Acid Value in Oils and Fats

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ค่าของกรดในน้ำมันและไขมันที่มาจากพืชและสัตว์และผลิตภัณฑ์จากน้ำมันและไขมัน แต่ไม่รวมถึงไข (waxes)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOCS Official Method Cd 3d-63 (Reapproved 2009), Acid value, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist Society (AOCS), 6th Edition 2009, Commercial Fats and Oils: Section C.

3. หลักการ (Principle)

ค่าของกรด (acid value) หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของ potassium hydroxide (KOH) ที่ทำปฏิกิริยาเป็นกลางพอดีกับกรดอิสระ (free acids) ในตัวอย่างน้ำหนัก 1 กรัม โดยจะต้องไม่มีกรดอิสระอื่นๆ นอกเหนือจากกรดไขมัน (fatty acids) ค่าของกรดอาจจะแสดงให้อยู่ในรูปของร้อยละกรดไขมันอิสระ (% free fatty acids) ด้วยการแปลงด้วยแฟกเตอร์ที่เหมาะสม

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.2 Burette ขนาด 10 ml ความละเอียดของสเกล 0.02 ml
- 4.3 Cylinder ขนาด 250, 500 และ 1,000 ml
- 4.4 Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml
- 4.5 Pipette ขนาด 5 ml
- 4.6 Volumetric flask ขนาด 100 และ 1 L
- 4.7 ขวดใส่สารละลายขนาด 2.5 และ 4 L



5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าหรือดีกว่า และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

5.1 สารละลายผสม toluene: isopropyl alcohol อัตราส่วน 1:1 (v/v)

5.2 1% phenolphthalein indicator: ละลาย phenolphthalein 1 g ด้วย isopropyl alcohol ปริมาตรเป็น 100 ml

5.3 สารละลายมาตรฐาน 0.1 M alcoholic KOH: ละลาย KOH น้ำหนักประมาณ 7 g ด้วย H_2O 20 ml คนให้ละลาย ถ่ายลง volumetric flask ปริมาตรครบ 1 L ด้วย 95% ethanol

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างน้ำมันโดยคว่ำภาชนะบรรจุน้ำมันขึ้น-ลงหลายครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างไขมันสุ่มตัวอย่างแล้วนำไปอุ่นร้อนอุณหภูมิประมาณ $40 - 50^\circ\text{C}$ ในเวลาสั้น ๆ ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจึงทำการวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 เติม phenolphthalein indicator 2 ml ลงในสารละลายผสม toluene: isopropyl alcohol 125 ml ทำให้เป็นกลางด้วย 0.1 M alcoholic KOH จนสารละลายเป็นสีชมพูอ่อน

7.2 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ตามตารางข้างล่าง) ลงใน flask โดยเริ่มต้นชั่งน้ำหนักที่ 20g เนื่องจากโดยปกติไขมันและไขมันจะมีค่าของกรดที่น้อย คือ มีค่าในช่วง 0 - 1.0 แต่ถ้าหากมีค่าที่เกินให้เลือกชั่งน้ำหนักตัวอย่างตามช่วงค่าของกรดนั้น ๆ

Acid value	น้ำหนักตัวอย่าง ($\pm 10\%$), g	ความแม่นยำของน้ำหนัก, $\pm$ g
0-1.0	20	0.05
1.1-4.0	10	0.02
4.1-15.0	2.5	0.01
15.1-75.0	0.5	0.001
>75	0.1	0.0002

7.3 เทสารผสม (7.1) ทั้งหมดลงใน flask ตัวอย่าง (7.2) แก้วจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7.4 ไตเตรตด้วย 0.1 M alcoholic KOH จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน $\geq 30 \text{ sec}$ บันทึกปริมาตร 0.1 M alcoholic KOH ที่ใช้



7.5 blank ใช้สารผสม (7.1) 125 ml

7.6 วิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ หากมีข้อสงสัยในผลการตรวจวิเคราะห์ให้ทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำทันทีเพื่อการยืนยันผล

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ค่าของกรด (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม)} = \frac{(A-B) \times M \times 56.1}{W}$$

M = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน 0.1 M alcoholic KOH (M)

A = ปริมาตรของ 0.1 M alcoholic KOH ที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายตัวอย่าง (ml)

B = ปริมาตรของ 0.1 M alcoholic KOH ที่ใช้ในการไตเตรท blank (ml)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

56.1 = กรัมต่อโมลของ KOH

8.2 รายงานปริมาณค่าของกรดด้วยค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ 2 ซ้ำในหน่วย มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test result)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

การรายงานค่าในรูปของกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ในรูปของ % lauric, % oleic หรือ % palmitic acid ให้คำนวณโดยการหารค่าของกรดที่ได้ด้วยแฟกเตอร์ 2.81, 1.99 หรือ 2.19 ตามลำดับ



DMSc F 1051: การวิเคราะห์ Phenolic Antioxidants ในน้ำมัน, ไขมัน และเนย
Determination of Phenolic Antioxidants in Oils, Fats and Butter Oil

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ phenolic antioxidants ได้แก่ propyl gallate (PG), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ), 2, 4, 5-trihydroxybutyrophenone (THBP), nordihydroguaiaretic acid (NDGA), 2,6-di-tert-butyl-4-hydromethylphenol, (Ionox-100), octyl gallate (OG) และ dodecyl gallate (DG) ในน้ำมันไขมันและเนย โดยเครื่อง HPLC

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 983.15 Phenolic Antioxidants in Oils, Fats, and Butter Oil Liquid Chromatographic Method.

3. หลักการ (Principle)

Phenolic antioxidants ถูกสกัดจากน้ำมันหรือไขมันด้วย acetonitrile จากนั้นระเหยสารที่สกัดได้ให้เกือบแห้ง แล้วปรับปริมาตรด้วยสารผสมของ acetonitrile และ 2-propanol ตรวจวัดปริมาณโดยเครื่อง HPLC

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 HPLC-UV detector หรือ diode array detector
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.001 กรัม และ 0.0001 กรัม
- 4.3 Rotary evaporator
- 4.4 Shaker
- 4.5 ชุดกรองสารละลาย (solvent clarification kit) และชุดกรองตัวอย่าง (sample clarification kit): membrane filter (Nylon, 0.45 μm , dia. 47 mm), syringe filter (Nylon, 0.45 μm , dia. 13 mm)
- 4.6 Beaker ขนาด 10 และ 50ml



- 4.7 Cylinder ขนาด 50, 250 และ 500 ml
- 4.8 Graduated tube ขนาด 10 ml
- 4.9 Glass dropper
- 4.10 Micropipette ขนาด 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l และ 1-5 ml
- 4.11 Luer-lock syringe ขนาด 10 ml
- 4.12 Round bottom flask ขนาด 500 ml
- 4.13 Separatory funnel ขนาด 125, 250, 500 และ 1 L
- 4.14 Volumetric flask ขนาด 5, 10, 20 และ 1 L
- 4.15 Volumetric pipette ขนาด 50 ml
(rinse เครื่องแก้วด้วย chloroform, acetone และ methanol ตามลำดับ)

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18\text{ M}\Omega\text{-cm}$

- 5.1 Acetone
- 5.2 Acetonitrile
- 5.3 Acetonitrile HPLC grade
- 5.4 Chloroform
- 5.5 Glacial acetic acid HPLC grade
- 5.6 n-Hexane
- 5.7 Methanol
- 5.8 Methanol HPLC grade
- 5.9 2-Propanol HPLC grade
- 5.10 H_2O HPLC grade
- 5.11 Saturated acetonitrile: เติม n-hexane 100 ml ลงใน separatory funnel ขนาด 1 L ที่มี acetonitrile 600 ml เขย่าอย่างแรง 2 min ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ใช้ชั้นล่าง (saturated acetonitrile)
- 5.12 Saturated n-hexane: เติม acetonitrile AR grade 25 ml ลงใน separatory funnel ขนาด 250 ml ที่มี n-hexane 150 ml เขย่าอย่างแรง 2 min ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ใช้ชั้นบน (saturated n-hexane)
- 5.13 สารละลายผสม acetonitrile + 2- propanol (1+1): ปิ่เปิด acetonitrile HPLC grade 50 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 2-propanol HPLC grade



5.14 5% acetic acid (mobile phase): ปิเปต glacial acetic acid HPLC grade 50 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 1 L ปรับปริมาตรด้วย H₂O HPLC grade แล้วกรองผ่าน membrane filter

5.15 สารมาตรฐาน: purity $\geq$ 95%

5.15.1 Stock standard solution (1,000 μ g/ml): ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 0.1000 g แยกใส่ beaker ขนาด 10 ml ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile + 2- propanol (1+1)

5.15.2 Intermediate mix standard solution (100 μ g/ml): ปิเปต 2 ml ของ stock standard solution ใส่ volumetric flask ขนาด 20 ml ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile + 2- propanol (1+1)

5.15.3 Working standard solution (0.5, 1, 5, 30 และ 50 μ g/ml): ปิเปต 25, 50, 250, 1,500 และ 2,500 μ l ของ intermediate mix standard solution แยกใส่ volumetric flask ขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile + 2- propanol (1+1)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

-

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่าง 5.000 ± 0.005 g ใน beaker ขนาด 50 ml ถ่ายใส่ separatory funnel ขนาด 125 ml โดยล้าง beaker ด้วย saturated n-hexane ปริมาตร 20 ml (ไขมันหรือเนยให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 40°C ก่อนนำไปชั่ง) สกัดด้วย saturated acetonitrile 50 ml (เขย่าอย่างแรง 2 min) ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้น acetonitrile (ชั้นล่าง) ลงใน separatory funnel ขนาด 250 ml

7.2 สกัดซ้ำด้วย saturated acetonitrile 50 ml อีก 2 ครั้ง เก็บ acetonitrile รวมใน separatory funnel เดิมตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้นน้ำมันที่อาจจะมีเหลือ (ชั้นล่าง) ทิ้งแล้วถ่าย acetonitrile ลงใน round bottom flask

7.3 ระเหยลดปริมาตร acetonitrile ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40°C จนเหลือประมาณ 2 - 3 ml (ไม่ควรใช้เวลาเกิน 15 min และกรณีวิเคราะห์ TBHQ ต้องระวังไม่ระเหยจนแห้ง)

7.4 ใช้ glass dropper ถ่าย acetonitrile ที่เหลือลงใน graduated tube ขนาด 10 ml ล้าง round bottom flask ด้วย acetonitrile ถ่ายลงรวมใน tube จนได้ 5 ml ล้างซ้ำด้วย 2-propanol จนครบปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วย syringe filter



- 7.5 นี๊ด working standard solution เข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง peak area และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
- 7.6 นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 7.4 นี๊ดเข้าเครื่อง HPLC แล้วหาปริมาณโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน
- 7.7 สภาวะเครื่อง HPLC
- Column: reverse phase C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm) หรือเทียบเท่า
- Detector: UV 280 nm
- Flow rate: 1.50 ml/min
- Injection volume: 20 μ l

Mobile phase แบบ Gradient

Time (min)	Acetonitrile (%)	Methanol (%)	5% acetic acid (%)
0	15	15	70
10	50	50	0
15	50	50	0
17	15	15	70
24	15	15	70

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 การคำนวณปริมาณ phenolic antioxidants (PG, BHA, BHT, TBHQ THBP, NDGA, Ionox-100, OG และ DG)

$$Cs \text{ (mg/kg)} = \frac{Co \times 10 \times D}{Wt}$$

- เมื่อ Co = ความเข้มข้นของ phenolic antioxidants ที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน (μ g/ml)
- Wt = น้ำหนักตัวอย่าง (g)
- D = dilution factor

- 8.2 รายงานปริมาณ phenolic antioxidants (PG, BHA, BHT, TBHQ THBP, NDGA, Ionox-100, OG และ DG) ที่พบในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC (system suitability) โดยนําสารมาตรฐานความเข้มข้น 5 µg/ml อย่างน้อย 5 ซ้ําคำนวณค่า % relative standard deviation (%RSD) ของ Retention time (RT) ไม่เกิน 2 และ % RSD ของ peak area ไม่เกิน 2.5
- 9.2 นําสารมาตรฐานอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้นเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานค่า $r^2 \geq 0.995$
- 9.3 นําสารมาตรฐานความเข้มข้น 5 µg/ml คั่นทุก 10 ตัวอย่างความเข้มข้นที่อ่านได้ไม่ควรเกิน 5 % จากความเข้มข้นของสารมาตรฐานข้อ 9.1
- 9.4 วิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ํ และ blank sample ที่เติมนําสารมาตรฐาน 10 mg/kg 2 ซ้ําคำนวณค่า % recovery อยู่ในช่วง 80 – 110 % และ % RPD ไม่เกิน 15%



DMSc F 1052: การวิเคราะห์สารโพลาร์ในน้ำมันและไขมันโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
Determination of Polar Compounds in Oils and Fats by Column Chromatography

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารโพลาร์ในน้ำมันและไขมันที่มาจากพืชและสัตว์รวมทั้งน้ำมันและไขมันปรุงอาหารที่ผ่านการทอด

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOCS Official Method Cd 20-91 (Reapproved 2009): Determination of Polar Compounds in Frying Fats. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist Society (AOCS), 6th Edition 2009, Commercial Fats and Oils: Section C.

3. หลักการ (Principle)

น้ำมันและไขมันปรุงอาหารที่ผ่านการทอดเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะถูกแยกออกเป็นสารโพลาร์ (polar compounds) และสารนอนโพลาร์ (non-polar compounds) และสารนอนโพลาร์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ปริมาณสารโพลาร์คำนวณได้จากน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นลบด้วยน้ำหนักสารนอนโพลาร์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.2 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.1 หรือ 0.01 g
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven)
- 4.4 อ่างน้ำร้อน (water bath)
- 4.5 เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator)
- 4.6 Beaker ขนาด 10, 100 และ 500 ml
- 4.7 Chromatographic glasscolumn ขนาด 21 mm id, ความยาวประมาณ 450 mm พร้อม teflon stopcock และ ground-glass joint



- 4.8 Cylinder ขนาด 100, 500 และ 1 L
- 4.9 Desiccator with silica gel
- 4.10 Dropping funnel ขนาด 100 หรือ 250 ml, ground-glass joint ขนาดที่สามารถต่อกับ column ได้
- 4.11 Flat bottom flask ขนาด 250 ml, ground neck
- 4.12 Glass funnel ขนาด 3.5 cm diam. และ 8 cm diam.
- 4.13 Glass rod ความยาวประมาณ 60 cm
- 4.14 Porcelain dish ขนาด 20 cm diam.
- 4.15 Round bottom flask ขนาด 250 ml, ground joint หรือ flask อื่นใช้ในการเตรียม silica gel
- 4.16 Separating funnel ขนาด 250 ml
- 4.17 Volumetric pipette ขนาด 20 และ 50 ml

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

- 5.1 Light petroleum ether (bp 40 - 60°C)
- 5.2 Diethyl ether
- 5.3 Elution solvent: ผสม petroleum ether และ diethyl ether อัตราส่วน 87/13 (v/v)
- 5.4 Sea sand (purified by acid and calcined)
- 5.5 Silica gel 60 ขนาด particle size 0.063 - 0.200 mm (70 - 230 mesh ASTM), MerckN 7734 หรือเทียบเท่า
- 5.6 Nitrogen (99.0 - 99.8%) หรือดีกว่า
- 5.7 Cotton wool หรือสำลีบริสุทธิ์
- 5.8 Hydrophobic filter paper

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ตัวอย่างน้ำมันหลังการสุ้มและผสมให้เข้ากันหากพบสิ่งเจือปนให้กรองออกก่อน ตัวอย่างที่มีน้ำเจือปนอยู่ให้กรองโดยใช้ hydrophobic filter paper และตัวอย่างที่อยู่ในรูปของแข็ง หรือ กึ่งแข็งกึ่งเหลวให้อุ่นร้อนพอหลอมเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิประมาณ 40 - 50°C รอให้เย็นที่ อุณหภูมิห้องก่อนชั่งน้ำหนัก



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 7.1 การเตรียม silica gel (5% H₂O): นำ silica gel ใส่ลงใน porcelain dish นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 160°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 4 hr เพื่อ activate silica gel ก่อนใช้งาน จากนั้นรอสilica gel ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องใน desiccator แล้วปรับ silica gel ให้มีความชื้นร้อยละ 5 โดยชั่ง silica gel 152 g ลงใน flask เติม H₂O 8 g แล้วเขย่าให้เข้ากันอย่างทั่วถึงเป็นเวลาประมาณ 30 min
- 7.2 การเตรียมคอลัมน์
 - 7.2.1 เติม elution solvent ประมาณ 30 ml ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยปิด stopcock แล้วนำสำลีสอดปลายคอลัมน์ โดยใช้แท่งแก้วยาวช่วยดันสำลีและไล่ฟองอากาศ
 - 7.2.2 ชั่ง silica gel (5% H₂O) 25 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติม elution solvent ประมาณ 80 ml เตรียมให้เป็น slurry
 - 7.2.3 เปิด stopcock ของคอลัมน์ ค่อย ๆ เท silica gel slurry ลงในคอลัมน์ ให้ elution solvent ออกมา ให้เหลือระดับเหนือ silica gel ประมาณ 10 cm
 - 7.2.4 เติม sea sand ประมาณ 4 g ลงในคอลัมน์แล้วเปิดให้ elution solvent ออกมาจนเหลืออยู่เหนือชั้นของ sea sand เล็กน้อย
- 7.3 การวิเคราะห์
 - 7.3.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก $2.4-2.6 \pm 0.001$ g ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml ละลายด้วย elution solvent 20 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน
 - 7.3.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 20 ml ลงในคอลัมน์ โดยระวังผิวหน้าของคอลัมน์ไม่ให้เกิดการฟุ้งกระจาย
 - 7.3.3 นำ Flat bottom flask ขนาด 250 ml ที่อบแห้งที่ $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 hr ทำให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนักแล้ว วางรองรับปลายคอลัมน์
 - 7.3.4 เปิด stopcock มีอัตราการไหลประมาณ 2.1-2.5 ml/min ให้เหลือสารละลายตัวอย่างอยู่เหนือผิวหน้าคอลัมน์เล็กน้อย และไม่ให้ silica gel แห้ง
 - 7.3.5 เท elution solvent ปริมาตร 150 ml ลงใน dropping funnel แล้วต่อเข้ากับ ground joint ด้านบนของคอลัมน์ แล้วค่อย ๆ เปิด stopcock ให้ elution solvent หยดลงในคอลัมน์เพื่อเป็นตัวชะสารนอนโพลาร์ให้ไหลออกจากคอลัมน์ลงไปรวมอยู่ใน flask โดยให้อัตราการไหลออกจากคอลัมน์อยู่ในช่วงประมาณ 2.1-2.5 ml/min หรือใช้เวลาในการชะรวมประมาณ 60-70 min
 - 7.3.6 หลังการชะเสร็จให้ล้างสารที่ติดอยู่ภายนอกปลายคอลัมน์ด้วย elution solvent อีกประมาณ 20 ml เก็บรวมใน flask เดิม (ถ้าต้องการวิเคราะห์สารโพลาร์ที่ถูก



ดูดซับบน silica gel ในคอลัมน์ สามารถชะออกด้วย diethyl ether ด้วยปริมาตร 150 ml ลงใน flask อีกใบหนึ่ง แล้วดำเนินการเช่นเดียวกับการทำในสารนอนโพลาร์ ขั้นตอนนี้เป็นทดสอบประสิทธิภาพการแยกส่วนของคอลัมน์)

- 7.3.7 นำ flask ไประเหย elution solvent ออกด้วย vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิของอ่างน้ำประมาณ 45°C หรือระเหยในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60°C ในตู้ดูดควัน จากนั้นเป่าไล่ตัวทำละลายที่เหลืออยู่ด้วยแก๊สไนโตรเจน เช็ดภายนอก flask ให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 103 ± 2°C เป็นเวลา 2 hr ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก อบซ้ำเป็นเวลา 1 hr จนน้ำหนักคงที่ (ไม่เกิน 0.001 g) นำค่าที่น้อยกว่าไปคำนวณหาปริมาณสารโพลาร์
- 7.3.8 วิเคราะห์ตัวอย่างละ 1 ซ้ำ ถ้าผลการตรวจวิเคราะห์น่าสงสัยให้วิเคราะห์อีก 1 ซ้ำ
- 7.3.9 วิเคราะห์ blank ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยไม่มีตัวอย่าง ค่าความแตกต่างระหว่าง flask เป่า กับ flask + residues ต้องมีค่าต่างกันไม่เกิน + 0.0005 g หากเกินจะต้องทบทวนสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด (ค่า blank ที่ได้ไม่ต้องนำไปใช้ในการคำนวณ)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{สารโพลาร์ (g/100 g)} = \frac{m - m_1 \times 100}{m}$$

m = น้ำหนักตัวอย่างในสารละลายตัวอย่าง 20 ml ที่ load ลงในคอลัมน์ (g)

m₁ = สาร non-polar ที่ชะออกจากคอลัมน์ (g)

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณสารโพลาร์ในหน่วยกรัมต่อ 100 กรัม (g/100 g) ด้วยทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

-



10. รายละเอียดอื่น

ข้อมูล Precision ปรากฏในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 Results of an IUPAC collaborative study on the determination of polar compounds.

Test Sample	1	2	3	4
Number of laboratories accepted	9	9	8	8
Number of results accepted	18	18	16	16
Mean of the laboratory values (% m/m)	8.00	7.30	11.50	25.90
Repeatability				
Standard deviation, s_r	0.36	0.33	0.23	0.52
Relative standard deviation, RSD_r %	4.5	4.5	2.0	2.0
Repeatability value, $2.8 \times s_r$	1.02	0.94	0.66	1.47
Reproducibility				
Standard deviation, s_R	0.37	0.39	0.48	0.77
Relative standard deviation, RSD_R %	4.6	5.3	4.2	3.0
Reproducibility value, $2.8 \times s_R$	1.04	1.09	1.35	2.17

ตารางที่ 2 Results of a 2,000 collaborative study on the determination of polar compounds.

Test Sample	1	2	3	4	5
Number of laboratories accepted	13	13	11	14	10
Number of results accepted	26	26	22	28	20
Mean of the laboratory values (% m/m)	16.01	22.28	11.74	32.06	20.80
Repeatability					
Standard deviation, s_r	0.27	0.29	0.34	0.33	0.14
Relative standard deviation, RSD_r %	1.7	1.3	2.9	1.0	0.7
Repeatability value, $2.8 \times s_r$	0.74	0.81	0.95	0.92	0.38
Reproducibility					
Standard deviation, s_R	1.04	1.29	0.56	1.66	0.61
Relative standard deviation, RSD_R %	6.5	5.8	4.8	5.2	3.0
Reproducibility value, $2.8 \times s_R$	2.92	3.61	1.58	1.64	1.72



DMScF 1053:

**การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช
กลุ่มคาร์บาเมตในผักผลไม้**

**Determination of carbamate pesticide residues in vegetables
and fruits**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตตกค้างในผักและผลไม้ที่มีปริมาณน้ำในตัวอย่างมากกว่าร้อยละ 75 และครอบคลุมสารกลุ่มคาร์บาเมต ได้แก่ aldicarb, bufencarb, carbaryl, carbofuran, methiocarb, methomyl, oxamyl และอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ (metabolites)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 985.23 N-Methylcarbamate Insecticide and Metabolite Residues

3. หลักการ (Principle)

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตที่ตกค้างในผักและผลไม้ถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดยปั่นกับ solvent ที่เหมาะสม แล้วทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค liquid-liquid partition และ Nuchar-Celite column chromatography หลังจากนั้นตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วย HPLC, in-line post-column derivatization และ fluorescence detector

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 g หรือ 0.001 g
- 4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g หรือ 0.00001 g
- 4.3 เครื่องบดปั่นความเร็วสูง (homogenizer)
- 4.4 ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator)
- 4.5 Hot air oven
- 4.6 Hot plate with magnetic stirrer
- 4.7 Muffle furnace
- 4.8 HPLC-fluorescence detector



4.9 Post-column derivatization instrument

4.10 อุปกรณ์

- 4.10.1 Beaker ขนาด 2 L
- 4.10.2 Büchner funnel, porcelain, 13 cm diameter
- 4.10.3 Chromatographic column 22 mm. id. × 300 mm., teflon stopcock, coarse porosity fritted disc
- 4.10.4 Cylinder ขนาด 100, 250, 500 ml
- 4.10.5 Filter flask ขนาด 1 L
- 4.10.6 Filter membrane PTFE 13 mm, 0.20 μm
- 4.10.7 Glass funnel ขนาด 75 mm id
- 4.10.8 Glass stoppered Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml
- 4.10.9 Glass syringe ขนาด 10 ml
- 4.10.10 Round-bottom flask 500 ml, 1 L และ 2 L
- 4.10.11 Separatory funnel 250, 500 ml
- 4.10.12 Vial ที่มี screw cap ขนาด 8 ml
- 4.10.13 กระดาษกรอง Whatman No. 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 mm หรือเทียบเท่า

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

- 5.1 Acetonitrile (CH_3CN) HPLC grade
- 5.2 Dichlorodimethylsilane
- 5.3 Hydrochloric acid (HCl)
- 5.4 Isopropanol
- 5.5 Methanol (MeOH) HPLC grade
- 5.6 Methylene chloride (CH_2Cl_2) HPLC grade
- 5.7 Petroleum ether HPLC grade
- 5.8 Sodium chloride (NaCl)
- 5.9 Toluene HPLC grade
- 5.10 Sodium sulfate (Na_2SO_4) anhydrous, granular เผาที่อุณหภูมิ 600°C อย่างน้อย 3 hr แล้วเก็บในภาชนะแก้วสีขาปิดสนิท



- 5.11 Charcoal: ชั่ง charcoal 100 g ใส่ใน beaker ขนาด 2 L เติม HCl 700 ml ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ต้มนาน 1 hr (ขณะต้มใช้ magnetic bar กวนสารตลอดเวลา) เติมน้ำกลั่นอีก 700 ml ต้มต่อไปอีก 30 min ปลอยทิ้งให้เย็น ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลาง ล้างต่อด้วย MeOH 500 ml ตามด้วย CH_2Cl_2 500 ml ปลอยทิ้งไว้จนแห้งใน hood เก็บใส่ในขวดแก้ว แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 120°C นาน 4 hr หลังจากนั้นปลอยทิ้งให้เย็นใน desiccator เมื่อนำออกจาก desiccator ปิดฝาให้สนิทไว้ใช้งานต่อไป
- 5.12 Silanized celite: ชั่ง celite 545 น้ำหนัก 150 g ใส่ใน beaker ขนาด 2 L เติม $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) ปริมาตร 1 L ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ต้มจนกระทั่งเดือด (ขณะต้มใช้ magnetic bar กวนสารตลอดเวลา) หลังจากเดือดแล้วต้มต่ออีก 10 min ปลอยทิ้งให้เย็น ล้างตะกอนด้วย H_2O จนเป็นกลาง ล้างต่อด้วย MeOH 500 ml ตามด้วย CH_2Cl_2 500 ml ปลอยทิ้งไว้จนแห้งใน hood เก็บใส่ในขวดแก้ว อบที่อุณหภูมิ 120°C ค้างคืน (มากกว่า 12 hr) แล้วปลอยทิ้งให้เย็นใน desiccator นำไปเติม dichloromethylsilane 3 ml ใน hood เขย่าให้เข้ากันนาน 15 min (ในขณะเขย่าให้เปิดฝาเป็นช่วงเพื่อลดแรงดันภายในขวด) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ นาน 4 hr แล้วเติม MeOH 500 ml คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 min นำตะกอนไปล้างด้วย isopropanol จนเป็นกลาง ปลอยทิ้งไว้จนแห้งใน hood เก็บใส่ขวดแก้วอบที่อุณหภูมิ 105°C นาน 2 hr หลังจากนั้นปลอยทิ้งให้เย็นใน desiccator เมื่อนำออกจาก desiccator ปิดฝาให้สนิทไว้ใช้งานต่อไป
- 5.13 Sodium hydroxide (NaOH) solution 0.05 N: เตรียม supernate NaOH โดยใช้ NaOH 1 ส่วน ละลายด้วย H_2O ที่ต้มไล่ carbon dioxide แล้ว 1 ส่วน เก็บในขวดแก้วที่มีฝาปิด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 วัน เพื่อให้ sodium carbonate ตกตะกอนจนหมด จากนั้นเตรียม 5 N NaOH โดยเปิดส่วนใส 27 ml ใส่ใน volumetric flask 100 ml เติม H_2O จนครบปริมาตรแล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเตรียม 0.05 N NaOH โดยเปิด ของ 5 N NaOH 10 ml ใส่ใน volumetric flask 1 L เติม H_2O จนครบปริมาตรแล้วผสมให้เข้ากัน
- 5.14 Sodium borate buffer solution 0.05 M: ชั่ง sodium tetraborate decahydrate 19.1 g ละลายด้วย H_2O 500 ml ใส่ใน volumetric flask 1 L ใช้ ultrasonic bath ช่วยในการละลายแล้วเติม H_2O จนครบปริมาตรผสมให้เข้ากัน
- 5.15 Reaction solution: ชั่ง o-phthalaldehyde 100 mg ละลายด้วย MeOH 10 ml ใส่ใน volumetric flask 1 L ที่มี 0.05 M sodium borate buffer solution ประมาณ 500 ml เติม 2-mercaptoethanol 1 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วย 0.05 M sodium borate buffer solution ผสมให้เข้ากัน



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 นำตัวอย่างผัก-ผลไม้ 1 kg มาบดปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นที่เหมาะสม เช่น blender, rotary cutter
- 6.2 เก็บตัวอย่างที่บดปั่นแล้วที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C เมื่อไม่ได้วิเคราะห์ทันที
- 6.3 นำตัวอย่างมาวางไว้จนถึงอุณหภูมิห้อง ก่อนทำการวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 การสกัด : ชั่งตัวอย่างผักและผลไม้ที่บดละเอียดแล้ว 150 g ใส่ใน beaker ขนาด 1 L เติม MeOH 300 ml นำไปปั่นด้วยเครื่องบดปั่นความเร็วสูงนาน 2 min กรอง (vacuum filter) ผ่าน Büchner funnel ที่มีกระดาษกรอง No. 1 เก็บ filtrate ใน suction flask ขนาด 1 L คำนวณปริมาตรสารละลายจากตัวอย่างผักและผลไม้ ดังนี้

ปริมาตรของตัวอย่าง 100 g

$$= \text{H}_2\text{O (ml) ในตัวอย่าง 100 g} + 200 \text{ ml MeOH} - 10 \text{ ml contraction factor}$$

ดวงสารละลายที่กรองได้ปริมาตรเท่ากับตัวอย่าง 100 g (ตามที่คำนวณได้) ใส่ลงใน round-bottom flask ขนาด 2 L เติม H_2O จนครบ 100 ml นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จนปริมาตรของสารละลายเหลือประมาณ 75 ml

7.2 liquid – liquid partition

- 7.2.1 นำสารละลายที่ได้จากการระเหยใส่ใน separatory funnel ขนาด 500 ml เติม NaCl 15 g เขย่าจนละลายหมด เติม CH_3CN 75 ml เขย่า 30 sec แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น
- 7.2.2 ถ่ายชั้นน้ำ (ชั้นล่าง) ใส่ใน separatory funnel ขนาด 250 ml เติม CH_3CN 50 ml เขย่า 20 sec ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น แล้วทิ้งชั้นน้ำ (ชั้นล่าง)
- 7.2.3 เติม 20% NaCl solution 25 ml ใน separatory funnel ขนาด 500 ml (7.2.1) เขย่า 20 sec แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น ถ่ายชั้นน้ำ (ชั้นล่าง) ลงใน separatory funnel ขนาด 250 ml (7.2.2) เขย่า 20 sec แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น แล้วทิ้งชั้นน้ำไป
- 7.2.4 เติม petroleum ether 100 ml ลงใน separatory funnel ขนาด 500 ml (7.2.3) เขย่า 20 sec แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น แยกชั้นล่าง (ชั้น CH_3CN) ใส่ใน separatory funnel ขนาด 500 ml ใบที่ 2
- 7.2.5 นำชั้น CH_3CN ใน separatory funnel ขนาด 250 ml (7.2.3) สกัดซ้ำกับ petroleum ether (7.2.4) เขย่า 20 sec แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น แยกชั้นล่าง (ชั้นของ acetonitrile) รวมใส่ใน separatory funnel ขนาด 500 ml ใบที่ 2 ส่วนชั้น petroleum ether เติม CH_3CN 10 ml เขย่า 20 sec ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกชั้นล่างซึ่งเป็นชั้น CH_3CN รวมใส่ใน separatory funnel ขนาด 500 ml ใบที่ 2



- 7.2.6 เติม 2% NaCl solution 50 ml และ CH_2Cl_2 100 ml ลงใน separatory funnel ขนาด 500 ml ไปที่ 2 เขย่า 20 sec ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น
 - 7.2.7 ไขชั้น solvent (ชั้นล่าง) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml เติม Na_2SO_4 anhydrous ทีละน้อย ๆ แกว่งเบา ๆ จนเห็นว่า Na_2SO_4 เป็นผงร่วนไม่จับกัน เป็นก้อน แล้วกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองที่มี Na_2SO_4 อยู่เล็กน้อย ลงใน round-bottom flask ขนาด 1 L
 - 7.2.8 ล้างชั้นน้ำ (ชั้นบน) จาก 7.2.7 ด้วย CH_2Cl_2 25 ml 2 ครั้ง โดยแกว่งเบา ๆ ระวังอย่าให้เกิด emulsion ระหว่างการล้าง แล้วไขชั้นล่างลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml ทำเช่นเดียวกับ 7.2.7
 - 7.2.9 นำสารละลายที่กรองได้ ซึ่งรวมอยู่ใน round-bottom flask ขนาด 1 L ไประเหย ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนเกือบแห้ง เติม CH_2Cl_2 10 ml เพื่อดำเนินการต่อ ในข้อ 7.3 การทำให้บริสุทธิ์
- 7.3 การทำให้บริสุทธิ์
- 7.3.1 เตรียม chromatographic column ที่มี round-bottom flask ขนาด 500 ml รองรับต่อกับ vacuum aspirator
 - 7.3.2 ใส่ silanized celite 0.5 g ใน chromatographic column เคาะข้าง column เบา ๆ ให้ packing material มีผิวหน้าเรียบแล้วใส่ charcoal-celite mixture (1 + 4) 5 g เคาะข้าง column เบา ๆ ให้มีผิวหน้าเรียบ ปิด stopcock แรงดูดจาก vacuum aspirator จะทำให้ packing material แน่นสม่ำเสมอ
 - 7.3.3 ล้าง (prewash) column ด้วย toluene- CH_3CN (1+ 3) 50 ml เมื่อ prewash solution เหลืออยู่เหนือ packing material ประมาณ 0.5 cm ปิด stopcock ปลด vacuum aspirator ออก ทิ้ง eluate แล้วต่อ vacuum aspirator และเปลี่ยน round-bottom flask 500 ml รองรับ eluate ไปใหม่
 - 7.3.4 ผ่านสารสกัดที่ได้จากข้อ 7.2.9 ปรับอัตราการไหลประมาณ 5 ml/min ใช้ CH_2Cl_2 10 ml rinse ล้าง round-bottom flask ที่ใส่สารละลายตัวอย่าง แล้วถ่ายลงใน column รองน solution อยู่เหนือผิวหน้า packing material เล็กน้อย จึงเติม toluene – aceto nitrile (1+ 3) 25 ml และ 100 ml ตามลำดับ
 - 7.3.5 นำ eluate ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนเกือบแห้ง เติม MeOH 10 ml ระเหยต่อไปจนแห้ง แล้วเติม MeOH อีก 5 ml เพื่อละลายสารที่เหลือทั้งหมดทันที แล้วกรองผ่าน syringe filter PTFE, 13 mm, 0.20 μm ใส่ใน vial ขนาด 8 ml สำหรับการตรวจวัดชนิดและปริมาณต่อไป



7.4 การหาปริมาณด้วย HPLC

สภาวะของเครื่อง HPLC, post-column derivatization และ fluorescence detector
(สภาวะของเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

Mobile phase: programmable HPLC gradient system

เวลา (min)	H ₂ O (%)	CH ₃ CN (%)
0	88	12
30	30	70
35-45	88	12

Flow rate: mobile phase 1.0 ml/min, reaction solution 0.3 ml/min

Analytical column: Zorbax C₈ 5 μ m, size 25 cm $\times$ 4.6 mm id หรือเทียบเท่า

Guard column: C8 5 μ m

Column oven temperature: 35°C

Reactor temperature: 100°C

Injection volume: 10 μ l

Fluorescence detector: Excitation wavelength 345 nm และ Emission wavelength 455 nm

ปรับความไว (sensitivity) ของการตรวจวิเคราะห์โดยนิตสารมาตรฐาน carbofuran 10 ng ให้ได้
ความสูง 50 $\times$ 5% full scale deflection

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

ในการคำนวณใช้วิธีเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งพื้นที่ของสารมาตรฐานและพื้นที่ของสาร
ที่พบในตัวอย่างต้องมีความแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 25\%$ และคำนวณปริมาณที่พบ
โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณที่พบ (mg/kg)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้ peak สารที่พบในตัวอย่าง} \times \text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน } (\mu\text{g/ml})}{\text{พื้นที่ใต้ peak ของสารมาตรฐาน} \times \text{ความเข้มข้นของตัวอย่าง (g/ml)}}$$

8.2 การรายงานผล (Test report)

รายงานปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง ที่ระดับ 5 เท่า LOQ

9.2 วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) อย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 % recovery ของการวิเคราะห์ spiked sample ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 70 - 120%

10.2 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 20%



DMSc F 1054: การวิเคราะห์ปริมาณ 3-chloro-1, 2- propanediol (3-MCPD)
ในอาหาร และส่วนผสมอาหาร
Determination of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD)
in foods and food ingredients

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 3-chloro-1, 2-propanediol (3-monochloropropane-1, 2-diol; 3-MCPD) ในผลิตภัณฑ์อาหาร hydrolyzed vegetable protein (HVP) ซอสถั่วเหลือง ชุปก้อน ชุปผง มอลต์สกัด ไข่กรอก ปลา เนยแข็ง แป้ง ธัญพืช ขนมปัง และผลิตภัณฑ์อื่นๆ

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Methods of Analysis 2000.01 Determination of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) in foods and food ingredients

3. หลักการ (Principle)

เติม 3-Chloro-1, 2-propanediol-d5 (3-MCPD-d5) ที่ใช้เป็น internal standard ลงในตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายเกลือ ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติม Extrelut TM 20 ml refill pack ลงในสารละลายตัวอย่าง คลุกให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์แก้ว เซลลูลาร์ nonpolar ออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายผสม hexane-diethyl ether และชะสาร 3-MCPD และ 3-MCPD-d5 ในตัวอย่างด้วย diethyl ether ลดปริมาณสารละลายในสารสกัดที่ได้ แล้วนำมา derivatize และวิเคราะห์หาปริมาณ 3-MCPD ด้วย Gas chromatograph – mass spectrometer (GC/MS)

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่ง ที่มีความละเอียด 0.01 g
- 4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 GC/MS
- 4.4 เครื่องให้ความร้อน (aluminum block heater)
- 4.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)



- 4.6 เครื่องระเหย (rotary evaporator)
- 4.7 เครื่องผสมสาร (vortex shaker)
- 4.8 Ultrasonic bath
- 4.9 อุปกรณ์
 - 4.9.1 Beaker ขนาด 250 ml
 - 4.9.2 Glass chromatography tube: 40 × 2 cm id with sintered glass disk and tap
 - 4.9.3 Gas-tight syringe ขนาด 1 ml
 - 4.9.4 กระดาษกรอง Whatman No.4 หรือเทียบเท่า
 - 4.9.5 Volumetric flask ขนาด 10, 25 และ 100 ml

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

- 5.1 สารมาตรฐาน 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD)
- 5.2 สารมาตรฐาน 3-chloro-1, 2-propanediol-d5 (3-MCPD-d5) – Minimum 98% isotopic purity
- 5.3 Diethyl ether, Glass-distilled grade หรือเทียบเท่า
- 5.4 Hexane, Glass-distilled grade หรือเทียบเท่า
- 5.5 สารละลายผสม diethyl ether- hexane (1+9) – ผสม diethyl ether 100 ml กับ hexane 900 ml เขย่าให้เข้ากัน
- 5.6 ExtrelutTM 20 mL refill packs
- 5.7 Ethyl acetate
- 5.8 Heptafluorobutyrimidazole
- 5.9 Sodium sulfate (Na_2SO_4)
- 5.10 สารละลาย 5 M sodium chloride ($NaCl$) - ชั่ง $NaCl$ 290 g ละลายใน H_2O แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1 L ปรับปริมาตรด้วย H_2O
- 5.11 2, 2, 4-trimethylpentane



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างที่เป็นของเหลว เทผสมลงในภาชนะที่สะอาดคนหรือกวนจนตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2 ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น ชุปก้อน 魷魚ฝัก ขนมันปิ้ง เนยแข็ง เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 3-MCPD

- 7.1.1 Stock standard solution 1000 $\mu\text{g/ml}$ - ชั่งสารมาตรฐาน 25 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ละลาย และปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate
- 7.1.2 Intermediate standard solution 100 $\mu\text{g/ml}$ - ปิ่เปิด stock standard solution 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate
- 7.1.3 Spiking standard solution 2 $\mu\text{g/ml}$ - ปิ่เปิด intermediate standard solution 0.2 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate

7.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน internal standard 3-MCPD- d_5

- 7.2.1 Stock standard solution 1,000 $\mu\text{g/ml}$ - ชั่ง 3-MCPD- d_5 25 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate
- 7.2.2 Working standard solution 10 $\mu\text{g/ml}$ - ปิ่เปิด stock standard solution 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate

7.3 การเตรียม calibration standard 3-MCPD ความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 และ 2.00 $\mu\text{g/mL}$ - ปิ่เปิด intermediate standard solution 0, 12.5, 25, 125, 250 และ 500 μl ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย 2, 2, 4 trimethylpentane

7.4 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

- 7.4.1 Hydrolyzed vegetable protein (HVP) และซอสปรุงรส - ชั่งตัวอย่าง 8 ± 0.01 g เติม 3-MCPD- d_5 ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 μl และเติม 5 M NaCl ลงในตัวอย่างจนได้น้ำหนัก 20 g นำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic bath นาน 10 min



- 7.4.2 ซุปก้อน ซุปผง มอลต์สกัด - ชั่งตัวอย่างซุปก้อน ซุปผง 5 ± 0.01 g ตัวอย่างมอลต์สกัด 10 ± 0.01 g) เติม 3-MCPD- d_5 ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ และเติม 5 M NaCl 1 ลงในตัวอย่างจนได้น้ำหนัก 20 g นำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic bath นาน 10 min
- 7.4.3 เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนยแข็ง - ชั่งตัวอย่าง 20 ± 0.01 g เติม 3-MCPD- d_5 ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ และเติม 5 M NaCl ลงในตัวอย่างจนได้น้ำหนัก 70 g ปั่นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้ว centrifuge ที่ 3,500 rpm นาน 20 min แล้วซั่งสารละลายตัวอย่างส่วนใส 20 g ใส่ใน beaker ขนาด 250 ml
- 7.4.4 แป้ง ธัญพืช และขนมปัง - ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.01 g เติม 3-MCPD- d_5 ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ และเติม 5 M NaCl ลงในตัวอย่างจนได้น้ำหนัก 40 g คนตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic bath นาน 15 min ปิดฝาและแช่ทิ้งไว้ 12-15 hr
- 7.5 การเตรียม blank solution – ซั่งสารละลาย 5 M NaCl 20 g เติม 3-MCPD- d_5 ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร $100 \mu\text{l}$ แล้วนำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic bath นาน 10 นาที
- 7.6 สารสกัด (test extract) - นำสารละลายตัวอย่าง 20 g ที่เตรียมไว้ (7.4) และ blank solution (7.5) เติม ExtrelutTM refill packs ใช้ช้อนคนให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์แก้วที่เตรียมไว้ และปิดทับชั้นบนด้วย Na_2SO_4 สูงประมาณ 1 cm ตั้งทิ้งไว้ 15-20 min แล้วชะ nonpolar component ออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายผสม diethyl ether- hexane 80 ml ที่ซั่งสารละลายที่ได้ แล้วชะ 3-MCPD ด้วย diethyl ether 250 ml โดยปล่อยให้สารไหลออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วประมาณ 8 ml/min ลงใน volumetric flask ขนาด 250 ml แล้วเติม Na_2SO_4 ประมาณ 15 g แช่และตั้งทิ้งไว้ 10-15 min กรองผ่านกระดาษกรองลงในขวดระเหย นำตัวอย่างไประเหยที่อุณหภูมิ 35°C จนปริมาณสารสกัดเหลือประมาณ 5 ml คูดสารละลายตัวอย่างใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย diethyl ether เติม Na_2SO_4 ปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายตัวอย่างตั้งทิ้งไว้ 5-10 min ใช้ gas-tight syringe คูดสารละลายตัวอย่าง 1 ml ใส่ใน vial ขนาด 4 ml ระเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิไม่เกิน 30°C



- 7.7 Derivatization (สารตัวอย่าง) - ทันทึที่สารละลายตัวอย่างแห้งเติม 2, 2, 4-trimethylpentane 1 ml และ heptafluorobutyrylimidazole 50 μ l ปิดฝา vial แล้วเขย่าด้วย vortex shaker แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C นาน 20 min โดยใช้ heating block แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม H₂O ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 ml เขย่าด้วย vortex shaker และตั้งทิ้งไว้ 30 sec เพื่อให้เกิดการแยกชั้น คูดชั้น H₂O ที่เติม H₂O อีก 1 ml ทำซ้ำในขั้นตอนเดิมอีกครั้ง คูดชั้น 2, 2, 4-trimethylpentane ลงใน vial ขนาด 2 ml และเติม Na₂SO₄ ปริมาณเล็กน้อย เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2-5 min คูดสารละลายใส่ vial ขนาด 2 ml นำไปฉีดเข้าเครื่องมือ GC/MS
- 7.8 Derivatization (calibration standard solution)– ปิเปิด calibration standard 3-MCPD ความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 และ 2.00 μ g/mL ความเข้มข้นละ 100 μ l ใส่ใน vial ขนาด 4 ml เติม 2, 2, 4 trimethylpentane 900 μ l เติม internal standard 3-MCPD-d₅ (10 μ g/ml) ปริมาตร 10 μ l จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 50, 100 และ 200 ng/ml ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา derivatization เช่นเดียวกับสารตัวอย่าง (7.7)

7.9 สภาวะเครื่องมือ GC/MS

GC parameter

GC column: DB 5 MS, 30 m $\times$ 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness หรือเทียบเท่า

Carrier gas: He 1.0 ml/min constant flow

Temperature program: 50°C hold 1 min, 2°C/min - 90°C and 270°C hold 10 min

Inlet temperature: 270°C

Injection volume: 1 μ l/ splitless

MS parameters

GC Interface temperature: 270°C

Operation mode: selected ion monitoring (SIM)

Ion (m/z): 257 (3-MCPD-d₅), 453, 291, 289, 275 และ 253 (3-MCPD)



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$3\text{-MCPD (mg/kg)} = \frac{(A \times 10)/(A' \times C)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

- A = พื้นที่ใต้พีค 3-MCPD derivative,
A' = พื้นที่ใต้พีค 3-MCPD-d5 derivative
C = slope ของ calibration line

8.2 รายงานผลทดสอบ (Test report)

รายงานปริมาณ 3-MCPD ที่พบในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ blank ควบคู่กับตัวอย่างทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
9.2 วิเคราะห์ spiked matrix เพื่อประเมิน % recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 mg/kg ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์โดย % recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 80 – 110% หรือวิเคราะห์ duplicate sample โดยวิเคราะห์ control sample ที่มีความเข้มข้นของ 3-MCPD อยู่ในช่วง 0.03-0.05 mg/kg เปรียบเทียบความแตกต่างสัมพัทธ์ (%RPD) ของผลวิเคราะห์มีเกณฑ์การยอมรับ คำนวณจากสูตร

$$\text{Repeatability Limit, } r = t_{\infty} * \sqrt{n} * \sigma_r, t_{\infty} = 1.96, n = 2, \sigma_r = \text{SD ที่ระดับ LOQ}$$

$$\% \text{ RPD} = r \frac{100}{\bar{\chi}}, \bar{\chi} = \text{ค่า LOQ}$$



10. รายละเอียดอื่น

ข้อมูล Interlaboratory study results ปรากฏในตาราง

ตารางแสดง Interlaboratory study results for the determination of 3-chloro-1, 2-propanediol in foods and food ingredients

Sample ID	$\bar{x}$, mg/kg	No.of labs ^a	Sr, mg/ kg	RSDr, %	S _R , mg/kg	RSD _R , %	HORRAT
A, HVP	0.029	10 (2)	0.002	7.5	0.004	12.8	0.5
B, Malt extract	0.055	11 (1)	0.003	4.9	0.007	13.3	0.5
C1& C2, Soup powder	0.043	11 (1)	0.004	8.9	0.008	18.6	0.7
D, Bread crumbs	0.030	12 (0)	0.003	8.4	0.006	20.8	0.8
E, Salami	0.016	12 (0)	0.002	11.6	0.006	38.6	1.3
F, Cheese alternative	0.043	11 (1)	0.005	10.6	0.010	22.3	0.9

^a Each value is the number of laboratories retained after elimination of outliers; each value in parentheses is the number of laboratories removed as outliers.

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. นางสาวจรรวณ ลิ้มสัจจะสกุล | ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร |
| 2. นายทงพันธ์ สัจจปาละ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 3. นางลดาพรรณ แสงคล้าย | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางสาวอรุรัตน์ วุฒิกรภักดิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 6. นางอชฌา สัจจปาละ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 7. นางลดาวัลย์ จิงสมานกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 8. นางสาวอรุณี ศรีพรหม | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 9. นางสาวมณฑนา พันธุ์บัวหลวง | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 10. นายสมภพ วัฒนมณี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 11. นางสาวกรรณา ตีรสมิทธิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 12. นางสาวณัฐกานต์ ดิยศิwap | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 13. นางปิยมาศ แจ่มศรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |



นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. อาหาร หมายถึง อาหารที่คนสามารถบริโภคได้ และให้หมายความรวมถึงเครื่องดื่ม ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้น ๆ
2. น้ำ หมายถึง น้ำสำหรับอุปโภคและบริโภค รวมทั้งน้ำในสิ่งแวดล้อมแต่ไม่รวมน้ำเสีย
3. Dilution หมายถึง การเจือจางของตัวอย่าง
4. น้ำกรอง หมายถึง น้ำที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าน้ำกลั่น หรือ deionized water
5. คำย่อที่ใช้ และคำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
CFU	colony forming unit
MPN	most probable number
AnO ₂	anaerobic condition
O ₂	aerobic condition

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 2015	น้ำและน้ำแข็ง	Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i>	I	89
DMSc F 2016	อาหาร	Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i>	I	119
DMSc F 2017	อาหาร	<i>Clostridium botulinum</i>	I	151
DMSc F 2018	อาหาร ที่มีความเป็นกรดต่ำ	จุลินทรีย์เจริญที่ 35°C และ 5°C รวมทั้ง <i>Clostridium botulinum</i>	I	161
DMSc F 2019	อาหาร ที่มีความเป็นกรด	จุลินทรีย์เจริญที่ 30°C และ 55°C รวมทั้งยีสต์และรา	I	177



**DMSc F 2015: วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ *E. coli*
 ในน้ำ และน้ำแข็งโดยวิธี MPN**
**Analytical method of Coliforms, Fecal coliforms and
E. coli in water and ice by MPN technique**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่ม coliforms กลุ่ม fecal coliforms และ *E. coli* ในน้ำ และน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association (APHA). Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington DC; 2012. p. 9-65 – 9-74, 9-76, 9-105 – 9-109.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

E. coli = *Escherichia coli*

4. หลักการ (Principle)

แบคทีเรียในกลุ่ม coliforms เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เกิดกรดและสร้างก๊าซที่อุณหภูมิ 35°C ภายใน 48 ชั่วโมง พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ส่วน fecal coliforms หรือ thermotolerant coliforms เป็นกลุ่มย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม coliforms พบมากในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เกิดกรดและสร้างก๊าซที่อุณหภูมิ 44.5 ถึง 45.5°C ภายใน 24-48 ชั่วโมง สำหรับ *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งในกลุ่ม fecal coliforms นิยมใช้เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะการผลิตอาหารและน้ำดื่ม

การตรวจด้วยวิธี MPN หรือ multiple tube fermentation technique เป็นการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อ coliforms โดยอาศัยความสามารถในการย่อยสลายอาหารให้เกิดกรดและก๊าซในหลอดทดลอง จากนั้นนำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกไปอ่านค่าในตาราง MPN (MPN index) ซึ่งแสดงปริมาณ



coliforms ที่ตรวจพบในตัวอย่าง ค่าในตาราง MPN เป็นค่าจากการทดลองและคำนวณผลด้วยวิธีทางสถิติ บ่งบอกปริมาณ coliforms ที่มีโอกาสตรวจพบได้ในน้ำ

4.1 การตรวจ coliforms และ fecal coliforms แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

4.1.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase) เป็นขั้นตอนเพื่อแยก coliforms ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ โดยนำตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซ ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ บ่มเพาะเชื้อตามวิธีที่กำหนด แล้วนำหลอดที่เกิดก๊าซไปตรวจยืนยัน

4.1.2 การตรวจสอบยืนยัน (confirmed phase) เป็นการยืนยันการตรวจพบ coliforms และ fecal coliforms โดยถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิดเหลว บ่มเพาะเชื้อตามวิธีที่กำหนด แล้วอ่านผลตามจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในตาราง MPN

4.1.3 การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase) ทดสอบขั้นตอนนี้ในกรณีผลในขั้นการตรวจสอบยืนยันไม่ชัดเจน หรือสำหรับการควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์ (quality control) หรือกรณีอื่นๆ ตามที่กำหนด

4.2 การตรวจหา *E. coli* ในที่นี้ตรวจได้ 2 วิธีคือ

4.2.1 การใช้ Fluorogenic substrate เป็นการตรวจหา *E. coli* ที่มีเอนไซม์ β -glucuronidase ซึ่งสามารถย่อย substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) ทำให้เกิดการเรืองแสงสีฟ้า (bright blue fluorescence) ภายใน 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร

4.2.2 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Basal medium for lysine and ornithine decarboxylase tests

5.1.2 Brilliant green lactose bile (BGLB) broth

5.1.3 Buffered glucose broth

5.1.4 Carbohydrate utilization broth (lactose, sorbitol, cellobiose)

5.1.5 EC medium



- 5.1.6 EC-MUG medium
- 5.1.7 Lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่า และ 2 เท่า
- 5.1.8 LES Endo agar
- 5.1.9 MacConkey agar
- 5.1.10 Nutrient agar (NA)
- 5.1.11 Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) broth
- 5.1.12 Semi-solid medium for motility test
- 5.1.13 Simmons' citrate agar
- 5.1.14 Tryptic soy agar (TSA)
- 5.1.15 Tryptophan broth
- 5.1.16 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Buffered water หรือ 0.1% peptone water
- 5.2 สารเคมี
 - 5.2.1 Gram stain reagents
 - 5.2.2 Kovac's reagent
 - 5.2.3 Methyl red indicator solution
 - 5.2.4 Mineral oil
 - 5.2.5 Naphthol solution (5%)
 - 5.2.6 Oxidase reagent
 - 5.2.7 Potassium hydroxide solution, 7N

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 เครื่องมือ
 - 6.1.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
 - 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
 - 6.1.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ และ $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
 - 6.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
 - 6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
 - 6.1.6 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
 - 6.1.7 UV lamp ความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร



6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 หลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- 6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.4 หัวง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0-3.5 มิลลิเมตร) และเข็มเย็บเนื้อ (loop and needle)
- 6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.6 ปิเปต (pipette)
- 6.2.7 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)
- 6.2.9 กระดาษกรอง Whatman No. 1

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)
- 7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง สุ่มตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อทำตัวอย่างให้ละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การตรวจปริมาณ coliforms (enumeration) หรือ total coliforms โดยวิธี MPN (ภาคผนวก 2)

7.2.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase)

- 7.2.1.1 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ต่ำ : ภาคผนวก 3 ตารางที่ 1
เขย่าขวดตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นลงใน lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 2 เท่า หลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด
- 7.2.1.2 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์สูง : ภาคผนวก 3 ตารางที่ 2
เขย่าขวดตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นลงใน lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 2 เท่า หลอดละ 10 มิลลิลิตร



จำนวน 5 หลอด และปิเปตตัวอย่างเริ่มต้น 1 และ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตรละ 5 หลอด อาจพิจารณาความเข้มข้นของตัวอย่างมากขึ้นตามต้องการ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง และวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์

7.2.1.3 นำ lauryl tryptose broth จากข้อ 7.2.1.1 หรือ 7.2.1.2 บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง

ผลบวก : มีการเจริญของเชื้อ และเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

coliforms ให้ผลบวก

หลอดที่ให้ผลบวกนำไปทดสอบต่อตามข้อ 7.2.2 ส่วนหลอดที่ให้ผลลบ บ่มต่ออีกจนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง แล้วอ่านผลอีกครั้ง

สำหรับตัวอย่างน้ำดื่ม (drinking water) เมื่อบ่มจนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง ถ้าพบว่าหลอด lauryl tryptose broth มีการเจริญของเชื้อ และไม่เกิดก๊าซ ในหลอดดักก๊าซ ให้ทดสอบยืนยันต่อตามข้อ 7.2.2

7.2.2 การตรวจสอบยืนยัน (confirmed phase)

7.2.2.1 เขย่าหลอด lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวก ถ่ายเชื้อ 1 loop หรือมากกว่า จากแต่ละหลอด ลงใน BGLB broth หลอดต่อหลอด

7.2.2.2 บ่มที่ 35°C 48 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

coliforms ให้ผลบวก

บันทึกผล และคำนวณตามข้อ 8

การตรวจวิเคราะห์ coliforms โดยทั่วไป ตรวจสอบถึงขั้นยืนยันก็เพียงพอ ยกเว้น ในกรณีที่สงสัย หรือดำเนินการควบคุมคุณภาพ จึงจะตรวจสอบถึงขั้นสมบูรณ์

7.2.3 การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase)

7.2.3.1 ถ่ายเชื้อ 1 loop จากข้อ 7.2.2.2 ที่ให้ผลบวก ขีดบน MacConkey agar หรือ LES Endo agar



7.2.3.2 บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ

- ◆ MacConkey agar โคโลนีมีสีแดง อาจมีโซนขุ่นล้อมรอบ
- ◆ LES Endo agar โคโลนีมีสีชมพู จนถึงแดงเข้ม และมี metallic sheen

7.2.3.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ 1 โคโลนีหรือมากกว่าจากแต่ละจานเพาะเชื้อ ถ้าไม่มีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะใกล้เคียงโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ มากที่สุด (most likely) จำนวน 2 โคโลนีหรือมากกว่า ใส่ใน lauryl tryptose broth ความเข้มข้น 1 เท่า และ NA slant

7.2.3.4 นำ lauryl tryptose broth บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซให้บ่มต่อจนครบ 48 ± 3 ชั่วโมง สำหรับ NA slant บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง นำไปย้อมสีแกรม ถ้าเป็นตัวอย่างน้ำดื่มไม่ต้องย้อมสีแกรม เพราะแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียสร้างสปอร์มักไม่เจริญในขั้นตอนตรวจคัดแยกเบื้องต้น

สรุปผลพบ coliforms เมื่อหลอด lauryl tryptose broth เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซภายใน 48 ± 3 ชั่วโมง และพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) fecal coliforms โดยวิธี MPN: ภาควง 2 เขย่าหลอด lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวกจากข้อ 7.2.1.3 หรือ หลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวกจากข้อ 7.2.2.2 ถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอด 1 loop ลงใน EC medium หลอดต่อหลอด นำไปบ่มที่ 44.5°C 24 ± 2 ชั่วโมงภายใน 30 นาทีหลังจากการถ่ายเชื้อ

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ และมีการเจริญของเชื้อ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซและไม่มีการเจริญของเชื้อ หรือเจริญน้อย ถ้ามีการเจริญมาก แต่ไม่เกิดก๊าซ ให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นสำหรับการหา fecal coliforms อีกหนึ่งชนิด

fecal coliforms ให้ผลบวก

บันทึกผล และคำนวณตามข้อ 8



7.4 การตรวจ *E. coli* ตรวจได้ 2 วิธีคือ

7.4.1 วิธีที่ 1 การใช้ fluorogenic substrate

7.4.1.1 เขย่าหลอด lauryl tryptose broth ที่ให้ผลบวกจากข้อ 7.2.1.3 ถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอด 1 loop หรือมากกว่าลงใน EC-MUG medium หลอดต่อหลอด

7.4.1.2 บ่มที่ 44.5°C 24 ± 2 ชั่วโมงภายใน 30 นาทีหลังจากการถ่ายเชื้อ สังเกตการเรืองแสงของอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้แสง UV

ผลบวก : พบการเรืองแสงสีฟ้า (bright blue fluorescence)

ผลลบ : ไม่พบการเรืองแสงสีฟ้า

E. coli ให้ผลบวก

บันทึกผล และคำนวณตามข้อ 8

7.4.2 วิธีที่ 2 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี

7.4.2.1 ถ่ายเชื้อ 1 loop จากหลอด EC medium ในข้อ 7.3 ที่ให้ผลบวก จีดบนจานเพาะเชื้อ MacConkey agar หรือ LES Endo agar

7.4.2.2 บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ

◆ MacConkey agar โคโลนีมีสีแดง อาจมีโซนขุ่นล้อมรอบ

◆ LES Endo agar โคโลนีมีสีชมพู จนถึงแดงเข้ม และมี metallic sheen

7.4.2.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะจีดบน NA slant บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง เพื่อใช้ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

◆ การใช้น้ำตาล lactose, sorbitol และ cellobiose

เจียเชื้อ 1 loop ลงใน carbohydrate utilization broth (lactose, sorbitol และ cellobiose) บ่มที่ 35°C 24-48 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผล lactose และ sorbitol เป็นบวก cellobiose เป็นลบ



◆ การทดสอบ ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) hydrolysis

เจียเชื้อ 1 loop ลงใน ONPG broth บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบ

ผลกับ ONPG broth ที่ไม่เติมเชื้อ หรือเติมเชื้อที่ให้ผลลบ

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผลบวก

กรณีใช้ชุดทดสอบและแผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

◆ การทดสอบ indole

เจียเชื้อลงใน tryptophan broth บ่มที่ 35°C 24 $\pm$ 2 ชั่วโมงเติม

Kovac's reagent 0.2–0.3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วอ่านผล

ผลบวก : เกิดชั้นสีแดงเข้มบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ : เกิดสีเหลืองหรือสีส้มบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

E. coli ให้ผลบวก

◆ การทดสอบ methyl red

เจียเชื้อลงใน buffered glucose broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 35°C 5 วัน

นำ culture 5 มิลลิลิตร หยด methyl red indicator solution จำนวน 5 หยด อ่านผลทันที

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง

เชื้อส่วนใหญ่อ่านผลได้เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง (ต้องไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง) ถ้าผลเป็นลบให้บ่ม culture ส่วนที่เหลือต่อจนครบ 5 วัน ทดสอบปฏิกิริยาและอ่านผล ถ้าผลทดสอบที่ 48 ชั่วโมงหรือที่ 5 วัน ให้ผลเป็นที่น่าสนใจ (mixed shade) ให้เตรียมสารละลายเชื้ออีก 2 ชุด และบ่มที่ 22-25°C แบ่งทดสอบปฏิกิริยาเมื่อบ่มครบ 2, 3, 4 และ 5 วัน

E. coli ให้ผลบวก



◆ การทดสอบ Voges-Proskauer

เจียเชื้อลงใน tryptophan broth บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง นำ culture 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมนaphthol solution 0.6 มิลลิลิตร และ KOH 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันหลังเติมสารละลายแต่ละชนิด อ่านผลภายใน 5 นาที อย่าอ่านผลภายหลัง 10 นาที

ผลบวก : เกิดสีชมพู ถึงสีแดงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี หรือเกิดสีน้ำตาลแดง (copper color)

E. coli ให้ผลลบ

◆ การทดสอบ Simmons' citrate

จืดเชื้อปริมาณน้อย (light inoculum) ลงบนผิวหน้าของ Simmons' citrate agar บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผลลบ

◆ การทดสอบ motility

ใช้ needle เจียเชื้อแล้ว stab ลงตรงกลางหลอดของ semi-solid medium for motility test ลึก 5 มิลลิเมตร บ่มที่ 35°C 1-2 วัน

ผลบวก : เชื้อเจริญกระจายออกจาก inoculation point

ผลลบ : เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab และอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณ โดยรอบยังคงมีลักษณะใส

ถ้าผลเป็นลบให้บ่มต่ออีก 5 วัน ที่ 22-25°C

E. coli ให้ผลบวก

◆ การทดสอบ lysine และ ornithine decarboxylase

เจียเชื้อลงใน basal medium for decarboxylasetest ที่มี lysine หรือ ornithine เติมนatural oil สูงประมาณ 10 มิลลิเมตร ปิดฝาให้แน่น บ่มที่ 35-37°C 4 วัน อ่านผลทุกวัน (เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ)



ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง หรือ
สีม่วงแดง ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเทาอมฟ้า ให้หยดสารละลาย
bromocresol purple จำนวน 1 หยด ถ้าสีไม่เปลี่ยน
ให้แปลผลเป็นลบ

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผลบวก

◆ การทดสอบ oxidase

นำเชื้อที่มีอายุน้อยกว่า 24 ชั่วโมง จีด (smear) บนกระดาษกรองที่หยด
oxidase reagent (ไม่ใช่ห้วงเจียเชื่อนิเกล-โครเมียม หรือลวดโลหะ
เพราะจะทำให้เกิดผลบวกปลอม) ใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1
หรือกระดาษกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่า

ผลบวก : กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

ผลลบ : กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผลลบ

◆ การทดสอบ yellow pigment

จีดเชื้อบนผิวหน้าของ TSA plate หรือ slant (สามารถใช้ NA แทนได้)
บ่มที่ 25°C 48 ชั่วโมง

ผลบวก : โคโลนีสีเหลือง สีจะเข้มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม

ผลลบ : โคโลนีไม่เป็นสีเหลือง

E. coli ให้ผลลบ

บันทึกผล และคำนวณตามข้อ 8

8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN (ตารางที่ 1 และ 2 : ภาคผนวก 3)
ได้ผลเป็นค่า MPN/100 มิลลิลิตร พร้อมขีดความเชื่อมั่นที่ระดับ 95% (95% confidence
limits)



- 8.2 กรณีอ่านผลตามตารางที่ 2 (ภาคผนวก 3) ถ้าระดับการเจือจางของตัวอย่างใน 3 dilutions แตกต่างจากที่กำหนดไว้ให้นำผลบวกที่ได้ไปอ่านค่า MPN จากตารางแล้วคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{MPN/100 มิลลิลิตร} = (\text{ค่า MPN จากตาราง}) \times 10/V$$

เมื่อ V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ dilution ต่ำสุดที่เลือก

- 8.3 กรณีอ่านผลตามตารางที่ 2 (ภาคผนวก 3) ถ้าเจือจางตัวอย่างมากกว่า 3 dilutions ให้เลือก 3 dilutions ที่เหมาะสม แล้วอ่านค่า MPN จากตารางที่ 2 ตามผลบวกของ dilutions ที่เลือกโดยใช้เกณฑ์การเลือก 3 dilutions ดังนี้ (ตัวอย่างตามตารางที่ 3)

8.3.1 ให้ตัด dilution สูงสุด (มีปริมาณตัวอย่างน้อยที่สุด) ที่ให้ผลลบทั้ง 5 หลอด โดยให้อย่างน้อย 1 dilution ที่เหลืออยู่มีหลอดที่ให้ผลลบ จากนั้นให้ตัด dilution ต่ำสุด (มีปริมาณตัวอย่างมากที่สุด) ที่มีผลบวกทั้ง 5 หลอด และอย่างน้อย 1 dilution ที่เหลืออยู่มีหลอดที่ให้ผลบวก ดังตัวอย่าง A เลือก 3 dilutions โดยตัด dilution สูงสุด คือ 0.001 มิลลิลิตร และตัด dilution ต่ำสุดคือ 10 มิลลิลิตร จะได้ 5-1-0

8.3.2 ถ้า dilution ต่ำสุดมีผลบวกไม่ครบทั้ง 5 หลอด และมีหลาย dilutions ที่สูงขึ้นไปให้ผลลบทั้งหมด ให้ตัด dilutions สูงสุดที่ให้ผลลบทั้งหมดออก ดังตัวอย่าง B จะได้ 4-5-1

8.3.3 ถ้าทำตามข้อ 8.3.1 และ 8.3.2 แล้วพบว่า dilution ที่เหลืออยู่มีจำนวนมากกว่า 3 dilutions ให้เลือกดังนี้

8.3.3.1 ถ้า dilution สูงสุดที่เหลืออยู่มีผลบวกครบทั้ง 5 หลอด และอยู่ในกลุ่มอีกสอง dilutions สูงสุดที่มีผลบวกไม่ครบ ให้เลือก dilution สูงสุดที่มีผลบวกไม่ครบ และอีก 2 dilutions ที่ต่ำกว่าถัดขึ้นมา

- ตามตัวอย่าง C พบว่า dilution สูงสุดที่ให้ผลบวกครบทั้ง 5 หลอด คือ 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในกลุ่มสอง dilutions สูงสุดที่มีผลบวกไม่ครบ คือ 0.01 มิลลิลิตร และ 0.001 มิลลิลิตร จึงเลือก dilution สูงสุดที่มีผลบวกไม่ครบ คือ 0.001 มิลลิลิตร และอีก 2 dilutions ที่ต่ำกว่าถัดขึ้นมา คือ 0.01 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร จะได้ 5-2-1



- ตามตัวอย่าง D พบว่า dilution สูงสุดที่ให้ผลบวกครบทั้ง 5 หลอด คือ 0.01 มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในกลุ่มสอง dilutions สูงสุดที่มีผลบวกไม่ครบ คือ 0.1 และ 0.001 มิลลิลิตร จึงเลือก dilution สูงสุดที่มีผลบวกไม่ครบ คือ 0.001 มิลลิลิตร และอีก 2 dilutions ที่ต่ำกว่าถัดไป คือ 0.01 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร จะได้ 4-5-1
- 8.3.3.2 หลังจากตัด dilution ต่ำสุดที่มีผลบวกครบทั้ง 5 หลอด และไม่มี dilution ที่ให้ผลบวกครบเหลืออยู่อีก ให้เลือก 2 dilutions ต่ำสุดที่มีผลบวก และรวมจำนวนหลอดบวกของ dilutions สูงขึ้นถัดไปเป็น dilution ที่สาม ดังตัวอย่าง E นั่นคือ เมื่อตัด dilution 10 มิลลิลิตรออกแล้ว ให้เลือก dilution 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร และรวม dilution ที่เหลือคือ 0.01 มิลลิลิตร และ 0.001 มิลลิลิตร เป็น dilution ที่ 3 จะได้ 4-4-1
- 8.3.3.3 ถ้าไม่มี dilution ใดเลยที่ให้ผลบวกครบทั้ง 5 หลอด ให้เลือก 2 dilutions ต่ำสุด และรวมจำนวนหลอดบวกของ dilutions ที่เหลืออยู่ให้เป็น dilution ที่ 3 ตามตัวอย่าง F พบว่า ไม่มี dilutions ใดมีผลบวกครบทุกหลอด จึงเลือก 2 dilutions ต่ำสุด คือ 10 และ 1 มิลลิลิตร และ dilution ที่ 3 เป็นผลรวมของจำนวนหลอดที่เหลือที่ให้ผลบวก คือ 0.1, 0.01 และ 0.001 มิลลิลิตร จะได้ 4-3-2
- 8.3.3.4 ถ้าทำตามข้อ 8.3.3.3 แล้วพบว่า dilution ที่สามมีจำนวนเกิน 5 หลอด ซึ่งไม่สามารถอ่านค่าในตารางที่ 2 ได้ ถือว่ากรณีนี้ไม่ปกติ ควรทดสอบตัวอย่างซ้ำ แต่ถ้าไม่มีตัวอย่างให้ตรวจซ้ำ ให้เลือก 3 dilutions ใหม่ โดยเลือก dilution สูงสุดที่มีหลอดบวกและอีก 2 dilutions ที่ต่ำกว่าถัดไป ตามตัวอย่าง G นั่นคือ ถ้าทำตามข้อ 8.3.3.3 จะเลือก dilutions 10, 1 มิลลิลิตร เป็น 2 dilutions แรก และรวมหลอดบวกของ dilutions 0.1, 0.01, 0.001 มิลลิลิตร เป็น dilution ที่ 3 จะได้ 4-3-6 จึงต้องเลือกใหม่ โดยเลือก dilution สูงสุดที่มีผลบวกคือ 0.001 มิลลิลิตร และอีก 2 dilutions ที่ต่ำกว่าถัดไป คือ 0.01 และ 0.1 มิลลิลิตร จะได้ 3-2-1 จากนั้นนำผลไปอ่านค่า MPN ในตารางที่ 2 ถ้าปริมาตรของตัวอย่างใน 3 dilutions ที่เลือกใหม่นี้แตกต่างจากที่กำหนดไว้ในตาราง ให้นำค่า MPN จากตารางไปคำนวณตามสูตรในข้อ 8.4



8.4 กรณีอ่านผลตามตารางที่ 2 (ภาคผนวก 3) ถ้า 3 dilutions ที่เลือก ไม่มีค่า MPN ในตาราง ให้ใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{MPN/100 มิลลิลิตร} = - \frac{230.3}{Z_s} \log_{10} \left(1 - \frac{X_s Z_s}{K \sum_{j=s}^{nj} Z_j} \right)$$

เมื่อ	j	=	แต่ละ dilution ที่เลือก
	s	=	dilution สูงสุดที่มีผลบวกอย่างน้อย 1 หลอด
	X_s	=	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวกของ dilution s
	n_j	=	จำนวนหลอดของ dilution j
	Z_j	=	ปริมาณตัวอย่างในแต่ละหลอดของ dilution j
	Z_s	=	ปริมาณตัวอย่างในแต่ละหลอดของ dilution s
	K	=	จำนวน dilution ที่เลือก

ตัวอย่าง ปริมาตรของตัวอย่าง 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลทดสอบ x – x – 3 – 0 – 0

ในที่นี้ dilution s คือ dilution ที่มีปริมาณตัวอย่างในแต่ละหลอด = 0.1 มิลลิลิตร
ค่าที่ใช้คำนวณคือ

$$Z_s = 0.1, X_s = 3, X_s Z_s = 0.1 \times 3 = 0.3$$

$$\begin{aligned} \sum n_j Z_j &= (0.1 \times 5) + (0.01 \times 5) + (0.001 \times 5) \\ &= 0.555 \end{aligned}$$

$$\text{ดังนั้น MPN/100 มิลลิลิตร} = - \frac{230.3}{0.1} \log_{10} \left(1 - \frac{0.3}{0.555} \right) = 780$$



8.5 กรณีที่จำนวนหลอดในแต่ละ dilution และ/หรือระดับเจือจาง (dilutions) ไม่ตรงตามตาราง MPN ในตารางที่ 2 สามารถประมาณค่า MPN ได้โดยปฏิบัติดังนี้

8.5.1 เลือก dilution ต่ำสุดที่ให้ผลบวกไม่ครบทุกหลอด

8.5.2 เลือก dilution สูงสุดที่ให้ผลบวกอย่างน้อย 1 หลอด

8.5.3 เลือกทุก dilutions ที่อยู่ระหว่าง ข้อ 8.5.1 และ ข้อ 8.5.2

8.5.4 คำนวณค่า MPN โดยใช้สูตรของ “Thomas” ค่า MPN ที่ได้เป็นค่าประมาณ (approximate value)

$$\text{สูตร } \text{MPN}/100 \text{ มิลลิลิตร (approx.)} = 100 \times P/(N \times T)^{1/2}$$

เมื่อ P = จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

N = ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร) ที่ให้ผลบวกทุกหลอด

T = ปริมาตรรวมของตัวอย่าง (มิลลิลิตร) ใน dilutions ที่เลือก

ตัวอย่างที่ 1

ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร/หลอด) 10 1 0.1 0.01 0.001

มีผลบวก 10/10, 10/10, 4/10, 1/10, 0/5

Dilutions ที่เลือก - - 4/10 1/10 -

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น MPN}/100 \text{ มิลลิลิตร (approx.)} &= 100 \times P/(N \times T)^{1/2} \\ &= 100 \times 5/(0.69 \times 1.1)^{1/2} \\ &= 500/0.87 = 570 \end{aligned}$$

ตัวอย่างที่ 2

ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร/หลอด) 10 1 0.1 0.01 0.001

มีผลบวก 10/10, 10/10, 10/10, 0/10, 0/10

Dilutions ที่เลือก - - 10/10 0/10 -

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น MPN}/100 \text{ มิลลิลิตร (approx.)} &= 100 \times P/(N \times T)^{1/2} \\ &= 100 \times 10/(0.1 \times 1.1)^{1/2} \\ &= 1,000/0.332 = 3,000 \end{aligned}$$



9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

E. coli/100 มิลลิลิตร พบ หรือ ไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) รายงานเป็น

9.2.1 Coliforms MPN/100 มิลลิลิตร หรือ Total coliforms MPN/100 มิลลิลิตร

9.2.2 Fecal coliforms MPN/100 มิลลิลิตร

9.2.3 *E. coli* MPN/100 มิลลิลิตร

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำ และน้ำแข็ง

10.3 ภาคผนวก 3 : ตารางที่ 1 ค่า MPN และขีดความเชื่อมั่นที่ 95% สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด

ตารางที่ 2 ค่า MPN และขีดความเชื่อมั่นที่ 95% สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 10, 1.0, 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง

10.4 ภาคผนวก 4 : ตารางที่ 3 ตัวอย่างการเลือกผลบวก 3 ระดับความเจือจางจากการเจือจาง 5 ระดับ เพื่อรายงานค่า MPN



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ (กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ)

1. Basal medium for lysine and ornithine decarboxylase tests

1.1 Basal medium according to the Moeller method

Peptone	5 กรัม
Beef extract	5 กรัม
Bromcresol purple (1.6%)	0.625 มิลลิลิตร
Cresol red (0.2%)	2.5 มิลลิลิตร
Glucose	0.5 กรัม
Pyridoxal	5 มิลลิกรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร pH 6.0-6.5

1.2 Basal medium according to the Falkow method

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Bromcresol purple (1.6%)	1 มิลลิลิตร
Glucose	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร pH 6.7-6.8

การใช้งาน

เลือกใช้ Basal medium ในข้อ 1.1 หรือ 1.2 ใดๆอย่างหนึ่ง แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกแบ่งใส่หลอดเกลียวตามปริมาณที่ต้องการ (หลอดควบคุม) ส่วนที่สองเติม L-lysine dihydrochloride ให้ได้ความเข้มข้น 1% ส่วนที่สามเติม L-ornithine dihydrochloride ให้ได้ความเข้มข้น 1% (สำหรับ Falkow method ให้เติม L-amino acid 0.5%) หลังจากเติม L-ornithine dihydrochloride ปรับ pH 6.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดเกลียว 3-4 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10 นาที



2. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth

Peptone	10 กรัม
Lactose	10 กรัม
Oxgall	20 กรัม
Brilliant green	0.0133 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาณที่ต้องการ แล้วใส่หลอดดักก๊าซลงในหลอด โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ระดับ 1/2 หรือ 2/3 ของหลอดดักก๊าซ หลังการฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 7.2 ± 0.2

3. Buffered glucose broth

Proteose peptone or equivalent peptone	7 กรัม
Glucose	5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที

4. Carbohydrate utilization broth (lactose, sorbitol, cellobiose)

Phenol red broth base	16 กรัม
Carbohydrate (lactose, sorbitol, cellobiose)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาณที่ต้องการโดยให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ระดับ 1/3 ของความยาวหลอด แล้วใส่หลอดดักก๊าซลงในหลอดฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที



5. EC medium

Tryptose หรือ trypticase	20 กรัม
Lactose	5 กรัม
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาณที่ต้องการ แล้วใส่หลอด durham ในหลอด โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ระดับ 1/2 หรือ 2/3 ของหลอดดักก๊าซ หลังการฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 12-15 นาที pH 6.9 ± 0.2

6. EC-MUG medium

Tryptose หรือ trypticase	20 กรัม
Lactose	5 กรัม
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.05 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาณที่ต้องการ (หลอดที่ใช้ต้องไม่เรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 6.9 ± 0.2



7. Lauryl tryptose (LST) broth ความเข้มข้น 1 เท่า และ 2 เท่า

Tryptose	20 หรือ (2 × 20) กรัม
Lactose	5 หรือ (2 × 5) กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75 หรือ (2 × 2.75) กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75 หรือ (2 × 2.75) กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 หรือ (2 × 5) กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1 หรือ (2 × 0.1) กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร สำหรับความเข้มข้นสองเท่า
ซึ่งส่วนประกอบแต่ละชนิดเป็นสองเท่า ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร
แบ่งใส่หลอด 10 มิลลิลิตร แล้วใส่หลอดดักก๊าซในหลอด โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ระดับ
1/2 หรือ 2/3 ของหลอดดักก๊าซหลังการฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 6.8 ± 0.2

8. LES Endo agar

Yeast extract	1.2 กรัม
Casitone or trypticase	3.7 กรัม
Thiopeptone or thiotone	3.7 กรัม
Tryptose	7.5 กรัม
Lactose	9.4 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	3.3 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	3.7 กรัม
Sodium desoxycholate	0.1 กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.05 กรัม
Sodium sulfite (Na_2SO_3)	1.6 กรัม
Basic fuchsin	0.8 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร



ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ที่มี 95% ethanol 20 มิลลิลิตร ต่อลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายใกล้เดือด (ห้มนำไป Autoclave) pH 7.2 ± 0.2 ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ $45^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ ทันทีกี เทใส่จานเพาะเชื้อให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร เก็บในตู้เย็น ระวังแสง ห้ามใช้ agar หลังจากเตรียมแล้ว 2 สัปดาห์

9. MacConkey agar

Peptone	17 กรัม
Proteose peptone	3 กรัม
Lactose	10 กรัม
Bile salts	1.5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Agar	13.5 กรัม
Neutral red	0.03 กรัม
Crystal violet	0.001 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ผ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.1 ± 0.2

10. Nutrient agar (NA)

Peptone	5 กรัม
Beef extract	3 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ผ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2 เอียงหลอดและปล่อยให้วุ้นแข็ง



11. Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) broth ใช้ชนิดสำเร็จรูป

12. Semi-solid medium for motility test

Beef extract	3 กรัม
Peptone	10 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Agar	4 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย แบ่งใส่หลอด 3 มิลลิลิตร (หลอดขนาด 13×100 mm) หรือ 8 มิลลิลิตร (หลอดขนาด 16×125 mm) ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4

13. Simmons' citrate agar

Ammonium dihydrogen phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Sodium citrate dihydrate	2 กรัม
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 กรัม
Agar	15 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 6.8 ± 0.2 เอียงหลอด และปล่อยให้เย็น



14. Tryptic soy agar (TSA)

Tryptone	15 กรัม
Soytone	5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

15. Tryptophan broth

Tryptone or trypticase	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

16. Buffered water

16.1 stock phosphate buffer solution

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ± 0.5 โดยใช้ 1 N NaOH
และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที หรือใช้การกรอง

16.2 magnesium chloride stock solution

magnesium chloride	
(MgCl_2 หรือ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	38 หรือ 81.1 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง magnesium chloride ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที



16.3 working solution

ปีเปิด stock phosphate buffer solution 1.25 มิลลิลิตร และ magnesium chloride stock solution 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH 7.2 ± 0.1 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

17. 0.1% peptone water

peptone	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตร ที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

สารเคมี (กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ)

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. Kovac's reagent

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5 กรัม
Hydrochloric acid เข้มข้น	25 มิลลิลิตร
Isoamyl (or amyl) alcohol	75 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน

3. Methyl red indicator solution

Methyl red	0.1 กรัม
95% Ethyl alcohol	300 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	500 มิลลิลิตร

(ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)

ละลาย methyl red ใน 95% ethyl alcohol ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง



4. Mineral oil ใช้ชนิดสำเร็จรูปฆ่าเชื้อที่ 121°C 30-60 นาที ขึ้นกับขนาดภาชนะที่ใช้บรรจุ

5. Naphthol solution (5%)

Purified α -naphthol 5 กรัม

(melting point 92.5°C หรือสูงกว่า)

Absolute ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร

ละลาย α -naphthol ใน absolute ethyl alcohol เก็บสารละลายที่เตรียมแล้วที่อุณหภูมิ $5-10^{\circ}\text{C}$ ได้นาน 2 สัปดาห์

6. Oxidase reagent

N, N, N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine 1 กรัม

dihydrochloride ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$)

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียมใหม่ก่อนใช้ หรือเก็บในอุณหภูมิแช่เย็นได้นานไม่เกิน 1 สัปดาห์

7. Potassium hydroxide, 7N

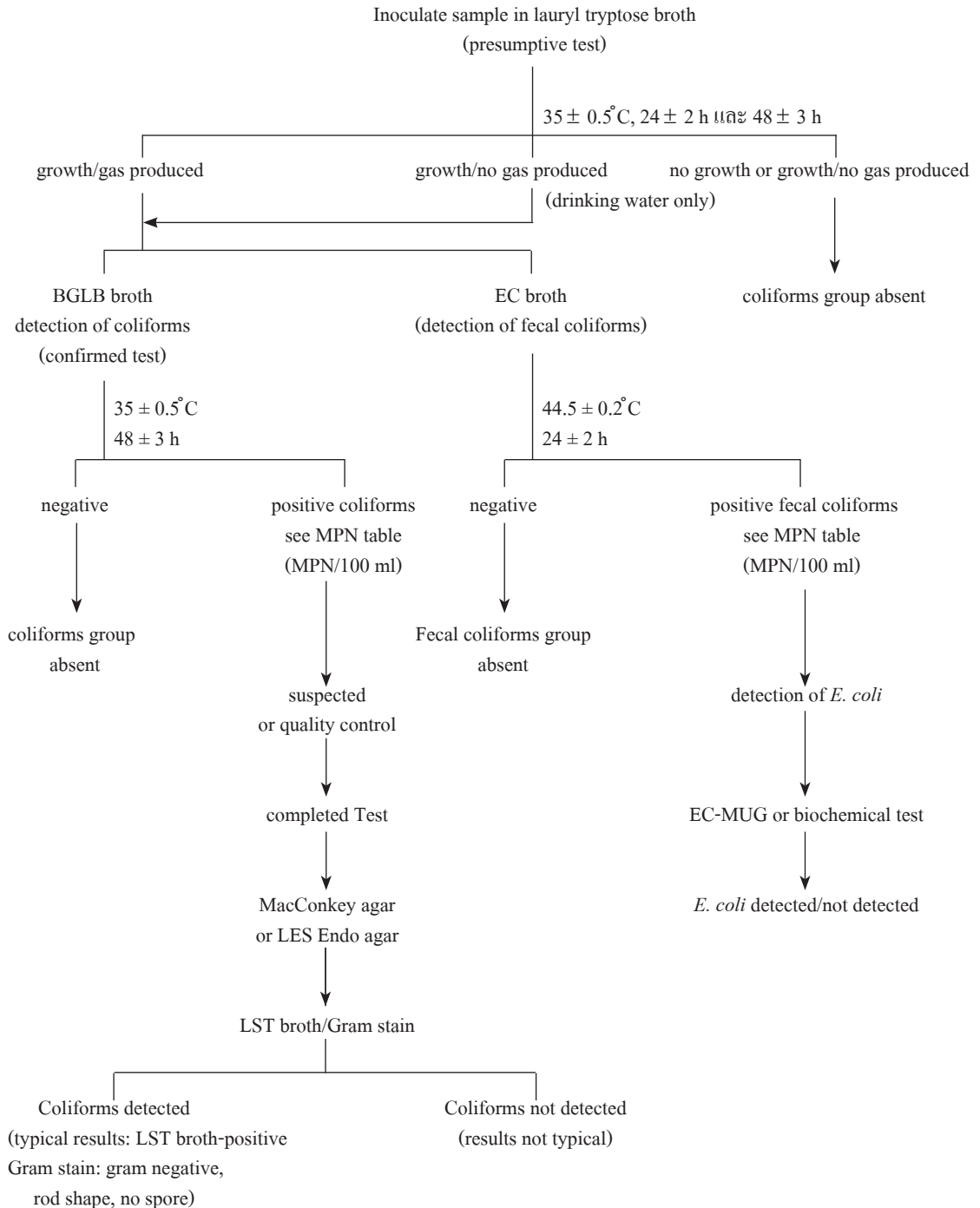
Potassium hydroxide (KOH) 40 กรัม

น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร

ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง



ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำและน้ำแข็ง



ภาคผนวก 3

ตาราง MPN

ตารางที่ 1 ค่า MPN และขีดความเชื่อมั่นที่ 95% สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร
จำนวน 10 หลอด

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่นที่ระดับ 95%	
		ต่ำสุด	สูงสุด
0	<1.1	-	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	>23	13	-



ตาราง MPN

ตารางที่ 2 ค่า MPN และขีดความเชื่อมั่นที่ 95% สำหรับผลบวกและผลลบเมื่อใช้ตัวอย่าง 10, 1.0, 0.1 มิลลิลิตรจำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง

จำนวนหลอด ที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่นที่ ระดับ 95%		จำนวน หลอด ที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่น ที่ระดับ 95%	
		ต่ำสุด	สูงสุด			ต่ำสุด	สูงสุด
0-0-0	<1.8	-	6.8	2-1-1	9.2	3.4	22
0-0-1	1.8	0.090	6.8	2-1-2	12	4.1	26
0-1-0	1.8	0.090	6.9	2-2-0	9.3	3.4	22
0-1-1	3.6	0.70	10	2-2-1	12	4.1	26
0-2-0	3.7	0.70	10	2-2-2	14	5.9	36
0-2-1	5.5	1.8	15	2-3-0	12	4.1	26
0-3-0	5.6	1.8	15	2-3-1	14	5.9	36
1-0-0	2.0	0.10	10	2-4-0	15	5.9	36
1-0-1	4.0	0.70	10	3-0-0	7.8	2.1	22
1-0-2	6.0	1.8	15	3-0-1	11	3.5	23
1-1-0	4.0	0.71	12	3-0-2	13	5.6	35
1-1-1	6.1	1.8	15	3-1-0	11	3.5	26
1-1-2	8.1	3.4	22	3-1-1	14	5.6	36
1-2-0	6.1	1.8	15	3-1-2	17	6.0	36
1-2-1	8.2	3.4	22	3-2-0	14	5.7	36
1-3-0	8.3	3.4	22	3-2-1	17	6.8	40
1-3-1	10	3.5	22	3-2-2	20	6.8	40
1-4-0	10	3.5	22	3-3-0	17	6.8	40
2-0-0	4.5	0.79	15	3-3-1	21	6.8	40
2-0-1	6.8	1.8	15	3-3-2	24	9.8	70
2-0-2	9.1	3.4	22	3-4-0	21	6.8	40
2-1-0	6.8	1.8	17	3-4-1	24	9.8	70



ตาราง MPN (ต่อ)

จำนวนหลอด ที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่นที่ ระดับ 95%		จำนวน หลอด ที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่น ที่ระดับ 95%	
		ต่ำสุด	สูงสุด			ต่ำสุด	สูงสุด
3-5-0	25	9.8	70	4-5-1	48	15	120
4-0-0	13	4.1	35	5-0-0	23	6.8	70
4-0-1	17	5.9	36	5-0-1	31	10	70
4-0-2	21	6.8	40	5-0-2	43	14	100
4-0-3	25	9.8	70	5-0-3	58	22	150
4-1-0	17	6.0	40	5-1-0	33	10	100
4-1-1	21	6.8	42	5-1-1	46	14	120
4-1-2	26	9.8	70	5-1-2	63	22	150
4-1-3	31	10	70	5-1-3	84	34	220
4-2-0	22	6.8	50	5-2-0	49	15	150
4-2-1	26	9.8	70	5-2-1	70	22	170
4-2-2	32	10	70	5-2-2	94	34	230
4-2-3	38	14	100	5-2-3	120	36	250
4-3-0	27	9.9	70	5-2-4	150	58	400
4-3-1	33	10	70	5-3-0	79	22	220
4-3-2	39	14	100	5-3-1	110	34	250
4-4-0	34	14	100	5-3-2	140	52	400
4-4-1	40	14	100	5-3-3	170	70	400
4-4-2	47	15	120	5-3-4	210	70	400
4-5-0	41	14	100	5-4-0	130	36	400



ตาราง MPN (ต่อ)

จำนวนหลอด ที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่นที่ ระดับ 95%		จำนวน หลอด ที่ให้ผลบวก	MPN/100 มิลลิลิตร	ขีดความเชื่อมั่น ที่ระดับ 95%	
		ต่ำสุด	สูงสุด			ต่ำสุด	สูงสุด
5-4-1	170	58	400	5-5-1	350	100	1100
5-4-2	220	70	440	5-5-2	540	150	1700
5-4-3	280	100	710	5-5-3	920	220	2600
5-4-4	350	100	710	5-5-4	1600	400	4600
5-4-5	430	150	1100	5-5-5	>1600	700	-
5-5-0	240	70	710				



ภาคผนวก 4

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการเลือกผลบวก 3 ระดับความเจือจางจากการเจือจาง 5 ระดับ เพื่อรายงานค่า MPN

ตัวอย่าง	ปริมาตร มิลลิลิตร (mL)					Combination of positives	MPN Index No. /100 mL
	10	1	0.1	0.01	0.001		
A	5	5	1	0	0	5-1-0	$33 \times 10 / 1 = 330$
B	4	5	1	0	0	4-5-1	$48 \times 10 / 10 = 48$
C	5	2	5	2	1	5-2-1	$70 \times 10 / 0.1 = 7000$
D	4	5	4	5	1	4-5-1	$48 \times 10 / 0.1 = 4800$
E	5	4	4	0	1	4-4-1	$40 \times 10 / 1 = 400$
F	4	3	0	1	1	4-3-2	$39 \times 10 / 10 = 39$
G	4	3	3	2	1	3-2-1	$17 \times 10 / 0.1 = 1700$



**DMSc F 2016: วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ
 E. coli ในอาหาร**
**Analytical method of Coliforms, Fecal coliforms
and *E. coli* in food**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่ม coliforms กลุ่ม fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร
ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2002; updated 2013, Chapter 4 “Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria”. [ออนไลน์]. 2002; [สืบค้น 22 ธันวาคม 2557]. เข้าถึงได้ที่ <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>.
- 2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2010; Appendix: 2 Most Probable Number from Serial Dilutions. [ออนไลน์]. 2010; [สืบค้น 20 กุมภาพันธ์ 2558]. เข้าถึงได้ที่ <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
IMViC	=	indole, methyl red, Voges-Proskauer, citrate
Shellfish	=	สัตว์ทะเลมีเปลือกที่บริโภคเป็นอาหารได้ เช่น กุ้ง หอย ปู

4. หลักการ (Principle)

แบคทีเรียในกลุ่ม coliforms เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เกิดกรดและสร้างก๊าซที่อุณหภูมิ 35°C ภายใน 48 ชั่วโมง พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในระบบ



ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ใช้เป็นตัวบ่งชี้สัญลักษณ์ของน้ำและสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหาร ส่วน fecal coliforms หรือ thermotolerant coliforms เป็นกลุ่มย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม coliforms พบมากในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เกิดกรดและสร้างก๊าซที่อุณหภูมิ 44.5 ถึง 45.5°C ภายใน 24-48 ชั่วโมง อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้มาตรฐานสำหรับ shellfish และน้ำพาหะเลี้ยง shellfish สำหรับ *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งในกลุ่ม fecal coliforms นิยมใช้เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้สัญลักษณ์การผลิตอาหาร การจำแนก *E. coli* อาศัยหลักการทางชีวเคมีของปฏิกิริยา IMViC ตามปกติการตรวจวิเคราะห์ coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร มักใช้วิธีมาตรฐาน (conventional method) แต่เนื่องจากคุณสมบัติที่ *E. coli* มากกว่า 95% สามารถสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase (GUD) ซึ่งย่อย fluorogenic substrate เช่น 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) และให้สารเรืองแสง 4-methylumbelliferon (MU) ซึ่งเห็นเป็นสีน้ำเงิน ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร ในที่มืด ดังนั้นจึงอาจใช้หลักการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในการตรวจสอบเบื้องต้นและการตรวจยืนยัน เพื่อจำแนก *E. coli* จากกลุ่ม coliforms เช่น การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LST-MUG broth, EC-MUG broth, VRBA-MUG นอกจากนี้อาจใช้ chromogenic substrates อื่นแทน MUG สำหรับการตรวจวิเคราะห์ coliforms และ *E. coli* ได้เช่นกัน

การตรวจ coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหารแบ่งออกเป็น

4.1 การตรวจปริมาณ (enumeration) มี 2 วิธี คือ

4.1.1 วิธี MPN แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1.1.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase) นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสมอย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ระดับละ 3 หรือ 5 หลอด ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ เพื่อแยก coliforms ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้
- 4.1.1.2 การตรวจยืนยัน (confirmed phase) นำหลอดที่ให้ก๊าซไปตรวจยืนยัน coliforms และ fecal coliforms โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth)
- 4.1.1.3 การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase) แยกเชื้อและนำไปตรวจยืนยัน *E. coli* โดยทดสอบทางชีวเคมี



4.1.2 วิธี pour plate: coliforms และ *E. coli*

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง นำไปบ่ม นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ และนำไปตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี

4.2 การตรวจหา (detection): coliforms และ *E. coli*

ตรวจสอบเบื้องต้นโดยนำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ จำนวน 2 หลอดต่อระดับการเจือจาง และดำเนินการตามขั้นตอนการตรวจยืนยันและการตรวจขั้นสมบูรณ์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 2% Brilliant green lactose bile (BGLB) broth
- 5.1.2 EC broth
- 5.1.3 EC-MUG broth
- 5.1.4 Koser's citrate broth หรือ Simmons citrate agar
- 5.1.5 Lactose broth
- 5.1.6 Lauryl tryptose (LST) broth
- 5.1.7 Lauryl tryptose MUG (LST-MUG) broth
- 5.1.8 Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar
- 5.1.9 Methyl red-Voges Proskauer (MR-VP) broth
- 5.1.10 Plate count agar (PCA)
- 5.1.11 Tryptone (tryptophane) broth
- 5.1.12 Violet red bile agar (VRBA)
- 5.1.13 Violet red bile agar-MUG agar (VRBA-MUG)

5.2 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Butterfield's phosphate-buffered water (BPB) หรือ equivalent diluent เช่น 0.1% peptone water (กรณี shellfish ใช้ BPB หรือ 0.5% peptone water)

5.3 สารเคมี

- 5.3.1 Gram stain reagents
- 5.3.2 Kovacs' reagent
- 5.3.3 Methyl red indicator
- 5.3.4 Voges-Proskauer (VP) reagents



6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)
- 6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)
- 6.1.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (สำหรับ shellfish)
- 6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 6.1.9 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ และ $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 6.1.10 UV lamp ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตรไม่เกิน 6 วัตต์

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 โถปั่น (blender) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)
- 6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.4 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.6 ปิเปต (pipette)
- 6.2.7 หลอดทดลอง (test tube) พร้อมหลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากันกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม (กรณีมีตัวอย่างน้อยกว่า 50 กรัม ให้ใช้ตัวอย่างครึ่งหนึ่ง) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)



- 7.1.3 กรณีที่ตัวอย่างเป็นหอยสองฝา (bivalve molluscan shellfish) สดและแช่แข็ง [ไม่รวม crustaceans (crabs, lobsters, and shrimp) และเนื้อหอยแปรรูป เช่น ชุบเกล็ดขนมปัง (breaded) แกะเปลือก (shucked) และปรุงสุก (pre-cooked and heat-processed)] สุ่มตัวอย่างหอย 10-12 ตัว (ทั้งเนื้อและส่วนของเหลว น้ำหนัก รวม 200 กรัม) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ เทสารละลายสำหรับเจือจาง 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นนาน 2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:2
- 7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)
- เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับ เจือจาง ดังนี้
- 7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร หรือปริมาตร 9 เท่าลงใน ตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่น 30-60 วินาที หรือเครื่องตีผสมอาหาร 2 นาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (initial suspension หรือ primary dilution) กรณี 7.1.3 หลังจากเตรียมตัวอย่างเจือจาง 1:2 ให้เริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ภายใน 2 นาที โดยนับจากทำการเจือจางเป็น 1:10 ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง (BPB หรือ 0.5% peptone water) ปริมาตร 4 เท่า (เช่น ตัวอย่างเจือจาง 1:2 ปริมาณ 20 กรัม ใส่สารละลายสำหรับเจือจาง 80 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน
- 7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิ่เปิดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10
- 7.2.3 ปิ่เปิดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่าง ที่เจือจางตามต้องการ
- 7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหารโดยวิธี MPN: ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1
- 7.3.1 การตรวจสอบเบื้องต้น (presumptive phase)
- 7.3.1.1 ปิ่เปิดตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ใน LST broth (หรือ lactose broth) อย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ระดับ ความเจือจางละ 3 หลอด
- กรณีตัวอย่าง shellfish ปิ่เปิดตัวอย่างใส่ใน LST broth ระดับความเจือจาง ละ 5 หลอดโดยใส่ตัวอย่างที่เจือจาง 1:2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เทียบเท่า น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม) และตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่าตามลำดับ 1 มิลลิลิตร



อย่างน้อย 3 ระดับ (1:10, 1:100 และ 1: 1,000 ซึ่งเทียบเท่ากับน้ำหนักตัวอย่าง 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม ตามลำดับ)

7.3.1.2 บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง

7.3.1.3 อ่านและบันทึกผลหลอด LST broth

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ หรือเกิดฟองก๊าซเมื่อเขย่าหลอดเบาๆ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ถ้าให้ผลลบ บ่มเพิ่ม 24 ชั่วโมง อ่านและบันทึกผลที่ 48 ± 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ : กรณีตรวจปริมาณ *E. coli* ในอาหาร อาจใช้ LST-MUG broth แทน LST broth ได้ (ยกเว้นในหอยสองฝา เนื่องจากเนื้อหอยมี natural GUD activity ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงหรือผลบวกปลอม) บ่มที่ 35°C 24 ถึง 48 ± 2 ชั่วโมง อ่านผลเช่นเดียวกับ LST broth พร้อมทั้งสังเกตการเรืองแสงสีน้ำเงิน ภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร หลอดที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซและเรืองแสงสีน้ำเงิน) ให้ดำเนินการตรวจยืนยันต่อตามข้อ 7.3.4

7.3.2 การตรวจยืนยัน (confirmed phase) สำหรับ coliforms

7.3.2.1 นำ 1 loop ของแต่ละหลอด LST broth ที่ให้ผลบวก ถ่ายลงใน BGLB broth หลอดต่อหลอด (อาจถ่ายเชื้อโดยใช้แท่งไม้ปราศจากเชื้อแทน loop และกรณีที่พบฝ้าให้หลีกเลี่ยงส่วนของฝ้า)

7.3.2.2 บ่มที่ 35°C 48 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

7.3.2.3 อ่านและบันทึกผลจำนวนหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวก

7.3.2.4 นำค่าไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

7.3.3 การตรวจยืนยัน (confirmed phase) สำหรับ fecal coliforms

7.3.3.1 นำ 1 loop จาก LST broth ที่ให้ผลบวกแต่ละหลอดถ่ายลงใน EC broth หลอดต่อหลอด

7.3.3.2 บ่มที่ 45.5°C 24 ± 2 ชั่วโมง (กรณีตัวอย่าง shellfish บ่มที่ 44.5°C)

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ



ถ้าให้ผลลบ บ่มเพิ่ม 24 ชั่วโมง อ่านและบันทึกผลที่ 48 ± 2 ชั่วโมง

7.3.3.3 อ่านและบันทึกผลจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลบวก

7.3.3.4 นำค่าไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

หมายเหตุ กรณีตรวจปริมาณ *E. coli* ในเนื้อหอยเช่น หอยนางรม อาจใช้ EC-MUG broth แทนการใช้ EC broth ในขั้นตอน confirmed phase บ่มและอ่านผลเช่นเดียวกับ EC broth พร้อมทั้งสังเกตการเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรในที่มืด นำหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ และเรืองแสงสีน้ำเงิน) ดำเนินการตรวจขั้นสมบูรณ์ตามข้อ 7.3.4

7.3.4 การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase): *E. coli*

7.3.4.1 นำหลอด EC broth (หรือ EC-MUG broth หรือ LST-MUG broth) ที่ให้ผลบวกจี้ดบน L-EMB agar

7.3.4.2 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

7.3.4.3 เลือกโคโลนีลักษณะแบนและมีสีดำตรงกลาง มีหรือไม่มี metallic sheen 1-5 โคโลนี จากแต่ละจานเพาะเชื้อ จี้ดบน PCA slant

7.3.4.4 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

7.3.4.5 นำเชื้อจาก PCA slant มาย้อมสีแกรม กรณีที่พบเชื้อแกรมลบ รูปท่อนสั้น ให้นำไปทดสอบต่อ ดังนี้

7.3.4.5.1 ปฏิกริยา IMViC

◆ การทดสอบ indole

เขี่ยเชื้อลงใน tryptone broth บ่มที่ 35°C 24 ± 2 ชั่วโมง หยด Kovacs' reagent 0.2-0.3 มิลลิลิตร อ่านผล

ผลบวก : เกิดวงแหวนสีแดงด้านบน

ผลลบ : เกิดวงแหวนสีเหลือง

E. coli (biotype 1) ให้ผลบวก

สำหรับ *E. coli* (biotype 2) ให้ผลลบ

◆ การทดสอบ MR-VP reactive compounds

เขี่ยเชื้อลงใน MR-VP broth บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง

ถ่าย broth 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดปราศจากเชื้อ

หยด VP reagents (α -naphthol solution 0.6 มิลลิลิตร และ 40% KOH solution 0.2 มิลลิลิตร) เขย่า จากนั้นเติมเกล็ด



creatine เล็กน้อยเขย่าอีกครั้งแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ
2 ชั่วโมง อ่านผล

VP ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง
ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

E. coli ให้ผลลบ

สำหรับ MR ให้บ่ม MR-VP broth ต่ออีก 48 ± 2 ชั่วโมง

หยด methylred Indicator 5 หยด เขย่า อ่านผล

MR ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง
ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

E. coli ให้ผลบวก

◆ การทดสอบ citrate

เขี่ยเชื้อปริมาณเล็กน้อยลงใน Koser's citrate broth*

หรือนำเชื้อจิกบนผิวหน้าและ stab ลงใน Simmons citrate
agar** บ่มที่ 35°C 96 ชั่วโมง อ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นชัดเจน* หรือ เชื้อเจริญ
และอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็น
สีน้ำเงิน**

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น* หรือเชื้อไม่เจริญ/
เจริญเล็กน้อยและอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี**

E. coli ให้ผลลบ

7.3.4.5.2 การสร้างก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส

เขี่ยเชื้อลงใน LST broth อีกครั้ง เพื่อยืนยันการสร้างก๊าซ
บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง อ่านผลในหลอดดักก๊าซ

ผลบวก : เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ หรือเกิดฟองก๊าซ
เมื่อเขย่าหลอดเบาๆ

ผลลบ : ไม่เกิดก๊าซ

E. coli ให้ผลบวก

การสรุปผลว่าพบ *E. coli* ต้องพบเชื้อที่มีคุณสมบัติ ดังนี้

- 1) ใช้น้ำตาลแลคโตสและสร้างก๊าซ ภายใน 48 ชั่วโมง ที่ 35°C
- 2) พบเชื้อแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์



3) ให้ผลปฏิกิริยา IMViC รูปแบบ ++-- (biotype 1) หรือ -+-- (biotype 2)

หมายเหตุ อาจใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป เช่น API20E หรือ VITEK เพื่อตรวจจำแนก *E. coli* แทนการทดสอบปฏิกิริยา IMViC

7.3.4.6 บันทึกจำนวนหลอด EC broth ที่ได้ผลการตรวจยืนยันขั้นสมบูรณ์ว่าเป็น *E. coli*

7.3.4.7 นำค่าไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms และ *E. coli* ในอาหารโดยวิธี pour plate:

7.4.1 coliforms: ภาคผนวก 3 แผนภูมิที่ 2

7.4.1.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จาน

7.4.1.1.1 กรณีทั่วไป

- ◆ เท VRBA 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแข็ง
- ◆ เททับหน้าด้วย VRBA 5 มิลลิลิตร (เพื่อป้องกันเชื้อเจริญแผ่นผิวหน้าเย็น) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแข็ง

7.4.1.1.2 กรณีที่คาดว่าตัวอย่างมี injured หรือ stressed cell

- ◆ เท TSA 8-10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ± 0.5 ชั่วโมง
- ◆ เททับหน้าด้วย VRBA 8-10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแข็ง

7.4.1.2 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง (กรณีตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม บ่มที่ 32°C)

7.4.1.3 เลือกจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 25-250 โคโลนี นับโคโลนีสีแดง-ม่วง ที่มีโซนล้อมรอบ (โซนเกิดจาก precipitated bile acids) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ± 0.5 มิลลิเมตร

7.4.1.4 ตรวจยืนยันโดยส้อมโคโลนีลักษณะเฉพาะอย่างน้อย 10 โคโลนี ใส่ในหลอด BGLB broth (1 โคโลนีต่อหลอด)

7.4.1.5 บ่มที่ 35°C อ่านผลการเกิดก๊าซที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

7.4.1.6 บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

(กรณีหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวกพบฝ้า ให้ข้อมสแกรมจาก broth เพื่อให้แน่ใจว่าก๊าซที่เกิดขึ้น มิได้เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้)



7.4.2 *E. coli*: ภาคผนวก 4 แผนภูมิที่ 3

7.4.2.1 เหมือนข้อ 7.4.1.1–7.4.1.2 เว้นแต่เทบ์หน้าด้วย VRBA-MUG แทน VRBA

7.4.2.2 นำจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 25-250 โคโลนี ไปส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตรในที่มืด และนับจำนวนโคโลนีที่มีการเรืองแสงสีน้ำเงินรอบโคโลนี

7.4.2.3 สุ่มโคโลนีที่ให้ผลบวกจากข้อ 7.4.2.2 อย่างน้อย 10 โคโลนี ไปทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีการตรวจขั้นสมบูรณ์ในข้อ 7.3.4.5

7.5 การตรวจหา (detection) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร : ภาคผนวก 5 แผนภูมิที่ 4

7.5.1 นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (เช่น 1:10 และ 1:100) ใส่ลง LST broth (หรือ lactose broth) จำนวน 2 หลอดต่อระดับความเจือจาง

7.5.2 เหมือนข้อ 7.3.1.2-7.3.1.3 และต่อด้วยข้อ 7.3.2.1-7.3.2.3 สำหรับการตรวจหา coliforms

7.5.3 เหมือนข้อ 7.3.1.2-7.3.1.3 ต่อด้วยข้อ 7.3.3.1-7.3.3.3 และข้อ 7.3.4.1-7.3.4.6 สำหรับการตรวจหา *E. coli*

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

8.1 การคำนวณกรณีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี MPN

8.1.1 นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก 6) จะได้ค่า MPN/ กรัม และช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับ 95% (95% confidence intervals)

8.1.2 กรณีจำนวนหลอดบวกไม่เป็นไปตามตาราง MPN ให้ใช้สูตรคำนวณ (Thomas, 1942) ดังนี้

$$\text{MPN/กรัม} = (\sum g_j) / (\sum t_j m_j \sum (t_j - g_j) m_j)^{(1/2)}$$

$$\sum g_j = \text{จำนวนหลอดทั้งหมดที่ให้ผลบวก}$$

$$\sum (t_j - g_j) m_j = \text{น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดที่ให้ผลลบ}$$

$$\sum t_j m_j = \text{น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดทั้งหมด}$$

ให้เลือกระดับความเจือจางสำหรับการคำนวณ โดยเลือกระดับความเจือจางต่ำสุดที่ให้ผลบวกไม่ครบทุกหลอด แล้วเลือกระดับความเจือจางสูงสุดที่มีผลบวกอย่างน้อย 1 หลอด จากนั้นเลือกทุกระดับความเจือจางที่อยู่ระหว่างสองระดับที่เลือกไว้แล้ว ดังตัวอย่างต่อไปนี้



ตัวอย่างที่ 1 ระดับความเจือจาง 1:1 1:10 1:100 1:1,000 1:10,000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 5/5 10/10 4/10 2/10 0/5
ในที่นี้ เลือกสองระดับความเจือจาง 1:100 และ 1:1,000 จะได้

$$\begin{aligned}\sum g_j &= 6 \\ \sum (t_j - g_j) m_j &= (6 \times 0.01) + (8 \times 0.001) \\ &= 0.068 \\ \sum t_j m_j &= (10 \times 0.01) + (10 \times 0.001) \\ &= 0.11\end{aligned}$$

แทนค่าในสูตร

$$\begin{aligned}\text{MPN/ กรัม} &= \frac{6}{\sqrt{(0.068)(0.011)}} \\ &= 6/0.086 \\ &= 70\end{aligned}$$

ตัวอย่างที่ 2 ระดับความเจือจาง 1:10 1:100 1:1,000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 2/3 0/3 3/3
ในที่นี้ เลือกทั้งสามระดับความเจือจาง จะได้

$$\begin{aligned}\sum g_j &= 5 \\ \sum (t_j - g_j) m_j &= (1 \times 0.1) + (3 \times 0.01) + (0 \times 0.001) \\ &= 0.13 \\ \sum t_j m_j &= (3 \times 0.1) + (3 \times 0.01) + (3 \times 0.001) \\ &= 0.333\end{aligned}$$

แทนค่าในสูตร

$$\begin{aligned}\text{MPN/ กรัม} &= \frac{5}{\sqrt{(0.13)(0.333)}} \\ &= 5/0.208 \\ &= 24\end{aligned}$$

8.1.3 การประมาณค่าขีดความเชื่อมั่น (95% confidence limits) ของผล MPN คำนวณจากค่า standard error ของ $\log_{10}(\text{MPN})$ ด้วยวิธีของ Haldane โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้



95% confidence intervals = Log MPN/กรัม $\pm$ (1.96) (standard error)

standard error คำนวณได้จาก Excel spreadsheet ตามเอกสารอ้างอิงข้อ 2.2

ตัวอย่าง	ระดับความเจือจาง	1:10	1:100	1:1,000
	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	2/3	0/3	3/3

$$\begin{aligned}\therefore \text{MPN/กรัม} &= 5 / \sqrt{(0.1 + 0.03 + 0.000) (0.3 + 0.03 + 0.003)} \\ &= 5 / \sqrt{(0.13) (0.333)} \\ &= 24\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}95\% \text{ confidence intervals} &= \log 24 \pm (1.96) (0.1973) \\ &= 1.3802 \pm 0.3867 \\ &= 0.9935 \text{ ถึง } 1.7669\end{aligned}$$

$$\text{Lower limit} = \text{antilog } 0.9935 = 9.9$$

$$\text{Upper limit} = \text{antilog } 1.7669 = 58.5$$

8.1.4 ในกรณีที่ระดับความเจือจางเริ่มต้นไม่ใช่ 1:10 (เท่ากับน้ำหนักตัวอย่าง 0.1 กรัม) สามารถหาค่า MPN ได้ดังนี้

$$\text{MPN/กรัม} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้จากตาราง} \times \text{ระดับความเจือจางกลาง (middle dilution)}}{100}$$

ตัวอย่าง	ระดับความเจือจาง	1: 1,000	1:10,000	1:100,000
	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	3/3	2/3	1/3
	ดังนั้น ค่าที่อ่านได้จากตาราง	= 150		
	ระดับความเจือจางกลาง	= 10,000		
	$\therefore$ MPN/ กรัม	= $\frac{150 \times 10,000}{100}$		
		= 15,000		



8.2 การคำนวณกรณีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี pour plate

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและนำไปตรวจยืนยันปรากฏว่าเป็น coliforms หรือ *E. coli* บางโคโลนีให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น coliforms หรือ *E. coli* ไปคูณจำนวนที่นับได้ และคูณด้วย dilution factor

ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ = 65 โคโลนี ที่ระดับการเจือจาง 1:10,000
ตรวจยืนยันพบว่าเป็น coliforms 4 จาก 5 โคโลนี ดังนั้น

$$\begin{aligned}\text{coliforms CFU/ กรัมหรือมิลลิลิตร} &= 65 \times (4/5) \times 10,000 \\ &= 520,000\end{aligned}$$

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

พบ/ไม่พบต่อน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่าง (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร)

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี MPN รายงานเป็น

Coliforms หรือ Fecal coliforms หรือ *E. coli* MPN/กรัมหรือมิลลิลิตร

หอยเชลล์ shellfish รายงาน MPN/100 กรัม

9.2.1 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate รายงานเป็น

จำนวน Coliforms หรือ *E. coli* CFU/น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร)

9.2.2 กรณีตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี pour plate ถ้าไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะของ coliforms หรือ *E. coli* หรือกรณีที่ยืนยันแล้วพบว่าไม่ใช่ coliforms ให้รายงานดังนี้

- ◆ ตัวอย่างของแข็งหรือของเหลวชั้นหนืดที่ระดับความเจือจางแรก ให้รายงานน้อยกว่า 10
- ◆ ตัวอย่างของเหลวที่ตัวอย่างเริ่มต้น ให้รายงานน้อยกว่า 1 หรือไม่พบ



10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms, fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร โดยวิธี MPN
- 10.3 ภาคผนวก 3 : แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms ในอาหาร โดยวิธี pour plate
- 10.4 ภาคผนวก 4 : แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *E. coli* ในอาหาร โดยวิธี pour plate
- 10.5 ภาคผนวก 5 : แผนภูมิที่ 4 การตรวจหา (detection) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร
- 10.6 ภาคผนวก 6 : ตารางที่ 1 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 3 หลอดต่อระดับการเจือจาง
ตารางที่ 2 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. 2% Brilliant green lactose bile (BGLB) broth

Peptone	10 กรัม
Lactose	10 กรัม
Oxgall	20 กรัม
Brilliant green	0.0133 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดัดกักอากาศว่าอยู่ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 7.2 ± 0.2

2. EC broth

Tryptose หรือ trypticase	20 กรัม
Lactose	5 กรัม
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดัดกักอากาศว่าอยู่ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 6.9 ± 0.2



3. EC-MUG broth

Tryptose หรือ trypticase	20 กรัม
Lactose	5 กรัม
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.05 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ (หลอดที่ใช้ต้องไม่เรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 365 นาโนเมตร) ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 6.9 ± 0.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 สัปดาห์ หรือเก็บในตู้เย็นได้นาน 1 เดือน

4. Koser's citrate broth

Sodium ammonium hydrogen phosphate ($N_4NH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	1.5 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (monobasic)	1 กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 กรัม
Sodium citrate $\cdot 2H_2O$	3 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 6.7 ± 0.2



5. Lactose broth

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Lactose	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

6. Lauryl sulphate tryptose broth (LSTbroth)

Tryptose	20 กรัม
Lactose	5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด
ทดลองที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 12-15 นาที pH 6.8 ± 0.2



7. Lauryl tryptose MUG (LST-MUG) broth

Tryptose	20 กรัม
Lactose	5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Sodium lauryl sulfate	0.1 กรัม
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.05 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆ (ถ้าจำเป็น) แบ่ง 10 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่มีหลอดค้ำก๊าซคว่ำอยู่ ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

8. Levine eosin methylene blue (L-EMB) agar

Peptone	10 กรัม
Lactose	10 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2 กรัม
Agar	15 กรัม
Eosin Y	0.4 กรัม
Methylene blue	0.065 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย แบ่งใส่ขวดตามปริมาณที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 7.1 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ



9. Methyl red-Voges Proskauer (MR-VP) broth

สูตร 1

Buffered peptone-water powder (Difco or BBL)	7 กรัม
Glucose	5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆ (ถ้าจำเป็น)
แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด ฆ่าเชื้อที่ $118-121^{\circ}C$ 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

สูตร 2

Pancreatic digest of casein	3.5 กรัม
Peptic digest of animal tissue	3.5 กรัม
Dextrose	5 กรัม
Potassium phosphate (K_3PO_4)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆ (ถ้าจำเป็น)
แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด ฆ่าเชื้อที่ $118-121^{\circ}C$ 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

สูตร 3

Peptone	5 กรัม
Glucose	5 กรัม
Phosphate buffer	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 10 มิลลิลิตร ใส่หลอด
ฆ่าเชื้อที่ $121^{\circ}C$ 15 นาที pH 7.5 ± 0.2



10. Plate count agar

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose	1 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

11. Simmons citrate agar

Ammonium dihydrogen phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Sodium citrate dihydrate	2 กรัม
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 กรัม
Agar	15 กรัม
Bromthymol blue	0.08 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนอ่อนๆ พร้อมเขย่า เป็นครั้งคราว คัมเดือคนาน 1-2 นาทีจน agar ละลาย แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที เอียงหลอดและปล่อยให้เย็นแข็ง pH 6.8 ± 0.2



12. Tryptone broth

Tryptone or trypticase	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย Tryptone or trypticase ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 5 มิลลิลิตร
ใส่หลอด นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

13. Violet red bile agar (VRBA)

Peptone or gelysate	7 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Bile salts or bile salts No. 3	1.5 กรัม
Lactose	10 กรัม
Neutral red	0.03 กรัม
Crystal violet	0.002 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้
เข้ากัน ปรับ pH 7.4 ± 0.2 ต้มให้เดือดนาน 2 นาที ทำให้เย็นลงที่ 45°C ก่อนนำไปใช้



14. Violet red bile-MUG (VRBA-MUG) agar

Peptone or gelysate	7 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Bile salts or bile salts No. 3	1.5 กรัม
Lactose	10 กรัม
Neutral red	0.03 กรัม
Crystal violet	0.002 กรัม
4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide (MUG)	0.1 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 7.4 ± 0.2 ต้มให้เดือดนาน 2 นาที ทำให้เย็นลงที่ 45°C ก่อนนำไปใช้

15. Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB)

15.1 stock solution

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 โดยใช้ 1 N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หม่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

15.2 dilution blanks

ปิเปต stock solution 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ หม่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที



16. 0.1% peptone water

peptone	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

17. 0.5% peptone water

peptone	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Gram stain reagents

ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. Kovacs' reagent

<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	5 กรัม
Amyl alcohol (normal only)	75 มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (HCl)	25 มิลลิลิตร

ละลาย *p*-dimethylaminobenzaldehyde ใน normal amyl alcohol ค่อยๆ เติม HCl เก็บที่อุณหภูมิ 4°C



3. Methyl red solution

Methyl red	0.1 กรัม
Ethyl alcohol 95%	300 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	500 มิลลิลิตร

ละลาย methyl red ใน 95% ethyl alcohol ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง

4. VP reagents

Solution 1

α -Naphthol	5 กรัม
Alcohol (absolute)	100 มิลลิลิตร

ละลาย α -Naphthol ใน alcohol

Solution 2

Potassium hydroxide (KOH)	40 กรัม
น้ำกลั่น (ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)	100 มิลลิลิตร

ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

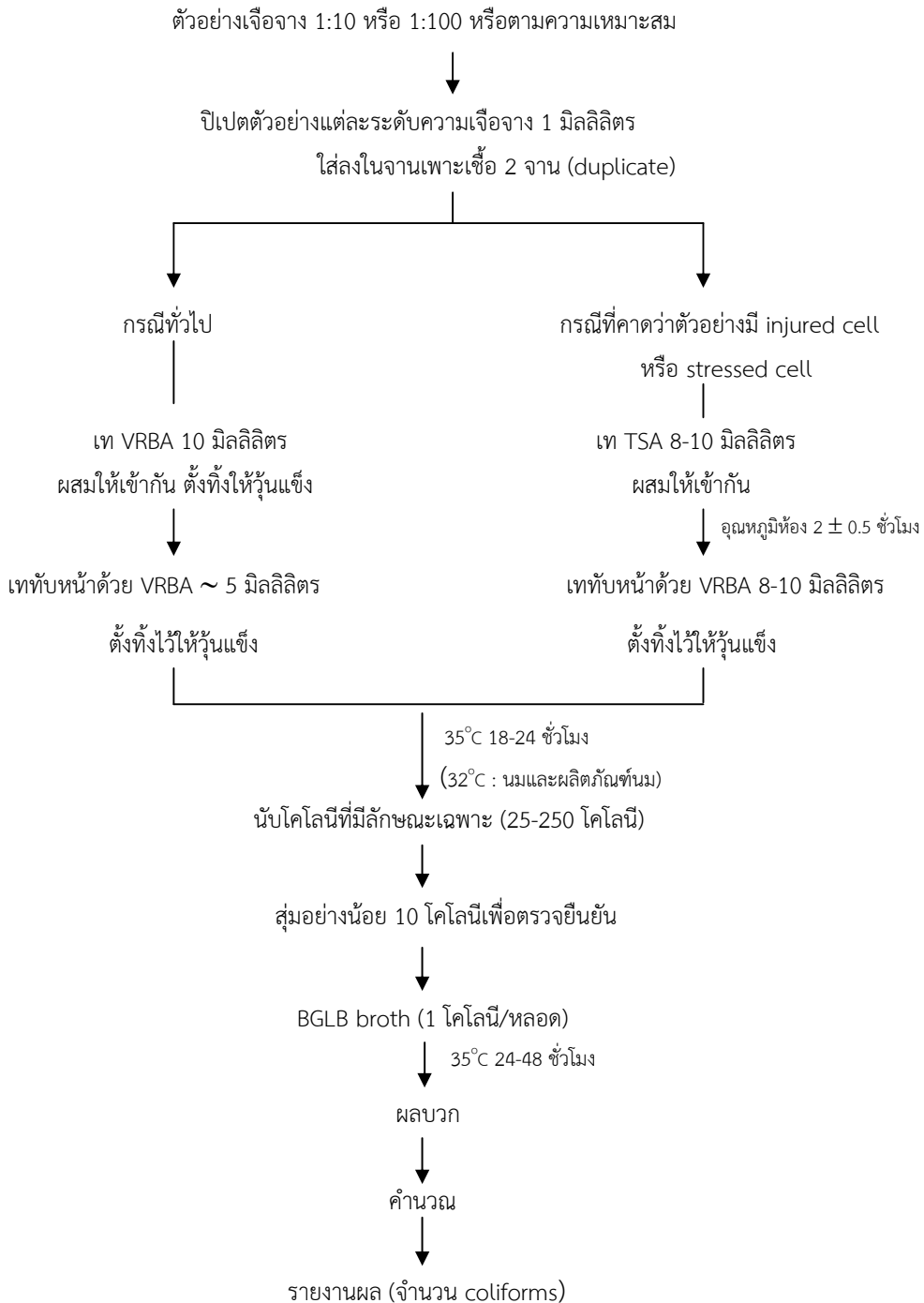
ตัวอย่างเงาจากอย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน (เช่น 1:10, 1:100 และ 1:1,000)



143



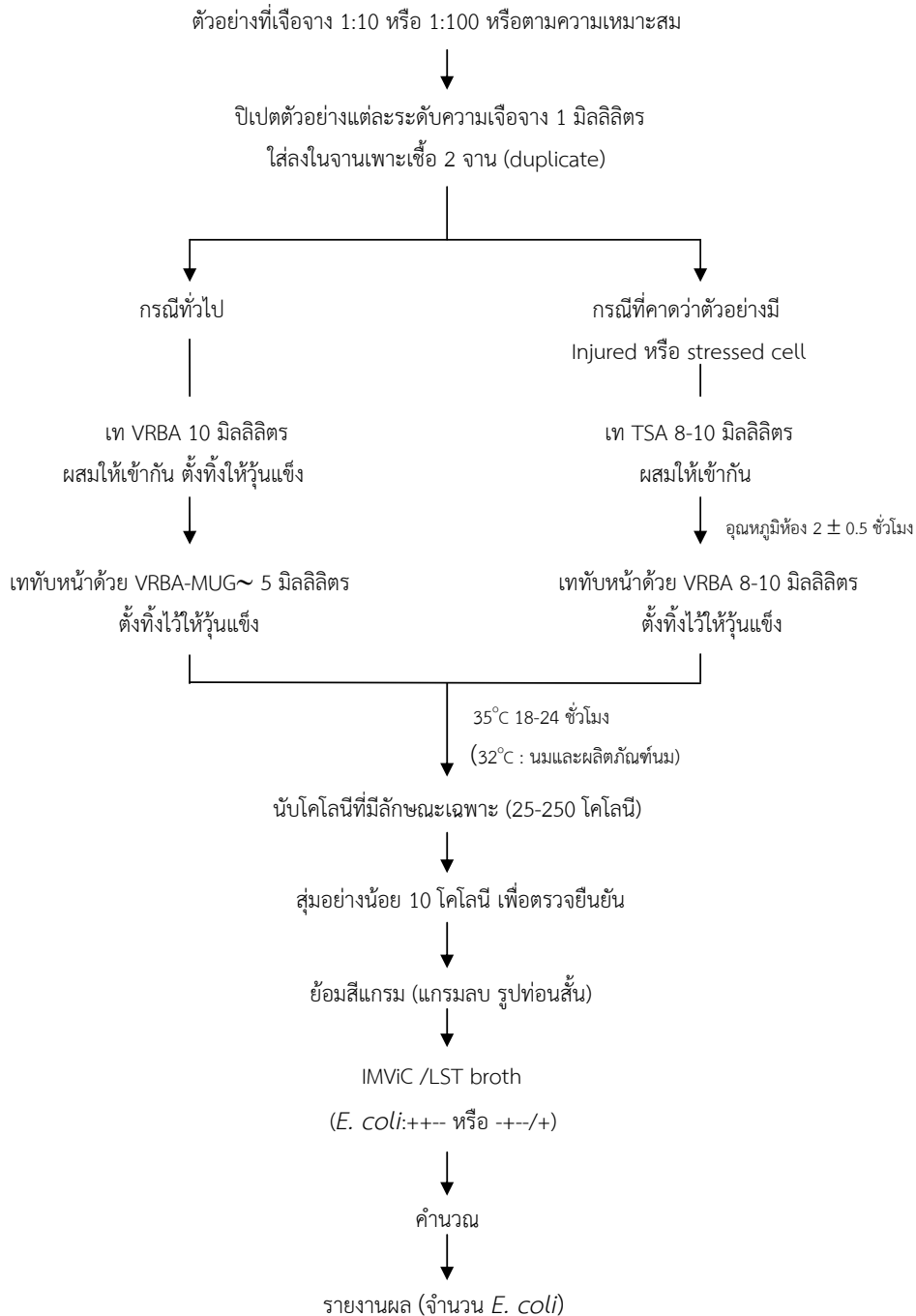
ภาคผนวก 3



แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) coliforms ในอาหารโดยวิธี pour plate



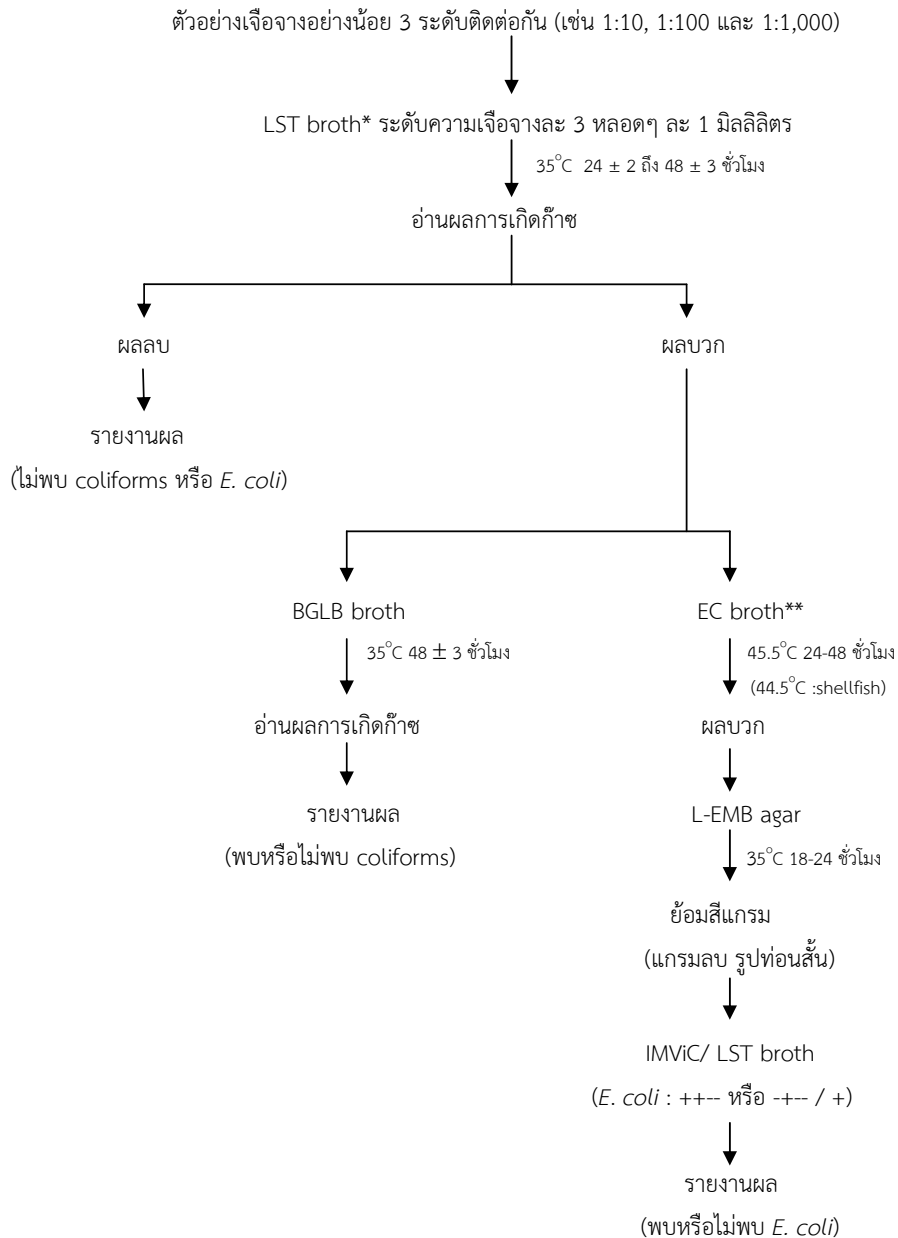
ภาคผนวก 4



แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *E. coli* ในอาหาร โดยวิธี pour plate



ภาคผนวก 5



* กรณีตรวจ *E. coli* ในอาหารแช่เย็น/แช่แข็ง (ไม่รวมหอย 2 ฝา) ใช้ LST - MUG broth ได้

** กรณีตรวจ *E. coli* ในเนื้อหอย เริ่มต้นวิเคราะห์ โดยใช้ EC-MUG broth ได้

ทั้ง 2 กรณีต้องตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed phase)

แผนภูมิที่ 4 การตรวจหา (detection) coliforms และ *E. coli* ในอาหาร



ภาคผนวก 6

ตาราง MPN

ตารางที่ 1 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 3 หลอดต่อระดับการเจือจาง

Positive tubes			MPN/g	Confidence limits		Positive tubes			MPN/g	Confidence limits	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--



ตาราง MPN

ตารางที่ 2 ค่า MPN และ Confidence limits สำหรับผลบวกและผลลบ เมื่อใช้ตัวอย่าง 0.1, 0.01, 0.001 กรัม จำนวน 5 หลอดต่อระดับการเจือจาง

Positive tubes			MPN/g	Confidence limits		Positive tubes			MPN/g	Confidence limits	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<1.8	--	6.8	2	3	0	12	4.1	26
0	0	1	1.8	0.09	6.8	2	3	1	14	5.9	36
0	1	0	1.8	0.09	6.9	2	4	0	15	5.9	36
0	1	1	3.6	0.7	10	3	0	0	7.8	2.1	22
0	2	0	3.7	0.7	10	3	0	1	11	3.5	23
0	2	1	5.5	1.8	15	3	0	2	13	5.6	35
0	3	0	5.6	1.8	15	3	1	0	11	3.5	26
1	0	0	2	0.1	10	3	1	1	14	5.6	36
1	0	1	4	0.7	10	3	1	2	17	6	36
1	0	2	6	1.8	15	3	2	0	14	5.7	36
1	1	0	4	0.7	12	3	2	1	17	6.8	40
1	1	1	6.1	1.8	15	3	2	2	220	6.8	40
1	1	2	8.1	3.4	22	3	3	0	17	6.8	40
1	2	0	6.1	1.8	15	3	3	1	21	6.8	40
1	2	1	8.2	3.4	22	3	3	2	24	9.8	70
1	3	0	8.3	3.4	22	3	4	0	21	6.8	40
1	3	1	10	3.5	22	3	4	1	24	9.8	70
1	4	0	11	3.5	22	3	5	0	25	9.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	4	0	0	13	4.1	35
2	0	1	6.8	1.8	15	4	0	1	17	5.9	36
2	0	2	9.1	3.4	22	4	0	2	21	6.8	40
2	1	0	6.8	1.8	17	4	0	3	25	9.8	70
2	1	1	9.2	3.4	22	4	1	0	17	6	40
2	1	2	12	4.1	26	4	1	1	21	6.8	42



ตาราง MPN (ต่อ)

Positive tubes			MPN/g	Confidence limits		Positive tubes			MPN/g	Confidence limits	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
4	2	0	22	6.8	50	5	2	1	70	22	170
4	2	1	26	9.8	70	5	2	2	94	34	230
4	2	2	32	10	70	5	2	3	120	36	250
4	2	3	38	14	100	5	2	4	150	58	400
4	3	0	27	9.9	70	5	3	0	79	22	220
4	3	1	33	10	70	5	3	1	110	34	250
4	3	2	39	14	100	5	3	2	140	52	400
4	4	0	34	14	100	5	3	3	180	70	400
4	4	1	40	14	100	5	3	4	210	70	400
4	4	2	47	15	120	5	4	0	130	36	400
4	5	0	41	14	100	5	4	1	170	58	400
4	5	1	48	15	120	5	4	2	220	70	440
5	0	0	23	6.8	70	5	4	3	280	100	710
5	0	1	31	10	70	5	4	4	350	100	710
5	0	2	43	14	100	5	4	5	430	150	1100
5	0	3	58	22	150	5	5	0	240	70	710
5	1	0	33	10	100	5	5	1	350	100	1100
5	1	1	46	14	120	5	5	2	540	150	1700
5	1	2	63	22	150	5	5	3	920	220	2600
5	1	3	84	34	220	5	5	4	1600	400	4600
5	2	0	49	15	150	5	5	5	>1600	700	--



DMSc F 2017: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Clostridium botulinum* ในอาหาร
Analytical method of *Clostridium botulinum* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Clostridium botulinum* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001; Chapter 17
“*Clostridium botulinum*”. [ออนไลน์]. 2001 [สืบค้น 20 กุมภาพันธ์ 2558] เข้าถึงได้ที่
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- | | | | |
|-----|-------------------------|---|--|
| 3.1 | <i>C. botulinum</i> | = | <i>Clostridium botulinum</i> |
| 3.2 | Proteolytic bacteria | = | แบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน |
| 3.3 | Nonproteolytic bacteria | = | แบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยโปรตีน |

4. หลักการ (Principle)

C. botulinum เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strict anaerobe) ติดสีแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ก่อนไปทางปลายเซลล์ พบได้ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมทั่วไป สปอร์สามารถทนต่อความร้อนทำให้สปอร์ยังคงหลงเหลืออยู่ในอาหารที่ผลิตโดยใช้ความร้อนไม่เพียงพอ เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม สปอร์จะงอกเจริญเป็น vegetative cell และสร้างสารพิษที่เรียก botulin toxin Antigenic type ของ *C. botulinum* แบ่งเป็น type A, B, C, D, E, F และ G การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ cooked meat medium หรือ chopped liver broth สำหรับ *C. botulinum* สายพันธุ์ proteolytic และใช้ trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth สำหรับสายพันธุ์ nonproteolytic
- 4.2 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง
- 4.3 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยัน



5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Anaerobic egg yolk agar

5.1.2 Chopped liver broth

5.1.3 Cooked meat medium (CMM)

5.1.4 Gel-phosphate buffer, pH 6.2

5.1.5 Liver-veal-egg yolk agar

5.1.6 Trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth (TPGY)

5.1.7 Trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth with trypsin (TPGYT)

5.2 สารเคมี

5.2.1 Absolute ethanol

5.2.2 Gram stain reagents

5.2.3 Trypsin (เตรียมจาก Difco 1:250)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 ตู้บเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic incubator) 35°C

6.1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.3 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) 28°C และ 35°C

6.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 แผ่นกระจกทาบหน้า (coverslip)

6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 หัวงและเข็มเปียเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 โกร่งและทีบด (mortar and pestle)

6.2.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.7 ปิเปต (pipette)



- 6.2.8 หลอดฝาเกลียว (screw-cap tube)
- 6.2.9 ถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)
- 6.2.10 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เท หรือ ปิเปิดตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ และเขย่าให้เข้ากัน

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างอาหารจากข้อ 7.1.1 โดยไม่ให้มีส่วนของของเหลวหรือมีน้อยที่สุดใส่ในโถงปราศจากเชื้อเดิม gel-phosphate buffer ในปริมาตรที่เท่ากันบดด้วยที่บดปราศจากเชื้อ หรือใส่ตัวอย่างในถุงตีผสมอาหารเดิม gel-phosphate buffer ในปริมาตรที่เท่ากันผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการตีผสมอาหารด้วยมือ หรืออาจใช้ปากกิบปราศจากเชื้อ คีบตัวอย่างชิ้นเล็กๆ จากข้อ 7.1.1 หรือปิเปิดตัวอย่างจากข้อ 7.1.2 ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment)

อาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนนี้ต้องดม้โล่อากาศ 10-15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ก่อนใช้งาน ห้ามเขย่า

- 7.3.1 เติมตัวอย่างอาหารแข็ง 1-2 กรัม หรือปิเปิดตัวอย่างอาหารเหลว 1-2 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างจากข้อ 7.2 ใส่ใน CMM ปริมาตร 15 มิลลิลิตร 2 หลอด และ TPGY 2 หลอด ปล่อยตัวอย่างช้าๆ ได้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้ตัวอย่างอยู่บริเวณก้นหลอด ถ้าสงสัยว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ nonproteolytic ชนิด B, E หรือ F อาจใช้ TPGYT แทน TPGY

- 7.3.2 บ่ม CMM ที่ 35°C 5 วัน และ TPGY หรือ TPGYT ที่ 28°C 5 วัน

- 7.3.3 นำหลอดจากข้อ 7.3.2 มาตรวจสอบความขุ่น ก๊าซ กลิ่น การย่อยของเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ และย้อมสีแกรม หรือทำ wet mount ถ้าเป็น *C. botulinum* ติดสีแกรมบวก



รูปท่อน สร้างสปอร์ก่อนไปทางปลายเซลล์ทำให้เซลล์มีรูปร่างคล้ายไม้เทนนิส
ถ้าไม่พบการเจริญของเชื้อให้บ่มเพิ่มอีก 10 วัน

7.4 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation) มี 2 ขั้นตอน

7.4.1 Pre-treatment of specimens for streaking ทำได้ 2 วิธี

7.4.1.1 ใช้ absolute ethanol ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (โดยการกรอง) ปิเปต 1 หรือ 2 มิลลิลิตรจาก enrichment culture ข้อ 7.3.3 ใส่ในหลอดฝาเกลียวปราศจากเชื้อ หรือกรณีต้องการแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารโดยตรงให้นำตัวอย่าง 1 หรือ 2 มิลลิลิตรหรือกรัม จากข้อ 7.1.1 หรือ 7.1.2 ใส่ในหลอดฝาเกลียวปราศจากเชื้อ เติม absolute ethanol ในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

7.4.1.2 ใช้ความร้อน (เป็นวิธีทางเลือก) โดยปิเปต 1 หรือ 2 มิลลิลิตรจาก enrichment culture ข้อ 7.3.3 หรือกรณีต้องการแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารโดยตรงให้นำตัวอย่าง 1 หรือ 2 มิลลิลิตรหรือกรัม จากข้อ 7.1.1 หรือ 7.1.2 ให้ ความร้อน 80°C 10-15 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell (ไม่ใช่วิธีนี้กับ *C. botulinum* สายพันธุ์ nonproteolytic)

7.4.2 Plating of treated cultures นำเชื้อ (จากข้อ 7.4.1.1 หรือ 7.4.1.2) จีดยบน liver-veal-egg yolk agar หรือ anaerobic egg yolk agar หรือทั้งสองชนิด หากจำเป็น ให้เจือจางปริมาณเชื้อเพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว

7.4.3 บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

7.4.4 เลือกโคโลนีที่สงสัยประมาณ 10 โคโลนีที่มีสีเหลืองอ่อนเหลืองเหมือนไข่มุก (pearly layer) นูนหรือแบน ผิวเรียบหรือหยาบ โดยทั่วไปโคโลนีแผ่กระจาย ลักษณะ ขอบไม่เรียบ นอกจาก pearly zone แล้วโคโลนีของ *C. botulinum* type C, D และ E จะล้อมรอบด้วยโซนสีเหลืองขนาด 2-4 มิลลิเมตร ส่วน type A และ B จะมีโซนขนาดเล็กกว่า

7.5 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmation)

เมื่อพบลักษณะโคโลนีที่สงสัยให้ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้



8. การรายงานผล (Expression of results)

C. botulinum/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *C. botulinum* ในอาหาร



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Anaerobic egg yolk agar

1.1 Base medium

Yeast extract	5 กรัม
Tryptone	5 กรัม
Proteose peptone	20 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
pH 7.0 ± 0.2

1.2 50% Egg yolk emulsion

ล้างเปลือกไข่ให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol 1 ชั่วโมง ตอกไข่ด้วยวิธี aseptic technique
นำส่วนของไข่แดงใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ผสม sterile 0.85% saline ในปริมาณ
ที่เท่ากัน

การใช้งาน

เติม 50% Egg yolk emulsion (ข้อ 1.2) 80 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 1.1) 1,000
มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติลงจานเพาะเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ

2. Chopped Liver Broth

Fresh beef liver	500 กรัม
Peptone	10 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1 กรัม
Soluble starch	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร



นำดัตบดใส่ น้ำต้มจนเดือดและเคี่ยวนาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วปรับ pH 7.0 และต้มเดือด
อีก 10 นาที กรองผ่านผ้า (cheesecloth) บีบน้ำออก และเติมส่วนประกอบอื่น ปรับ
pH 7.0 เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรองจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง
ชนิดหยาบแยกเก็บส่วนน้ำ (broth) และเนื้อในตู้แช่แข็ง เมื่อต้องการใช้นำส่วนเนื้อใส่
ในหลอดขนาด 18 × 150 หรือ 20 × 150 มิลลิเมตรให้สูง 1.2-2.5 เซนติเมตร เติมน้ำ
ส่วนน้ำ (broth) 10-12 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

3. Cooked meat medium (CMM)

Beef heart	454 กรัม
Proteose peptone	20 กรัม
Dextrose	2 กรัม
NaCl	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ใส่ CMM 1.8 กรัมในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 15 มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

4. Gel-phosphate buffer, pH 6.2

Gelatin	2 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	4 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองโดยค่อย ๆ ใช้ความร้อน ฆ่าเชื้อที่ 121°C
20 นาที pH 6.2



5. Liver-veal-egg-yolk agar

5.1 Base medium

Fresh eggs, yolks only	2 หรือ 3 กรัม
Liver veal agar	48.5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	500 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 500 มิลลิลิตรด้วยความร้อน ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ทำให้ได้อุณหภูมิ 50°C

5.2 50% Egg yolk emulsion

ล้างเปลือกไข่ให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol 1 ชั่วโมง ตอกไข่ด้วยวิธี aseptic technique นำส่วนของไข่แดงใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ผสม sterile 0.85% saline ในปริมาณที่เท่ากัน

การใช้งาน

เติม 50% Egg yolk emulsion (ข้อ 5.2) 40 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 5.1) 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงจานเพาะเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ ทำผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน หรือที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง

6. Trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth (TPGY)

Trypticase	50 กรัม
Peptone	5 กรัม
Yeast extract	20 กรัม
Dextrose	4 กรัม
Sodium thioglycollate	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 15 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10 นาที pH 7.0 ± 0.2 เก็บที่ 5°C



7. Trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth with trypsin (TPGYT)

7.1 Base medium

Trypticase	50 กรัม
Peptone	5 กรัม
Yeast extract	20 กรัม
Dextrose	4 กรัม
Sodium thioglycollate	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 15 มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10 นาที pH 7.0 ± 0.2 เก็บที่ 5°C เดิม trypsin ก่อนใช้งาน

7.2 Trypsin solution

Trypsin (1:250)	1.5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100 มิลลิลิตร

คน trypsin ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปล่อยให้เย็น กรองส่วนใสผ่านแผ่นกรอง
(membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 µm

การใช้งาน

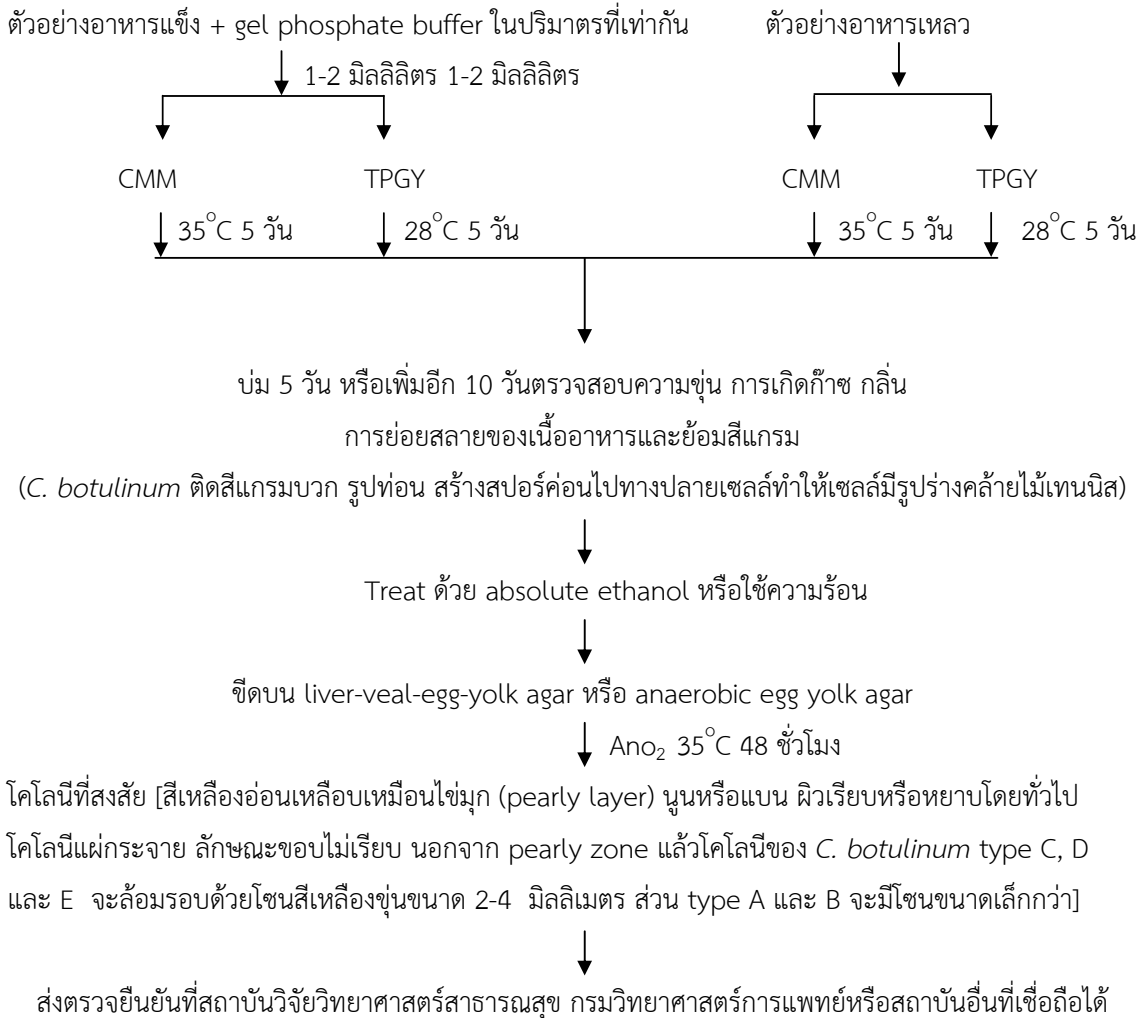
ก่อนใช้งานต้มไล่อากาศ Base medium 10 นาที เดิม trypsin 1 มิลลิลิตรใน broth
15 มิลลิลิตร หรือ 6.7 มิลลิลิตร ใน broth 100 มิลลิลิตร

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Absolute ethanol ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป
3. Trypsin (1:250) ใช้ชนิดสำเร็จรูป



ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *C. botulinum* ในอาหาร



DMSc F 2018: วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่มีความเป็นกรดต่ำ
Analytical method of low-acid canned foods

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์เจริญที่ 35°C และ 55°C รวมทั้ง *Clostridium botulinum* ในอาหารชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001, Chapter 21A “Examination of Canned Foods”. [ออนไลน์]. 2001 [สืบค้น 20 กุมภาพันธ์ 2558]. เข้าถึงได้ที่ <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109398.htm>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท = อาหารที่ผ่านกรรมวิธีที่ใช้ทำลายหรือยับยั้งการขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยความร้อนภายหลังหรือก่อนการบรรจุหรือปิดผนึก ซึ่งเก็บรักษาไว้ในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่เป็นโลหะหรือวัตถุอื่นที่คงรูปที่สามารถป้องกันมิให้อากาศภายนอกเข้าไปในภาชนะบรรจุได้ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้ในอุณหภูมิปกติ เช่น กระป๋อง (can) รีทอร์ทเพาซ์ (retort pouch) ขวดแก้ว ฯลฯ
- อาหารชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ = อาหารที่มีค่าความเป็นกรด-เบส มากกว่า 4.6 และค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, aw) มากกว่า 0.85
- Thermophilic anaerobes = จุลินทรีย์เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงในสภาพไม่มีออกซิเจน
- Flat = ลักษณะปกติของกระป๋องที่ฝาทั้งสองด้านเว้าเข้าข้างในเมื่อกดฝากระป๋องบนพื้นแข็งและเรียบยังคงสภาพเดิม



Flipper	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่มีสภาพปกติ (flat) เมื่อกดฝาด้านใดด้านหนึ่ง อีกด้านจะโป่งออก เมื่อกดด้านที่โป่งกระป๋องจะกลับคืนสภาพปกติ
Springer	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่ฝาด้านหนึ่งบวมแบบถาวรเมื่อกดฝาด้านนี้จะยุบเข้า แต่ด้านตรงข้ามจะโป่งออก
Soft swell	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่ฝาบวมทั้งสองด้านแต่ไม่แน่นมาก เมื่อกดฝาจะยุบตัวลงพอปล่อยมือฝาจะบวมเช่นเดิม
Hard swell	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่ฝาบวมทั้งสองด้านและแน่นมากเมื่อกดฝาจะไม่ยุบตัวลง ตะเข็บกระป๋องอาจแตกและกระป๋องอาจจะเปิดได้
<i>C. botulinum</i>	= <i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. thermobutylicum</i>	= <i>Clostridium thermobutylicum</i>
<i>C. sporogenes</i>	= <i>Clostridium sporogenes</i>
<i>C. perfringens</i>	= <i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. thermosaccolyticum</i>	= <i>Clostridium thermosaccolyticum</i>
<i>B. coagulans</i>	= <i>Bacillus coagulans</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	= <i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>B. thermoacidurans</i>	= <i>Bacillus thermoacidurans</i>

4. หลักการ (Principle)

อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท หมายถึงอาหารซึ่งสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิปกติได้นานโดยไม่เน่าเสีย (shelf stable food) แต่ถ้ากระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือการเก็บรักษาไม่ถูกต้อง หรือภาชนะบรรจุเกิดการรั่ว (leakage) ทำให้จุลินทรีย์ที่เหลืออยู่หรือปนเปื้อนเข้ามาภายหลังเจริญเติบโตและทำให้อาหารเน่าเสียได้ การเน่าเสียอาจเกิดจากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งชนิดที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) หรือไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C และ/หรือ 55°C

การตรวจหา มี 3 ขั้นตอน ดังนี้



- 4.1 อาหารกระป๋องที่มีสภาพปกติให้บ่มที่ 35°C 14 วัน ถ้ากระป๋องบวมไม่ต้องบ่ม หรือระหว่างบ่มพบกระป๋องบวมขึ้นให้น้ำออกจากตู้บ่มและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 4.2 สุ่มอาหารจากข้อ 4.1 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว นำไปบ่มที่ 35°C และ 55°C ตามระยะเวลาที่กำหนด
- 4.3 กรณีที่พบการเจริญของเชื้อให้ตรวจยืนยัน
หมายเหตุ ใช้อาหารกระป๋องเป็นตัวแทนอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท
5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1
 - 5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 5.1.1 Bromocresol purple dextrose broth (BCP)
 - 5.1.2 Chopped liver broth หรือ cooked meat medium (CMM)
 - 5.1.3 Liver-veal agar (without egg yolk) (LVA)
 - 5.1.4 Nutrient agar (NA)
 - 5.2 สารเคมี
 - 5.2.1 4% Iodine in 70% ethanol
 - 5.2.2 Methylene blue stain, crystal violet หรือ Gram stain reagents
 - 5.2.3 น้ำปูนใส (lime water)
6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)
 - 6.1 เครื่องมือ
 - 6.1.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic incubator) 35°C และ 55°C
 - 6.1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C
 - 6.1.3 เครื่องชั่ง (balance)
 - 6.1.4 ตู้ปราศจากเชื้อ (biosafety cabinet)
 - 6.1.5 ตู้ดูดควัน (fume hood)
 - 6.1.6 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) 35°C และ 55°C
 - 6.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
 - 6.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)



6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 ที่เปิดกระป๋อง (can opener)
- 6.2.2 ที่เจาะรูกระป๋อง (can punch)
- 6.2.3 ผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ (clean sterile towel)
- 6.2.4 แผ่นกระจกทาบหน้า (coverslip)
- 6.2.5 หลอดหยดสารละลาย (dropper)
- 6.2.6 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.7 ปากคีบ (forceps)
- 6.2.8 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.9 ปากกากันน้ำ (Indelible ink marking pen)
- 6.2.10 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.11 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.12 ปิเปต (pipette)
- 6.2.13 กรรไกร (scissors)
- 6.2.14 สบู่หรือน้ำยาทำความสะอาด (soap or detergent)
- 6.2.15 ช้อน (spoon)
- 6.2.16 กรวยปราศจากเชื้อ (sterile funnel)
- 6.2.17 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.18 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure): ภาคผนวก 2

- 7.1 การเตรียมภาชนะบรรจุ (Preparation of container)
 - 7.1.1 ดึงฉลากออก เขียนรหัสตัวอย่าง (lab code) ที่ด้านข้างภาชนะบรรจุ
 - 7.1.2 ตรวจสอบลักษณะภาชนะบรรจุ (ปกติหรือผิดปกติ เช่น บวม บุบ รั่วซึม เป็นสนิม) และแบ่งตามรหัส (code number)
- 7.2 การชักตัวอย่าง (Sampling can contents)
 - 7.2.1 กรณีที่พบกระป๋องบวมแบบ springers, swells และอาจมีแบบ flat หรือ flipper รวมอยู่ด้วยให้ตรวจวิเคราะห์ทันทีพร้อมกับกระป๋องที่มีลักษณะ flat และ flipper อีกอย่างน้อย 6 กระป๋อง (ถ้ามี) และแบ่งเก็บตัวอย่างกระป๋องแต่ละลักษณะ ดำรงไว้ (ถ้ามี) แล้วนำกระป๋อง flat และ flipper ที่เหลือไปบ่มที่ 35°C 14 วัน



ระหว่างบ่มต้องตรวจสอบกระป๋องเป็นระยะๆ ถ้าพบกระป๋องผิดปกติหรือบวมมากขึ้นให้จดบันทึก เมื่อบวมจนเป็น hard swell หรือไม่บวมมากขึ้น สุ่มตัวอย่างไปเพาะเชื้อ

- 7.2.2 กรณีที่พบกระป๋องแบบ flat และ flipper แบ่งเก็บตัวอย่างกระป๋องสำรองไว้ แล้วนำส่วนที่เหลือไปบ่มที่ 35°C 14 วัน ระหว่างบ่มต้องตรวจสอบกระป๋องเป็นระยะๆ ถ้าพบกระป๋องบวมให้ทำตามข้อ 7.2.1 กรณีไม่พบกระป๋องบวม เมื่อบ่มครบกำหนด นำกระป๋องแบบ flat และ flipper ออกจากตู้บ่มนำไปตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย 6 กระป๋อง (ถ้ามี) อาหารกระป๋องที่ปกติ (normal can) ไม่จำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด ห้ามบ่มกระป๋องที่อุณหภูมิสูงกว่า 35°C

7.3 การเปิดกระป๋อง (Opening the can)

- 7.3.1 กรณีกระป๋องบวมแบบ hard swells, soft swells และ springers (ถ้าเป็น hard swells นำไปแช่เย็นในตู้เย็นก่อนเปิดกระป๋อง)

- ◆ ล้างกระป๋องให้สะอาดด้วยสบู่หรือน้ำยาทำความสะอาดและน้ำ เช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ
- ◆ ฆ่าเชื้อที่ฝากระป๋องด้านที่จะเปิด (ด้านที่ไม่มีมีรหัส) โดยใช้ 4% iodine in 70% ethanol เทราดบนฝา ปลดยั้งไว้ 30 นาที เช็ดออกด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ ห้ามลนไฟ ควรหาอุปกรณ์คลุมกระป๋องที่บวมมาก เช่น ผ้าสะอาดปราศจากเชื้อหรือคว่ำกรวยปราศจากเชื้อครอบไว้เพราะอาหารในกระป๋องที่อาจมีสารพิษปนเปื้อนอยู่พุ่งกระจายออกมา
- ◆ ตรวจสอบชนิดของก๊าซที่เกิดขึ้นโดยใช้ที่เจาะรูกระป๋องปราศจากเชื้อเจาะบริเวณฝา เมื่อเจาะแล้วให้กดที่เจาะรูค้างไว้ก่อน นำหลอดแก้วปราศจากเชื้อมาเก็บก๊าซจากบริเวณรูที่เจาะ จากนั้นรีบจ่อปากหลอดใกล้เปลวไฟ ถ้าได้ยินเสียงระเบิดเบาๆ (slight explosion) แสดงว่าพบก๊าซไฮโดรเจน (H_2) แล้วหายใจหลุดตั้งตรงทันที และเทน้ำปูนใสปริมาณเล็กน้อยลงไป ถ้าเกิดตะกอนสีขาวแสดงว่าพบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
- ◆ เปิดฝากระป๋องด้วยที่เปิดกระป๋องปราศจากเชื้อ แยกใช้หนึ่งอันต่อกระป๋อง (ทำในตู้ปราศจากเชื้อ)

- 7.3.2 กรณีกระป๋องแบบ flat และ flipper

- ◆ ล้างกระป๋องให้สะอาดด้วยสบู่หรือน้ำยาทำความสะอาดและน้ำ เช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ



- ◆ เขย่ากระป๋องเบา ๆ เพื่อให้ส่วนประกอบอาหารผสมกัน
- ◆ ฆ่าเชื้อที่ฝากระป๋องด้านที่จะเปิด (ด้านที่ไม่มีรหัสด) โดยใช้ 4% iodine in 70% ethanol เทราดบนฝา ปล่อยทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เช็ดออกด้วยผ้าสะอาด ปราศจากเชื้อและลนไฟที่ฝากระป๋องจนสารละลายไอโอดีน-เอทานอล เฝ้ามั้หมด (ทำในตู้ดูดควัน ระวังอย่าสูดดมควันไอโอดีน)
- ◆ เปิดฝากระป๋องด้วยที่เปิดกระป๋องปราศจากเชื้อ แยกใช้หนึ่งอันต่อกระป๋อง (ทำในตู้ปราศจากเชื้อ)

7.4 การสุ่มตัวอย่าง (Removal of material for testing)

7.4.1 ปีเปิดของเหลวหรือใช้ปากคีบ ช้อน ที่ปราศจากเชื้อนำอาหารที่เป็นของแข็ง จากบริเวณจุดกึ่งกลางของกระป๋องใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปวิเคราะห์ ตามข้อ 7.5.2 หลังจากนั้นนำอาหารอย่างน้อย 30 มิลลิลิตร (กรัม) หรือถ้ามีปริมาณ น้อยให้เก็บที่เหลือทั้งหมด ใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อไว้ที่ตู้เย็นประมาณ 4°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ซ้ำ

7.4.2 บันทึกลักษณะทั่วไป ความคงตัว (consistency) สี กลิ่นของอาหาร และลักษณะ พื้นผิวภายในกระป๋อง เช่น กัดกร่อน เป็นต้น

7.5 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ (Cultural examination)

7.5.1 ถ้าสงสัยค่าความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างอาหาร ให้วัดค่าความเป็นกรด-เบส จากกระป๋องปกติ ที่เป็นตัวแทนจำนวนหนึ่งก่อนดำเนินการต่อไป

7.5.2 สุ่มตัวอย่างจากแต่ละกระป๋องใส่ในหลอด chopped liver broth หรือ CMM (ก่อนใช้นำไปต้มเดือด 100°C แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องทันทีเพื่อไล่ออกซิเจน) และ BCP อย่างละ 4 หลอดๆ ละ 1-2 มิลลิลิตร (ตัวอย่างของเหลว หรือตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ) หรือ 1-2 กรัม (ตัวอย่างของแข็ง) นำไปบ่ม ตามตารางแล้วอ่านผลตามข้อ 7.6



ตาราง แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และเวลาบ่มที่ใช้วิเคราะห์อาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (ค่าความเป็นกรด-เบส > 4.6)

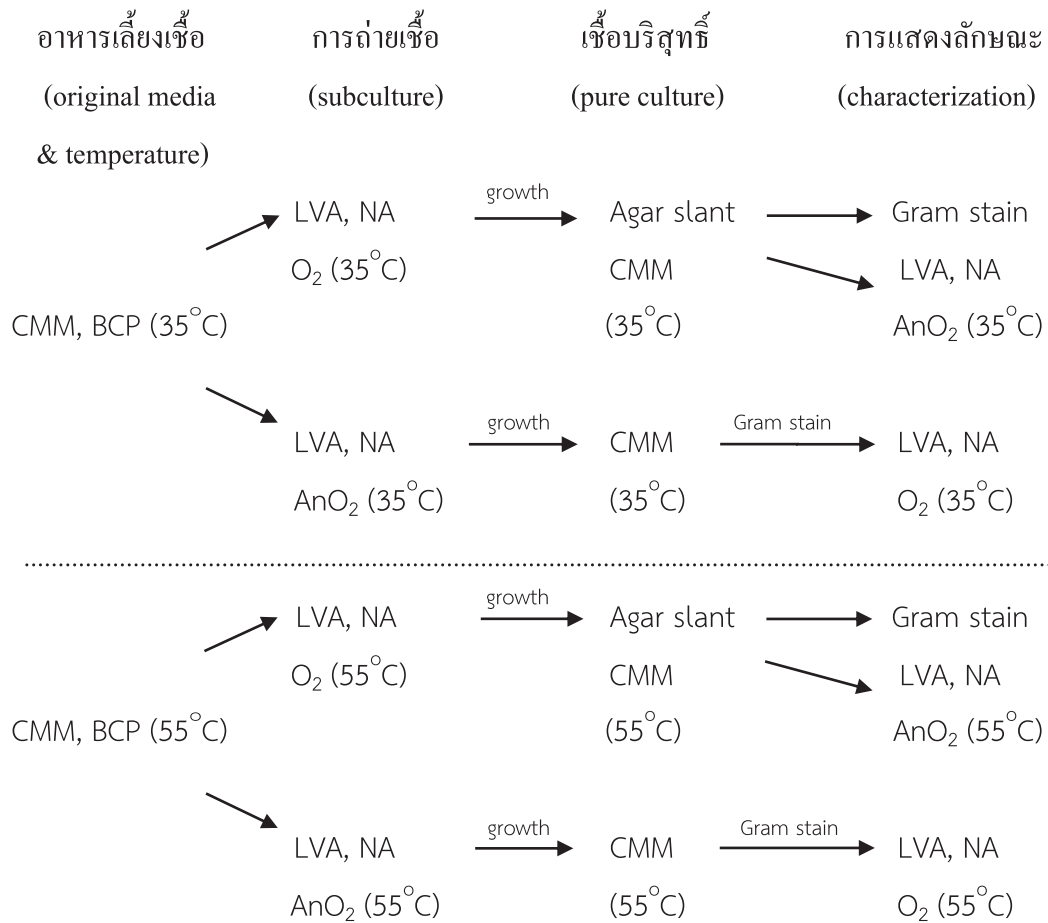
อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน (หลอด)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)
Chopped liver broth (CMM)	2	35	96 - 120
Chopped liver broth (CMM)	2	55	24 - 72
BCP	2	55	24 - 48
BCP	2	35	96 - 120

7.5.3 การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำตัวอย่างอาหารที่เหลือจากแต่ละกระป๋อง มาป้ายบนแผ่นกระจก (direct smear) ปล่อยให้แห้ง (dry) ตรึงเซลล์โดยผ่าน เปลวไฟ (fix) ย้อมด้วยสี methylene blue, crystal violet หรือ Gram stain เพื่อ ดูรูปร่างและลักษณะของเซลล์และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด/field ของกล้องจุลทรรศน์ (โดยประมาณ) ถ้าตัวอย่างมีส่วนผสมของน้ำมันให้หยดสารละลาย xylene ลงบน warm-fixed film แล้วนำไปผ่านน้ำไหล (rinse) และย้อมสี ระหว่างเตรียมการย้อม ถ้าตัวอย่างถูกล้างออกไปจากแผ่นกระจก ให้ตรวจสอบตัวอย่างอาหารด้วยวิธี wet mount หรือ hanging drop หรือหยด chopped liver broth ที่ปราศจากเชื้อ บนแผ่นกระจก ผสมตัวอย่างอาหาร แล้วปล่อยให้แห้ง

7.6 การอ่านผลการเจริญของเชื้อ (Cultural findings) ใน CMM และ BCP

7.6.1 ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเป็นระยะๆ จนครบเวลาบ่ม ตามตาราง

7.6.2 กรณีไม่พบการเจริญของเชื้อ (CMM และ BCP ไม่เปลี่ยนแปลง) ให้รายงานผล กรณีพบการเจริญของเชื้อ นำเชื้อมาจัดบน LVA (ไม่ผสมไข่แดง) หรือ NA agar 2 จานเพาะเชื้อ แยกบ่มที่สภาวะ AnO_2 และ O_2 ตามอุณหภูมิที่พบการเจริญของเชื้อ ดังแผนภูมิที่ 1 (การถ่ายเชื้อ)



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการเพาะเชื้อของอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ

- 7.6.3 กรณีไม่พบการเจริญของเชืบบน LVA หรือ NA agar ให้รายงานผล
กรณีพบการเจริญของเชืบบน LVA หรือ NA agar ให้เลือกโคโลนีที่แตกต่าง
ทุกลักษณะ ทำตามแผนภูมิที่ 1 (เชื้อบริสุทธิ์และการแสดงลักษณะ)



7.6.4 ถ้าพบเชื้อหลายชนิด (mixed microflora)

- ◆ เฉพาะใน BCP ให้รายงานลักษณะรูปร่างของเชื้อ
- ◆ ใน CMM พบชนิดรูปท่อนรวมอยู่ด้วยให้ทดสอบหาสารพิษ (botulinal toxin) ถ้าพบเฉพาะเชื้อรูปท่อน ย้อมติดสีแกรมบวกหรือ Gram-variable มีลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Bacillus* spp. หรือ *Clostridium* spp. ต้องตรวจสอบการสร้างสปอร์ บางกรณี เซลล์ (vegetative cell) ที่เกาะอาจย้อมติดเป็นสีแกรมลบ ดังนั้นควรทำการทดสอบหาสารพิษเช่นเดียวกัน

7.7 การแปลผล (Interpretation of results)

- 7.7.1 ถ้าพบเฉพาะแบคทีเรียชนิดสร้างสปอร์เจริญที่ 35°C ในอาหารกระป๋องที่ตะเข็บปกติไม่รั่วแสดงว่าอาหารกระป๋องผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่เพียงพอ (underprocessing) ในกรณีที่แบคทีเรียที่พบนี้ทนความร้อนได้เท่ากับหรือน้อยกว่า *C. botulinum*
- 7.7.2 การเน่าเสียที่เกิดจาก thermophilic anaerobes เช่น *C. thermobutylicum* อาจบ่งชี้ได้จากการเกิดก๊าซใน CMM (55°C) และมีกลิ่นเนยแข็ง (cheesy odor)
- 7.7.3 การเกิดก๊าซและมีกลิ่นเหม็นเน่า (putrid odor) ใน CMM (35°C) และพบเชื้อรูปท่อนสร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก อาจบ่งชี้ได้ว่าการเน่าเสียจากเชื้อ *C. botulinum*, *C. sporogenes* หรือ *C. perfringens* ต้องทดสอบสารละลายที่เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อหาสารพิษ (botulinal toxin) ถึงแม้ว่าตรวจไม่พบสารพิษในผลิตภัณฑ์อาหาร เพราะการตรวจพบสปอร์ ของ *C. botulinum* แสดงว่าอาหารนั้นอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค
- 7.7.4 การเกิดกรดใน BCP (35°C และ/หรือ 55°C) อาจบ่งชี้ได้ว่าการเน่าเสียแบบ flat-sour จากเชื้อเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) เช่น *B. thermoacidurans* หรือ *B. coagulans* และ/หรือที่อุณหภูมิสูง (thermophiles) เช่น *B. stearothermophilus*
- 7.7.5 ถ้าอาหารที่ใส่ลงไปทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นตั้งแต่เริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ต้องทดสอบหาเชื้อด้วยการถ่ายเชื้อ (subculture)



- 7.7.6 อาหารกระป๋องหลายชนิดที่มีเชื้อเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophiles) และไม่เจริญภายใต้การเก็บรักษาปกติ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (50-55°C) เชื้อจะเจริญและทำให้เกิดการเน่าเสียเช่น *B. stearothermophilus* ซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียแบบ flat-sour การบ่มที่ 55°C ไม่ทำให้สภาพกระป๋องเปลี่ยนแปลง แต่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นผิดปกติและค่าความเป็นกรด-เบสอาจลดลงหรือไม่ลดลง สำหรับ *C. thermosaccolyticum* เป็น thermophilic anaerobes ที่ทำให้กระป๋องบวม และผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเนยแข็ง (cheesy odor)
- 7.7.7 กระป๋องที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนมักปนเปื้อนด้วยเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์ และเชื้อสร้างสปอร์ ลักษณะการเน่าเสียจะเหมือนกรณีกระป๋องรั่ว
- 7.7.8 ถ้าพบกลุ่มแบคทีเรียมีชีวิตรูปท่อน (rod) และรูปกลม (cocci) บ่งชี้ว่าเกิดจากกระป๋องรั่ว หรืออาจเกิดจากอาหารกระป๋องไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ ซึ่งกรณีนี้คาดว่าจะพบกระป๋องบวมในอัตราสูง
- 7.7.9 ถ้าพบกลุ่มแบคทีเรียปริมาณมากในอาหารจากการทำ direct smear แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อ (no growth) ในขั้นตอนการเพาะเชื้อ อาจบ่งชี้ได้ว่าการเน่าเสียจากแบคทีเรียในอาหารก่อนการบรรจุกระป๋อง (precanning) อาหารอาจมีค่าความเป็นกรด-เบส กลิ่นและลักษณะผิดปกติ
- 7.7.10 ถ้าตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อในกระป๋องบวม แสดงว่ากระป๋องบวมเนื่องจากก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีของอาหารกับผิวด้านในภาชนะบรรจุ แต่ถ้ากระป๋องบวมที่เกิดจาก thermophilic anaerobes ซึ่งสร้างก๊าซและเซลล์แตกสลายอย่างรวดเร็วหลังจากเจริญกรณีนี้อาจทำให้สับสนว่ากระป๋องบวมเนื่องจากก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้การแตกตัวทางเคมีของอาหารอาจทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โดยเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลและกรด และปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้น



8. การรายงานผล (Expression of results)

- 8.1 จุลินทรีย์เจริญที่ 35°C/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ
(รายงานการย้อมติดสีแกรม รูปร่างและลักษณะของเชื้อ)
- 8.2 จุลินทรีย์เจริญที่ 55°C/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ
(รายงานการย้อมติดสีแกรม รูปร่างและลักษณะของเชื้อ)
- 8.3 *C. botulinum*/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ
- 8.4 ก๊าซ (กรณีภาชนะบรรจุรวม ถ้าพบก๊าซให้ระบุชนิด)

9. รายละเอียดอื่น

- 9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) จุลินทรีย์เจริญที่ 35°C และ 55°C
ในอาหารชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Bromcresol purple dextrose broth (BCP)

Dextrose	10 กรัม
Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Bromcresol purple (1.6% in ethanol)	2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 12-15 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

2. Chopped liver broth

Fresh beef liver	500 กรัม
Peptone	10 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1 กรัม
Soluble starch	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

นำตับคือน้ำต้มจนเดือดและเคี่ยวนาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วปรับ pH 7.0 และต้มเดือด
อีก 10 นาที กรองผ่านผ้า (cheesecloth) บีบน้ำออก และเติมส่วนประกอบอื่น ปรับ
pH 7.0 เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรองจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง
ชนิดหยาบแยกเก็บส่วนน้ำ (broth) และเนื้อในตู้แช่แข็งเมื่อต้องการใช้นำส่วนเนื้อใส่
ในหลอดขนาด 18 × 150 มิลลิเมตรหรือ 20 × 150 มิลลิเมตรให้สูง 1.2 - 2.5 เซนติเมตร
เติมน้ำ (broth) 10-12 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที



3. Cooked meat medium (CMM)

Beef heart	454 กรัม
Proteose peptone	20 กรัม
Dextrose	2 กรัม
NaCl	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ใส่ CMM 1.25 กรัม ในหลอดขนาด 20×150 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 10 มิลลิลิตร
เขย่าผสมให้ขึ้นเนื้อเปียกน้ำ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 ก่อนนำไปต้มเดือด
 100°C แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องทันที (ห้ามเขย่าหลอด)

4. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย
แบ่งใส่ขวดฆ่าเชื้อ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

5. Liver-veal agar (without egg yolk) (LVA)

Liver, infusion from	50 กรัม
Veal, infusion from	500 กรัม
Proteose peptone	20 กรัม
Neopeptone	1.3 กรัม
Tryptone	1.3 กรัม
Dextrose	5 กรัม
Starch, soluble	10 กรัม



Casein, isoelectric	2 กรัม
NaCl	5 กรัม
Sodium nitrate	2 กรัม
Gelatin	20 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและ คนจนอุ่นละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2	

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. 4% Iodine in 70% ethanol

Potassium iodide	10 กรัม
Iodine	10 กรัม
Ethanol (70%)	500 มิลลิลิตร

2. น้ำปูนใส (lime water)

ปูนแดงผสมน้ำ กวนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ตกตะกอน นำน้ำส่วนใสด้านบน
มาใช้ น้ำปูนใสหรือสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีคุณสมบัติเป็นด่าง

3. Crystal violet stain

Crystal violet (90% dye content)	2 กรัม
Ethanol (95%)	20 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	80 มิลลิลิตร



4. Methylene blue stain (Loeffler's)

Solution A

Methylene blue (90% dye content)	0.3 กรัม
Ethanol (95%)	30 มิลลิลิตร

Solution B

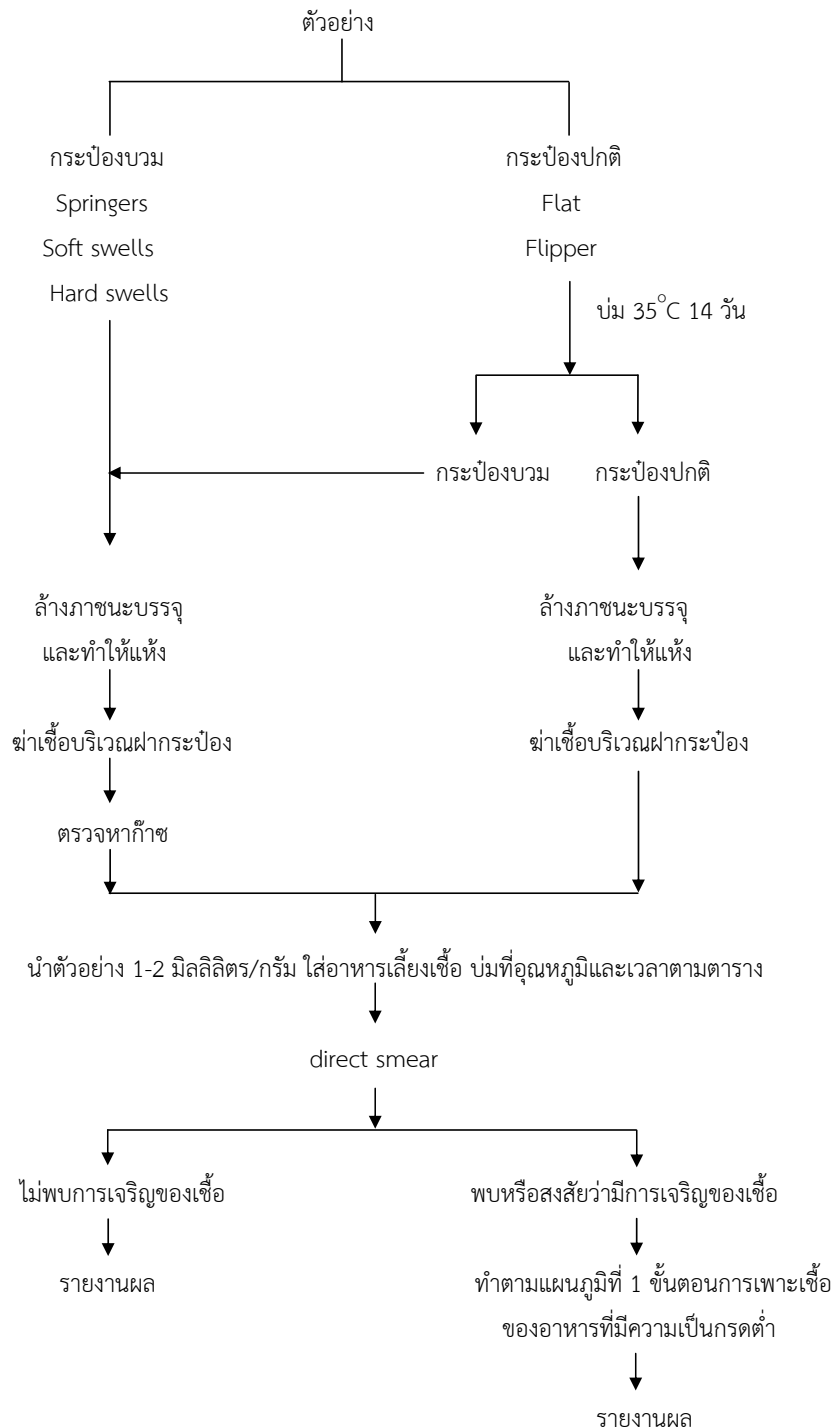
Diluted potassium hydroxide (0.01%)	100 มิลลิลิตร
-------------------------------------	---------------

ผสม solution A และ B

5. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป



ภาคผนวก 2



แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) จุลินทรีย์เจริญที่ 35°C และ 55°C ในอาหารชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ

วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทชนิดที่มี ความเป็นกรด

Analytical method of acid canned foods

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์เจริญที่ 30°C และ 55°C รวมทั้งยีสต์และราในอาหารชนิดที่มีความเป็นกรด ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001, Chapter 21A
 “Examination of Canned Foods”. [ออนไลน์]. 2001 [สืบค้น 20 กุมภาพันธ์ 2558]. เข้าถึงได้ที่
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109398.htm>

3. **นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)**

อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท = อาหารที่ผ่านกรรมวิธีที่ใช้ทำลายหรือยับยั้งการขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยความร้อนภายหลังหรือก่อนการบรรจุหรือปิดผนึก ซึ่งเก็บรักษาไว้ในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่เป็นโลหะหรือวัสดุอื่นที่คงรูปที่สามารถป้องกันมิให้อากาศภายนอกเข้าไปในภาชนะบรรจุได้ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้ในอุณหภูมิปกติ เช่น กระป๋อง (can) รีทอร์ทเพาซ์ (retort pouch) ขวดแก้ว ฯลฯ

อาหารชนิดที่มีความเป็นกรด	=	อาหารที่มีค่าความเป็นกรด-เบส ตั้งแต่ 4.6 ลงมา
Flat	=	ลักษณะปกติของกระป๋องที่ฝาทั้งสองด้านเว้าเข้าข้างใน เมื่อกดฝากระป๋องบนพื้นแข็งและเรียบยังคงสภาพเดิม



Flipper	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่มีสภาพปกติ (flat) เมื่อกดฝาด้านใดด้านหนึ่ง อีกด้านจะโป่งออก เมื่อกดด้านที่โป่งกระป๋องจะกลับคืนสภาพปกติ
Springer	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่ฝาด้านหนึ่งบวมแบบถาวรเมื่อกดฝาด้านนี้จะยุบเข้า แต่ด้านตรงข้ามจะโป่งออก
Soft swell	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่ฝาบวมทั้งสองด้านแต่ไม่แน่นมาก เมื่อกดฝายุบตัวลงพอปล่อยมือฝายุบกลับคืนเดิม
Hard swell	= ลักษณะการบวมของกระป๋องที่ฝาบวมทั้งสองด้านและแน่นมากเมื่อกดฝายุบตัวลง ตะเข็บกระป๋องอาจแตกและกระป๋องอาจจะเปิดได้
<i>B. thermoacidurans</i>	= <i>Bacillus thermoacidurans</i>
<i>C. thermosaccolyticum</i>	= <i>Clostridium thermosaccolyticum</i>
<i>C. pasteurianum</i>	= <i>Clostridium pasteurianum</i>

4. หลักการ (Principle)

อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท หมายถึง อาหารซึ่งสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิปกติได้นานโดยไม่เน่าเสีย (shelf stable food) แต่ถ้ากระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือภาชนะบรรจุเกิดการรั่ว (leakage) ทำให้จุลินทรีย์ที่เหลืออยู่หรือปนเปื้อนเข้ามาภายหลังเจริญเติบโตและทำให้อาหารเน่าเสียได้ การเน่าเสียอาจเกิดจากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งชนิดที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) หรือไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30°C และ/หรือ 55°C

การตรวจหามี 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 อาหารกระป๋องที่มีสภาพปกติให้บ่มที่ 35°C 14 วัน ถ้ากระป๋องบวมไม่ต้องบ่ม หรือระหว่างบ่มพบกระป๋องบวมขึ้นให้นำออกจากตู้บ่มและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 4.2 สุ่มอาหารจากข้อ 4.1 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว นำไปบ่มที่ 30°C และ 55°C ตามระยะเวลาที่กำหนด
- 4.3 กรณีที่พบการเจริญของเชื้อให้ตรวจยืนยัน

หมายเหตุ ใช้อาหารกระป๋องเป็นตัวแทนอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท



5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents): ภาคผนวก 1

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Acid broth
- 5.1.2 Malt extract broth
- 5.1.3 Nutrient agar (NA)
- 5.1.4 Sabouraud's dextrose agar (SAB)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 4% Iodine in 70% ethanol (สารละลายไอโอดีน-เอทานอล)
- 5.2.2 Methylene blue stain, crystal violet หรือ Gram stain reagents
- 5.2.3 น้ำปูนใส (lime water)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 ตู้ปราศจากเชื้อ (biosafety cabinet)
- 6.1.4 ตู้ดูดควัน (fume hood)
- 6.1.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) 30°C , 35°C และ 55°C
- 6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 ที่เปิดกระป๋อง (can opener)
- 6.2.2 ที่เจาะรูกระป๋อง (can punch)
- 6.2.3 ผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ (clean sterile towel)
- 6.2.4 แผ่นกระจกทับหน้า (coverslip)
- 6.2.5 หลอดหยดสารละลาย (dropper)
- 6.2.6 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว



- 6.2.7 ปากคีบ (forceps)
- 6.2.8 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.9 ปากกาทำเครื่องหมาย (Indelible ink marking pen)
- 6.2.10 ห่วงและเข็มเย็บเย็บ (loop and needle)
- 6.2.11 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.12 ปิเปต (pipette)
- 6.2.13 กรรไกร (scissors)
- 6.2.14 สบู่หรือน้ำยาทำความสะอาด (soap or detergent)
- 6.2.15 ช้อน (spoon)
- 6.2.16 กรวยปราศจากเชื้อ (sterile funnel)
- 6.2.17 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.18 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure): ภาคผนวก 2

- 7.1 การเตรียมภาชนะบรรจุ (Preparation of container)
 - 7.1.1 ดึงฉลากออกเขียนรหัสตัวอย่าง (lab code) ที่ด้านข้างภาชนะบรรจุ
 - 7.1.2 ตรวจสอบลักษณะภาชนะบรรจุ (ปกติหรือผิดปกติ เช่น บวม บู่ ร้าวซึม เป็นสนิม) และ แบ่งตามรหัส (code number)
- 7.2 การชักตัวอย่าง (Sampling can contents)
 - 7.2.1 กรณีที่พบกระป๋องบวมแบบ springers, swells และอาจมีแบบ flat หรือ flipper รวมอยู่ด้วย ให้ตรวจวิเคราะห์ทันทีพร้อมกับกระป๋องที่มีลักษณะ flat และ flipper อีกอย่างน้อย 6 กระป๋อง (ถ้ามี) และแบ่งเก็บตัวอย่างกระป๋องแต่ละลักษณะ สํารองไว้ (ถ้ามี) แล้วนำกระป๋อง flat และ flipper ที่เหลือไปบ่มที่ 35°C 14 วัน ระหว่างบ่มต้องตรวจสอบกระป๋องเป็นระยะๆ ถ้าพบกระป๋องผิดปกติหรือบวมมากขึ้นให้จดบันทึก เมื่อบวมจนเป็น hard swell หรือไม่บวมมากขึ้น สุ่มตัวอย่างไปเพาะเชื้อ



7.2.2 กรณีที่พบกระป๋องแบบ flat และ flipper แบ่งเก็บตัวอย่างกระป๋องสำรองไว้ แล้วนำส่วนที่เหลือไปต้มที่ 35°C 14 วัน ระหว่างต้มต้องตรวจสอบกระป๋องเป็นระยะ ๆ ถ้าพบกระป๋องบวมให้ทำตามข้อ 7.2.1 กรณีไม่พบกระป๋องบวม เมื่อต้มครบกำหนด นำกระป๋องแบบ flat และ flipper ออกจากตู้ต้มนำไปตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย 6 กระป๋อง (ถ้ามี) อาหารกระป๋องที่ปกติ (normal can) ไม่จำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด ห้ามต้มกระป๋องที่อุณหภูมิสูงกว่า 35°C

7.3 การเปิดกระป๋อง (Opening the can)

7.3.1 กรณีกระป๋องบวมแบบ hard swells, soft swells และ springers (ถ้าเป็น hard swells นำไปแช่เย็นในตู้เย็นก่อนเปิดกระป๋อง)

- ◆ ล้างกระป๋องให้สะอาดด้วยสบู่หรือน้ำยาทำความสะอาดและน้ำเช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ
- ◆ นำเชือกที่ผูกกระป๋องด้านที่จะเปิด (ด้านที่ไม่มีรหัสน์) โดยใช้ สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เทราดบนฝา ปลดออกทิ้งไว้ 30 นาที เช็ดออกด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ ห้ามลงไฟ ควรหาอุปกรณ์คลุมกระป๋องที่บวมมาก เช่น ผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ หรือคว่ำกรวยปราศจากเชื้อครอบไว้ เพราะอาหารในกระป๋องที่อาจมีสารพิษปนเปื้อนอยู่พุ่งกระจายออกมา
- ◆ ตรวจสอบชนิดของก๊าซที่เกิดขึ้น โดยใช้ที่เจาะรูกระป๋องปราศจากเชื้อเจาะบริเวณฝา เมื่อเจาะแล้วให้กดที่เจาะรูค้างไว้ก่อน นำหลอดแก้วปราศจากเชื้อมาเก็บก๊าซจากบริเวณรูที่เจาะจากนั้นรีบจ่อปากหลอดใกล้เปลวไฟ ถ้าได้ยินเสียงระเบิดเบาๆ (slight explosion) แสดงว่าพบก๊าซไฮโดรเจน (H_2) แล้วหงายหลอดตั้งตรงทันที และเทน้ำปูนใสปริมาณเล็กน้อยลงไป ถ้าเกิดตะกอนสีขาวแสดงว่าพบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
- ◆ เปิดฝากระป๋องด้วยที่เปิดกระป๋องปราศจากเชื้อ แยกใช้หนึ่งอันต่อกระป๋อง (ทำในตู้ปราศจากเชื้อ)



7.3.2 กรณีกระป๋องแบบ flat และ flipper

- ◆ ล้างกระป๋องให้สะอาดด้วยสบู่หรือน้ำยาทำความสะอาดและน้ำเช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อ
- ◆ เขย่ากระป๋องเบา ๆ เพื่อให้ส่วนประกอบอาหารผสมกัน
- ◆ ฆ่าเชื้อที่ฝากระป๋องด้านที่จะเปิด (ด้านที่ไม่มีรหัสน์) โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเพอออกไซด์ เทราดบนฝา ปล่อยทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เช็ดออกด้วยผ้าสะอาดปราศจากเชื้อและลนไฟที่ฝากระป๋องสารละลายไฮโดรเจนเพอออกไซด์เผาไหม้หมด (ทำในตู้ดูดควัน ระวังอย่าสูดดมควันไฮโดรเจน)
- ◆ เปิดฝากระป๋องด้วยที่เปิดกระป๋องปราศจากเชื้อ แยกใช้หนึ่งอันต่อกระป๋อง (ทำในตู้ปราศจากเชื้อ)

7.4 การสุ่มตัวอย่าง (Removal of material for testing)

7.4.1 ปิเปิดของเหลวหรือใช้ปากคีบ ช้อน ที่ปราศจากเชื้อนำอาหารที่เป็นของแข็งจากบริเวณจุดกึ่งกลางของกระป๋องใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 7.5.2 หลังจากนั้นนำอาหารอย่างน้อย 30 มิลลิลิตร (กรัม) หรือถ้ามีปริมาณน้อยให้เก็บที่เหลือทั้งหมด ใส่ขวดแก้วปราศจากเชื้อไว้ที่ตู้เย็นประมาณ 4°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ซ้ำ

7.4.2 บันทึกลักษณะทั่วไป ความคงตัว (consistency) สี กลิ่นของอาหาร และลักษณะพื้นผิวภายในกระป๋อง เช่น กัดกร่อน เป็นต้น

7.5 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ (Cultural examination)

7.5.1 ถ้าสงสัยค่าความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างอาหาร ให้วัดค่าความเป็นกรด-เบสจากกระป๋องปกติ ที่เป็นตัวแทนจำนวนหนึ่งก่อนดำเนินการต่อไป

7.5.2 สุ่มตัวอย่างจากแต่ละกระป๋องใส่ในหลอด acid broth 4 หลอด และ malt extract broth 2 หลอด ๆ ละ 1-2 มิลลิลิตร (ตัวอย่างของเหลวหรือตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ) หรือ 1-2 กรัม (ตัวอย่างของแข็ง) นำไปบ่มตามตารางแล้วอ่านผลตาม ข้อ 7.6



ตาราง แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และเวลาบ่มที่ใช้วิเคราะห์อาหารที่มีความเป็นกรด
(ค่าความเป็นกรด-เบส ≤ 4.6)

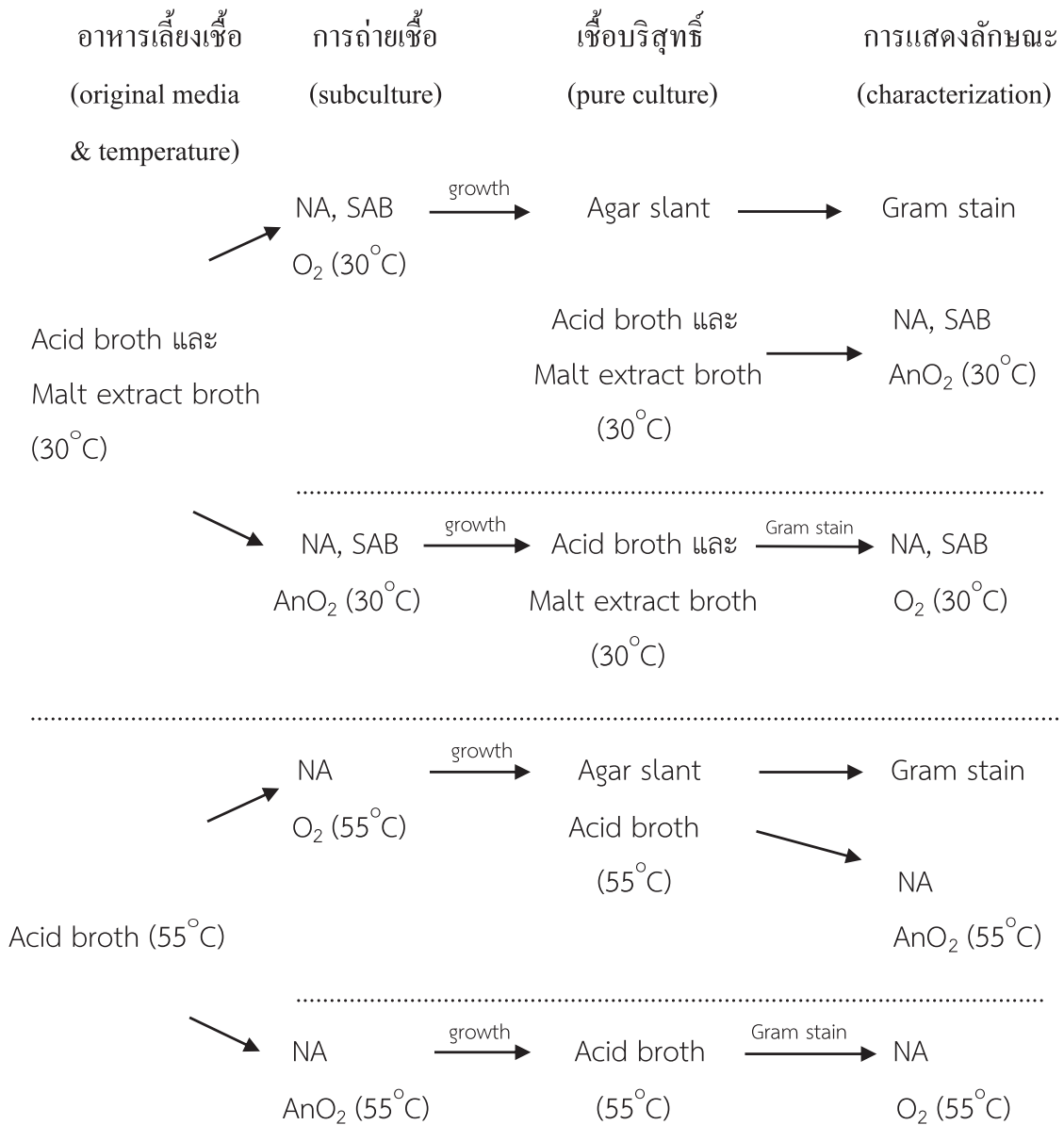
อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน (หลอด)	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (ชั่วโมง)
Acid broth	2	55	48
Acid broth	2	30	96
Malt extract broth	2	30	96

7.5.3 การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำตัวอย่างอาหารที่เหลือจากแต่ละกระป๋อง มาป้ายบนแผ่นกระจก (direct smear) ปล่อยให้แห้ง (dry) ตรึงเซลล์โดยผ่าน เพลวไฟ (fix) ย้อมด้วยสี methylene blue, crystal violet หรือ Gram stain เพื่อ ดูรูปร่างและลักษณะของเซลล์และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด/field ของกล้องจุลทรรศน์ (โดยประมาณ) ถ้าตัวอย่างมีส่วนผสมของน้ำมันให้หยดสารละลาย xylene ลงบน warm-fixed film แล้วนำไปผ่านน้ำไหล (rinse) และย้อมสี ระหว่างเตรียมการย้อม ถ้าตัวอย่างถูกล้างออกไปจากแผ่นกระจก ให้ตรวจสอบตัวอย่างอาหารด้วยวิธี wet mount หรือ hanging drop หรือหยด chopped liver broth ที่ปราศจากเชื้อ บนแผ่นกระจก ผสมตัวอย่างอาหาร แล้วปล่อยให้แห้ง

7.6 การอ่านผลการเจริญของเชื้อ (Cultural findings) ใน acid broth และ malt extract broth

7.6.1 กรณีไม่พบการเจริญของเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง) ให้รายงานผล

7.6.2 กรณีพบหรือสงสัยว่ามีการเจริญของเชื้อ (acid broth ขุ่น, malt extract broth ขุ่น/มีฝ้า หรือพบเชื้อรา) นำมาย้อมสีแบบแกรม บันทึกลักษณะรูปร่างและการติดสีของเชื้อ กรณีต้องการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ให้ streak บน NA plate หรือ SAB plate แยกบ่มที่ สภาวะ AnO_2 และ O_2 ตามอุณหภูมิที่พบการเจริญของเชื้อ ดังแผนภูมิที่ 1 (การถ่ายเชื้อ)



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการเพาะเชื้อของอาหารที่มีความเป็นกรด



7.7 การแปลผล (Interpretation of results)

- 7.7.1 การเน่าเสียของอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรด โดยทั่วไปเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli ซึ่งไม่สร้างสปอร์ และยีสต์ มะเชื้อเทศและน้ำมะเชื้อเทศกระป๋อง ที่มีลักษณะกระป๋องปกติ (flat) แต่ผลิตภัณฑ์มักมีกลิ่นผิดปกติ โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบสอาจจะลดลงหรือไม่ลดลงก็ได้ เนื่องจากกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ทั้ง aerobic mesophilic และ aerobic thermophilic ซึ่งการเน่าเสียแบบนี้เป็นข้อบกพร่องของผลิตภัณฑ์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำกว่า 4.6 ที่มีความต้านทานการเน่าเสียจากกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างสปอร์
- 7.7.2 อาหารกระป๋องหลายชนิดที่มีเชื้อเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophiles) และไม่เจริญภายใต้การเก็บรักษาปกติ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (50-55°C) เชื้อจะเจริญและทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *B. thermoacidurans* ซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียแบบ flat- sour การบ่มที่ 55°C ไม่ทำให้สภาพกระป๋องเปลี่ยนแปลง แต่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นผิดปกติและค่าความเป็นกรด-เบสอาจจะลดลงหรือไม่ลดลง การเน่าเสียของมะเชื้อเทศ แพร่ มะเดื่อ สับปะรด บางครั้งเกิดจาก *C. pasteurianum* ที่สร้างก๊าซและกลิ่นกรดบิวทิริก (butyric odor) สำหรับ *C. thermosaccolyticum* เป็น thermophilic anaerobes ที่ทำให้กระป๋องบวม และผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเนยแข็ง (cheesy odor)
- 7.7.3 กระป๋องที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนมักปนเปื้อนด้วยเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์ และเชื้อสร้างสปอร์ ลักษณะการเน่าเสียจะเหมือนกรณีกระป๋องรั่ว
- 7.7.4 ถ้าพบกลุ่มแบคทีเรียมีชีวิตรูปท่อน (rod) และรูปกลม (cocci) บ่งชี้ว่าเกิดจากกระป๋องรั่ว หรืออาจเกิดจากอาหารกระป๋องไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ ซึ่งกรณีนี้คาดว่าจะพบกระป๋องบวมในอัตราสูง
- 7.7.5 ถ้าพบกลุ่มแบคทีเรียปริมาณมากในอาหารจากการทำ direct smear แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อ (no growth) ในขั้นตอนการเพาะเชื้อ อาจบ่งชี้ได้ว่าการเน่าเสียจากแบคทีเรียในอาหารก่อนการบรรจุกระป๋อง (precanning) อาหารอาจมีค่าความเป็นกรด-เบส กลิ่นและลักษณะผิดปกติ



7.7.6 ถ้าตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อในกระป๋องบวม แสดงว่ากระป๋องบวมเนื่องจากก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีของอาหารกับผิวด้านในภาชนะบรรจุ แต่ถ้ากระป๋องบวมที่เกิดจาก thermophilic anaerobes ซึ่งสร้างก๊าซและเซลล์แตกสลายอย่างรวดเร็วหลังจากเจริญกรณีนี้อาจทำให้สับสนว่ากระป๋องบวมเนื่องจากก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้การแตกตัวทางเคมีของอาหารอาจทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โดยเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลและกรด และปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้น

8. การรายงานผล (Expression of results)

- 8.1 แบบที่เรียกชนิดขอบ หรือทนกรดเจริญที่ $30^\circ C$ /น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ
- 8.2 แบบที่เรียกชนิดขอบ หรือทนกรดเจริญที่ $55^\circ C$ /น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ
- 8.3 ยีสต์และรา/น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น

- 9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) จุลินทรีย์เจริญที่ $30^\circ C$ และ $55^\circ C$ ในอาหารชนิดที่มีความเป็นกรด



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Acid broth

Proteose peptone	5 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Dextrose	5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ $121^{\circ}C$ 15 นาที pH 5.0 ± 0.2

2. Malt extract broth

Malt extract base	6 กรัม
Maltose, technical	1.8 กรัม
Dextrose	6 กรัม
Yeast extract	1.2 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ $121^{\circ}C$ 15 นาที pH 4.7 ± 0.2



3. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย
แบ่งใส่ขวด มาเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

4. Sabouraud's dextrose agar (SAB)

Polypeptone or neopeptone	10 กรัม
Dextrose	40 กรัม
Agar	15-20 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย
แบ่งใส่ขวด มาเชื้อที่ $118 - 121^{\circ}\text{C}$ 15 นาที pH 5.6 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. 4% Iodine in 70% ethanol

Potassium iodide	10 กรัม
Iodine	10 กรัม
Ethanol (70%)	500 มิลลิลิตร

2. น้ำปูนใส (lime water)

ปูนแดงผสมน้ำ กวนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ตกตะกอน นำน้ำส่วนใสด้านบนมาใช้
น้ำปูนใสหรือสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีคุณสมบัติเป็นด่าง



3. Crystal violet stain

Crystal violet (90% dye content)	2 กรัม
Ethanol (95%)	20 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	80 มิลลิลิตร

4. Methylene blue stain (Loeffler's)

Solution A

Methylene blue (90% dye content)	0.3 กรัม
Ethanol (95%)	30 มิลลิลิตร

Solution B

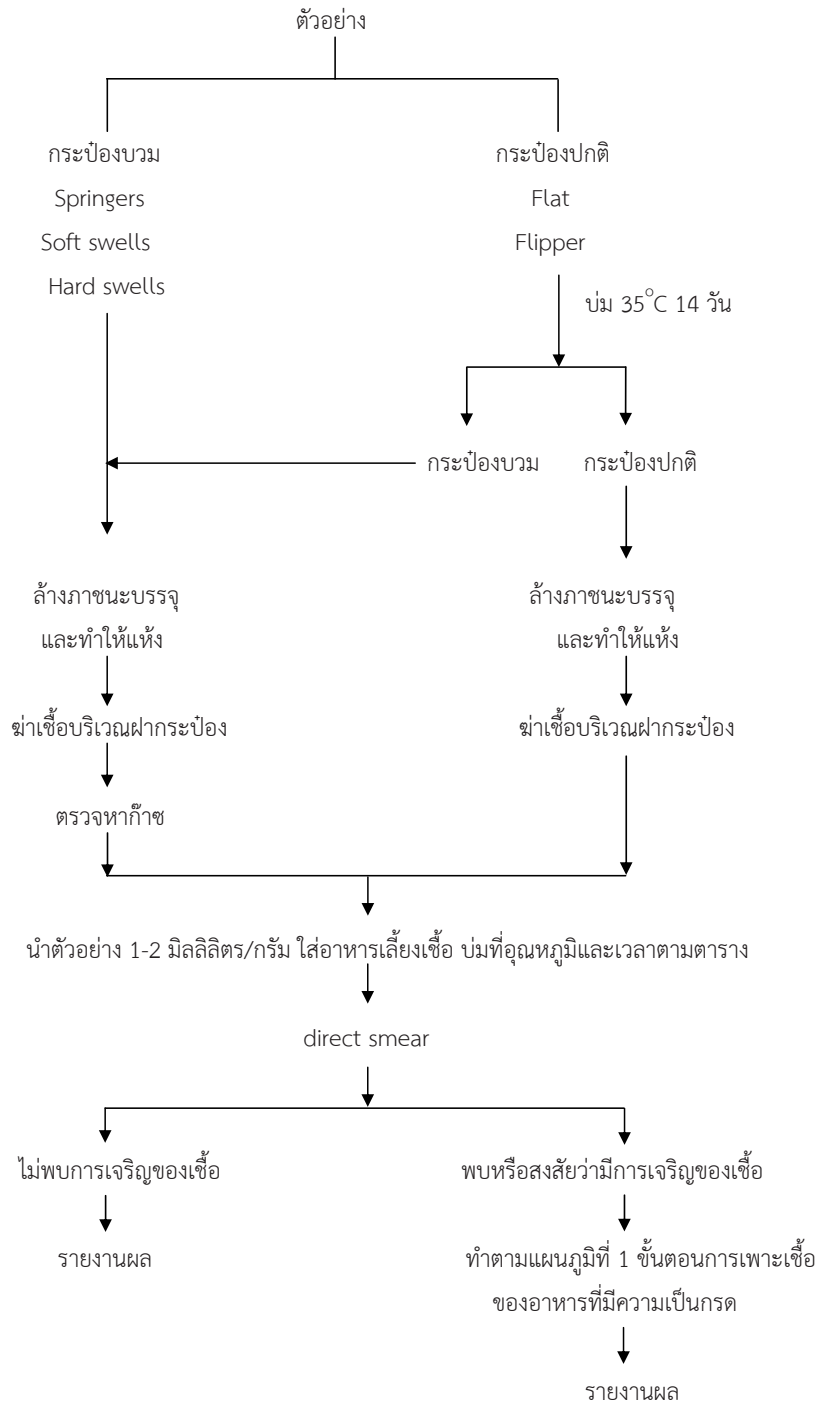
Diluted potassium hydroxide (0.01%)	100 มิลลิลิตร
-------------------------------------	---------------

ผสม solution A และ B

5. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป



ภาคผนวก 2



แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) จุลินทรีย์เจริญที่ 30°C และ 55°C ในอาหารชนิดที่มีความเป็นกรด

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. นางสาวจรรวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล | ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร |
| 2. นางนิตยา พันธุ์บัว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 3. นางปวีณา พานิชกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 4. นางสาวสีแพร ชูชีวา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
บรรณาธิการ |
| 5. นางปิยมาศ แจ่มศรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |



วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 4001	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB พื้นฐาน	-	195
DMSc F 4002	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Basic silica method	-	201
DMSc F 4003	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Qualitative endogenous gene testing: lectin (by means of Polymerase Chain Reaction)	-	207
DMSc F 4004	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Qualitative endogenous gene testing: the chloroplast trnL intron (by means of Polymerase Chain Reaction)	-	215
DMSc F 4005	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Qualitative endogenous gene testing: Invertase (by means of Polymerase Chain Reaction)	-	223
DMSc F 4006	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Qualitative endogenous gene testing: hmgA (by means of real-time Polymerase Chain Reaction)	-	231
DMSc F 4007	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: CaMV-35S promoter (by means of Polymerase Chain Reaction)	-	239
DMSc F 4008	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: NOS-terminator (by means of Polymerase Chain Reaction)	-	247
DMSc F 4009	อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: nptII (by means of Polymerase Chain Reaction)	-	255



**DMSc F 4001: การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบของพืช
ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี CTAB พื้นฐาน**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB extraction ในตัวอย่างข้าวโพด ถั่วเหลือง และอาหารที่มีส่วนประกอบจากข้าวโพดและถั่วเหลือง เหมาะกับตัวอย่างที่เป็น medium ถึง high processed food

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276: 2006 (E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21571: 2005 (E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

CTAB ชื่อเต็มคือ Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (cetyltrimethylammonium bromide)
PCR: Polymerase Chain Reaction

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป

เป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดีเพียงพอในการนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (คุณภาพในที่นี้หมายถึงปริมาณและความยาวของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีมากพอสำหรับการวิเคราะห์หาขั้นต่อไป โดยไม่กล่าวถึงดีเอ็นเอทั้งจีโนม)

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เป็นวิธีการเฉพาะในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหรืออาหารที่มีส่วนประกอบของพืชและสามารถลดหรือกำจัดสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์และสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของดีเอ็นเอซึ่งต้องนำไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไปวิธีนี้มีขั้นตอนการทำลายผนังเซลล์ด้วย CTAB ร่วมกับความร้อน ตามด้วยขั้นตอนการกำจัดสารที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR



อีกหลายขั้นตอน การเติม α -amylase ในการสกัดอาหารหลาย ๆ ชนิด จะสามารถช่วยย่อยสลายสารจำพวกแป้งได้ หรือการใส่ Proteinase-K จะช่วยลดปริมาณโปรตีนได้ นอกจากนี้แนะนำให้ใช้ RNase-A ในการกำจัด RNA ออกไปด้วยเพราะอาจรบกวนการวิเคราะห์ได้ ความเข้มข้นของเกลือและคลอโรฟอร์มมีส่วนสำคัญอย่างมาก เนื่องจาก DNA จะตกตะกอนได้ต้องมีความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ ประมาณ 0.5 M และ/หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 16°C ปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นจะทำให้โปรตีนและ polysaccharides ตกตะกอน ในขณะที่ DNA ยังคงละลายอยู่ในน้ำ ส่วนคลอโรฟอร์มจะช่วยแยกดีเอ็นเอออกจาก CTAB และสารประกอบโพลีแซคคาไรด์กับโปรตีน

4.3 การวัดค่าดีเอ็นเอที่สกัดได้

เป็นขั้นตอนที่มีประโยชน์สำหรับการทำ PCR เพื่อทดสอบหาชนิดเป้าหมาย สามารถทำได้หลายเทคนิค คือเทคนิคทางฟิสิกส์ (เช่น วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะ) เทคนิคเคมี-ฟิสิกส์ (เช่น ใช้การแทรกหรือจับกันของดีเอ็นเอกับสารฟลูออเรสเซนต์ทำให้เกิดการเรืองแสง) การใช้เอนไซม์ (เช่น การตรวจวัดแสงทางชีวภาพ) หรือการวัดปริมาณโดยวิธี PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบของอาหารตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยๆ หรือตัวอย่างที่ดีเอ็นเอถูกทำลาย

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 α -amylase (ในกรณีที่ต้องใช้) เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 10 mg/ml (โดยละลายในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อหลังการเตรียม แบ่งเป็นหลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C หลีกเลี่ยงการละลายหลายรอบ)
- 5.2 Chloroform
- 5.3 Ethanol absolute
- 5.4 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA)
- 5.5 Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)
- 5.6 Hydrochloric acid 37%
- 5.7 Isopropanol
- 5.8 Proteinase-K (ในกรณีที่ต้องใช้) เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 20 mg/ml (โดยละลายในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อหลังการเตรียม แบ่งเป็นหลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C หลีกเลี่ยงการละลายหลายรอบ)



- 5.9 RNase A (DNase free), สารละลายความเข้มข้น 10 mg/ml (แบ่งเป็นหลอดเล็ก ๆ เก็บที่ -20°C)
- 5.10 Sodium chloride
- 5.11 Sodium hydroxide
- 5.12 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)
- 5.13 CTAB extraction buffer (CTAB 20 g/l, NaCl 1.4 M, Tris 0.1 M, Na_2EDTA 0.02 M) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย HCl หรือ NaOH
- 5.14 CTAB-precipitation buffer (CTAB 5 g/l, NaCl 0.04 M)
- 5.15 Sodium chloride solution ความเข้มข้น 1.2 M
- 5.16 Ethanol solution เตรียมเป็น 70%
- 5.17 TE buffer (Tris 0.01 M, Na_2EDTA 0.0001 M) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย HCl หรือ NaOH

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Incubator ควรใช้ชนิดที่เขย่าได้
- 6.2 Centrifuge (ปั่นเหวี่ยงได้สูงสุด 12,000 g)
- 6.3 Mixer

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)
 - 7.1.1 ใช้ตัวอย่างทดสอบ (test portion) ที่เป็นตัวแทนที่เหมาะสมจากตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ (Lab sample) ซึ่งในกรณีที่ต้องการ LOD 0.1% ต้องใช้ตัวอย่างปริมาณไม่น้อยกว่า 3,000 particles
 - 7.1.2 นำตัวอย่างของห้องปฏิบัติการทั้งหมดมาบดป่นและคนให้เข้ากันก่อนสุ่มตัวอย่างทดสอบไปสกัด ระวังการปนเปื้อนขณะทำการบดป่น หรือเตรียมตัวอย่าง
 - 7.1.3 ตัวอย่างที่เป็นของเหลวให้ผสมให้เข้ากันให้ดีก่อนหรือในกรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ตกตะกอนได้ ให้ทำการผสมจนมั่นใจว่าไม่มีตะกอนติดอยู่ที่ก้นภาชนะ
 - 7.1.4 ตัวอย่างที่เป็นของเหนียวข้นหรืออยู่ในสภาพที่บดได้ยาก อาจเพิ่มขั้นตอนช่วงก่อนบดหรือกำลังบดได้คือ การให้ความร้อนที่ 40°C การละลายน้ำเพิ่มขึ้น การแช่แข็งที่ -20°C หรือต่ำกว่า



7.1.5 กรณีตัวอย่างมีส่วนประกอบหลายอย่างที่สามารถแยกส่วนเป้าหมายการทดสอบได้ เช่น ขนมอบังไสปลาอาจใช้การสุมแยกเฉพาะส่วนที่ต้องการนำไปสกัดดีเอ็นเอเท่านั้น

7.2. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ต้องมีการกำจัดหรือลดปริมาณการปะปนของสารที่มีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ ดังนี้

Polysaccharides สามารถกำจัดโดยใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม (เช่น pectinase, α -amylase) หรือการสกัดด้วยสารอินทรีย์ (เช่น CTAB/chloroform)

RNA และ/หรือ โปรตีน ใช้วิธีที่เหมาะสมเช่นการใช้เอนไซม์ RNase -A และ proteinase-K ตามลำดับ ไขมัน ใช้ตัวทำละลาย เช่น n-hexane

เกลือที่มีในตัวอย่าง สารสกัดหรือขั้นตอนการตกตะกอนมีผลต่อการทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป จึงต้องระวังการเหลือตกค้าง โดยการปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.0 ก่อนการสกัด

7.3 ขั้นตอนการสกัด

7.3.1 ชั่งตัวอย่างทดสอบ 200 – 300 มิลลิกรัม ใส่หลอดขนาด 2-ml (แต่ในอาหารที่อาจมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรือเป็นดีเอ็นเอที่เสถียรภาพ ต้องมีการใช้ปริมาณตัวอย่างมากขึ้นเพื่อให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอ และมีคุณภาพเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป แต่ไม่แนะนำให้ใช้ปริมาณตัวอย่างทดสอบมากกว่า 2 กรัม และต้องมีการคำนวณปริมาตรสารต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างทดสอบที่เพิ่มขึ้นด้วย)

7.3.2 เติม CTAB extraction (5.13) ที่ให้ความร้อนไว้ที่อุณหภูมิ 65°C จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ในตัวอย่างบางชนิดอาจต้องใช้ CTAB extraction ในปริมาณที่มากกว่านี้ เพื่อให้สามารถผสมกับตัวอย่างได้ทั้งหมด)

7.3.3 เติม α -amylase 10 ไมโครลิตร (5.1) ผสมให้เข้ากัน (กรณีที่มีตัวอย่างมี polysaccharides)

7.3.4 บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นระยะๆ

7.3.5 เติม proteinase-K 10 ไมโครลิตร (5.8) ผสมให้เข้ากัน (กรณีที่มีตัวอย่างมีโปรตีน)

7.3.6 บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นระยะ

7.3.7 เหยียงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่ในหลอดขนาด 2-ml หลอดใหม่



- 7.3.8 เติมคลอโรฟอร์มในปริมาณ 0.7 – 1 เท่าของส่วนใสที่ดูดออกมา
- 7.3.9 เขย่าให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที
- 7.3.10 ดูดส่วนบน (aqueous phase) ใส่หลอดขนาด 2-ml หลอดใหม่
- 7.3.11 เติม CTAB precipitate (5.14) ในปริมาณ 2 เท่าของส่วนใสที่ดูดออกมา
- 7.3.12 บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 60 นาทีโดยไม่เขย่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที
- 7.3.13 เทส่วนใสทิ้ง
- 7.3.14 ละลายตะกอนด้วยสารละลาย NaCl (5.15) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร
- 7.3.15 เติมคลอโรฟอร์ม 350 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที
- 7.3.16 ดูดส่วนที่เป็น aqueous ใส่หลอดขนาด 1.5-ml หลอดใหม่
- 7.3.17 เติม isopropanol (5.7) ในอัตราส่วน 0.6 เท่าของส่วนใสทั้งหมด ผสมโดยการพลิกหลอด
- 7.3.18 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที
- 7.3.19 เทส่วนใสทิ้ง
- 7.3.20 เติม EtOH (5.16) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอด (เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากเพื่อที่จะกำจัด CTAB ออกให้หมด)
- 7.3.21 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
- 7.3.22 ละลายตะกอนในน้ำหรือ buffer ที่เหมาะสม เช่น TE buffer (5.17) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 7.3.23 เก็บดีเอ็นเอนี้เป็น master stock

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

วัดปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ Spectrophotometer วัดการดูดแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 260 และ 320 nm ค่า OD (optical density) วัดที่ 260 nm นำมาคำนวณค่าปริมาณดีเอ็นเอ โดย 1 OD ของดีเอ็นเอเส้นคู่และดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว (ที่ถูกทำให้เสียสภาพโดย 0.2M NaOH) จะมีปริมาณ 50 ng/ μ l และ 37 ng/ μ l ตามลำดับ



$$\text{DNA} = F \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times 50$$

เมื่อ F เป็นค่า dilution factor
OD₂₆₀ คือค่า absorbance เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm
OD₃₂₀ คือค่า absorbance เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 320 nm
50 เป็นค่า conversion factor ของดีเอ็นเอเส้นคู่มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
บันทึกผลค่าความเข้มข้นที่ได้เป็น ng/μl

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 สกัดตัวอย่างทดสอบเป็นจำนวนอย่างน้อย 2 sub-sample
- 9.2 ต้องมีการควบคุมคุณภาพในการสกัด โดยอย่างน้อยต้องประกอบด้วย extraction blank control และ positive extraction control หรือมีการทดสอบสถานะแวดล้อมเพิ่มเติมด้วย



**DMSc F 4002: การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบของพืช
ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Basic silica method**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Basic silica method ในตัวอย่างข้าวโพด ถั่วเหลือง และอาหารที่มีส่วนประกอบจากข้าวโพดและถั่วเหลืองที่ไม่ใช่ high-process food แต่ไม่แนะนำให้ใช้กับตัวอย่างที่มีไขมันปริมาณมาก

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.1 ISO 21571:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

PCR: Polymerase Chain Reaction

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป

เป็นขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดีเพียงพอในการนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (คุณภาพในที่นี้หมายถึงปริมาณและความยาวของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีมากพอสำหรับการวิเคราะห์หาขั้นตอนต่อไป โดยไม่กล่าวถึงดีเอ็นเอทั้งจีโนม)

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เป็นการแยกดีเอ็นเอออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ของตัวอย่างจากพืชหรือมีส่วนประกอบของพืช และสามารถใช้เป็นขั้นตอนกำจัดหรือลดปริมาณสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีอื่น

วิธีนี้มีขั้นตอนการทำลายผนังเซลล์โดยใช้ความร้อนร่วมกับ Sodium dodecyl sulfate ในสารละลายบัฟเฟอร์ และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ silica resin ในสารละลายที่มี



guanidine-hydrochloride ดีเอ็นเอจะจับกับ silica ในสภาวะที่มี water activity ต่ำ จากนั้นจะล้างสิ่งอื่นๆ ที่ปะปนอยู่ออกไปโดยใช้ iso-propanol โดยดีเอ็นเอยังคงติดอยู่กับ silica ขั้นตอนสุดท้ายใช้สารละลายที่มีปริมาณเกลือต่ำๆ ละลายดีเอ็นเอออกมา

4.3 การวัดค่าดีเอ็นเอที่สกัดได้

เป็นขั้นตอนที่มีประโยชน์สำหรับการทำ PCR เพื่อทดสอบหาชนิดเป้าหมาย สามารถทำได้หลายเทคนิค คือเทคนิคทางฟิสิกส์ (เช่น วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะ) เทคนิคเคมี-ฟิสิกส์ (เช่น ใช้การแทรกหรือจับกันของดีเอ็นเอกับสารฟลูออเรสเซนต์ทำให้เกิดการเรืองแสง) การใช้เอนไซม์ (เช่น การตรวจวัดแสงทางชีวภาพ) หรือการวัดปริมาณโดยวิธี PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบของอาหาร ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยๆ หรือตัวอย่างที่ดีเอ็นเอถูกทำลาย

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Sodium chloride (NaCl)
- 5.2 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$)
- 5.3 Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium salt (Na_2EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)
- 5.4 Hydrochloric acid, (HCl) 37%
- 5.5 Sodium hydroxide (NaOH)
- 5.6 Sodium dodecyl sulfate (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$)
- 5.7 Proteinase-K ~ 20 U/mg ชนิด lyophilised
- 5.8 Guanidine hydrochloride (CH_5N_3-HCl)
- 5.9 Potassium chloride (KCl)
- 5.10 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
- 5.11 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- 5.12 Isopropanol [$CH_3CH(OH)CH_3$]
- 5.13 Silica (SiO_2), silicon dioxide ที่มีขนาดระหว่าง 0.5 และ 10 ไมโครเมตร (โดยประมาณ 80% จะเป็นขนาดระหว่าง 1 ถึง 5 ไมโครเมตร) Silica suspension: ชั่ง silica 5 g (5.13) ใส่หลอด 50-ml เติม PBS-buffer (5.18) 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ใช้ pipette ดูดส่วนใสออก แล้วเติม PBS-buffer (5.18) อีก 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ใช้ pipette ดูดส่วนใสออก หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ 2000g เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส



ที่เหลือทั้งหมด แล้วเติม guanidine-HCl solution II (5.17) 50 มิลลิลิตร Silica ที่เตรียมมีอายุการใช้งาน 2 – 5 เดือน

- 5.14 RNase-A, DNase-free สารละลายความเข้มข้น 10 mg/ml (แบ่งเป็นหลอดเล็ก ๆ เก็บที่ -20°C)
- 5.15 Proteinase-K เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 20 mg/ml (โดยละลายในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วโดย ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อหลังการเตรียม แบ่งเป็นหลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C หลีกเลียงการละลายหลายรอบ)
- 5.16 Guanidine hydrochloride solution I, $(\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}) = 5 \text{ mol/l}$ (นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที)
- 5.17 Guanidine-HCl solution II, $(\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}) = 6 \text{ mol/l}$ (นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที)
- 5.18 PBS-buffer solution ($\text{NaCl} = 0.157 \text{ mol/l}$, $\text{KCl} = 0.0027 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 0.010 \text{ mol/l}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.0018 \text{ mol/l}$)
- 5.19 TNE-SDS extraction buffer ($\text{NaCl} = 0.150 \text{ mol/l}$, $\text{Tris} = 0.002 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} = 0.002 \text{ mol/l}$, $\text{SDS} = 10\text{g/l}$) ปรับ pH 8.0 ด้วย HCl หรือ NaOH และนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ก่อนเติม SDS
- 5.20 Isopropanol solution, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 = 80\%$
- 5.21 TE-buffer solution ($\text{Tris} = 0.010 \text{ mol/l}$ and $\text{Na}_2\text{EDTA} = 0.001 \text{ mol/l}$) ปรับ pH 8.0 ด้วย HCl หรือ NaOH

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Centrifuge ที่มีความเร็วรอบอย่างน้อย 2,000 g บางขั้นตอนต้องใช้แบบที่มีการให้ความเย็นขณะปั่นเหวี่ยง
- 6.2 Oven หรือ incubator โดยมีอุณหภูมิใช้งานที่ 60°C
- 6.3 Shaker
- 6.4 Mixer
- 6.5 Centrifugation vials ขนาด 50 ml สำหรับเตรียม silica suspension.
- 6.6 UV Spectrophotometer



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 ใช้ตัวอย่างทดสอบ (test portion) ที่เป็นตัวแทนที่เหมาะสมจากตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ (Lab sample) ซึ่งในกรณีที่ต้องการ LOD 0.1% ต้องใช้ตัวอย่างปริมาณไม่น้อยกว่า 3,000 particles
- 7.1.2 นำตัวอย่างของห้องปฏิบัติการทั้งหมดมาบดป่นและคนให้เข้ากันก่อนสุ่มตัวอย่างทดสอบนำไปสกัด ระวังการปนเปื้อนขณะทำการบดป่น หรือเตรียมตัวอย่าง
- 7.1.3 ตัวอย่างที่เป็นของเหลวให้ผสมให้เข้ากันให้ดีก่อน หรือในกรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ตกตะกอนได้ ให้ทำการผสมจนมั่นใจว่าไม่มีตะกอนติดอยู่ที่ก้นภาชนะ
- 7.1.4 ตัวอย่างที่เป็นของเหนียวข้นหรืออยู่ในสภาพที่บดได้ยาก อาจเพิ่มขั้นตอนช่วงก่อนบดหรือกำลังบดได้คือ การให้ความร้อนที่ 40°C การละลายน้ำเพิ่มขึ้น การแช่แข็งที่ -20°C หรือต่ำกว่า
- 7.1.5 กรณีตัวอย่างมีส่วนประกอบหลายอย่างที่สามารถแยกส่วนเป้าหมายการทดสอบได้ เช่น ขนมปั่นใส่ปลาอาจใช้การสุ่มแยกเฉพาะส่วนที่ต้องการนำไปสกัดดีเอ็นเอเท่านั้น

7.2. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ต้องมีการกำจัดหรือลดปริมาณการปะปนของสารที่มีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ ดังนี้

การสกัด Polysaccharides สามารถกำจัดโดยใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมก่อนขั้นตอนการสกัด (เช่น pectinase, α -amylase) หรือใช้การสกัดด้วยสารอินทรีย์ก่อน การตกตะกอนดีเอ็นเอ (เช่น chloroform)

RNA และ/หรือโปรตีน ใช้วิธีที่เหมาะสมเช่นการใช้เอนไซม์ RNase-A และ proteinase-K ตามลำดับ

ไขมัน ใช้ตัวทำละลายเช่น n-hexane เดิมพร้อม extraction buffer

เกลือที่มีในตัวอย่างสารสกัดหรือขั้นตอนการตกตะกอนมีผลต่อการทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป จึงต้องระวังการเหลือตกค้าง โดยการปรับ pH ให้ได้ ประมาณ 7.0 ก่อนการสกัด

7.3 ขั้นตอนการสกัด

- 7.3.1 ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 200 – 300 มิลลิกรัม (แต่ในอาหารที่อาจมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย หรือ เป็นดีเอ็นเอที่เสถียรภาพ ต้องมีการใช้ปริมาณตัวอย่างมากขึ้นเพื่อให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอและมีคุณภาพเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป แต่ไม่แนะนำให้ใช้ปริมาณ



ตัวอย่างทดสอบมากกว่า 2 กรัม และต้องมีการคำนวณปริมาตรสารต่างๆ ให้
เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างทดสอบที่เพิ่มขึ้นด้วย)

- 7.3.2 เติม extraction buffer (5.19) 2 มิลลิลิตร และ Proteinase-K (5.15) 20 ไมโครลิตร
- 7.3.3 บ่มที่ 60°C เป็นเวลา 1 – 5 ชั่วโมง พร้อมเขย่าอย่างรุนแรง (ประมาณ 250 รอบ/นาที)
- 7.3.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่ในหลอดขนาด 2-ml หลอดใหม่
- 7.3.5 เติม RNase-A (5.14) ปริมาณ 2 ไมโครลิตรลงในส่วนใส บ่ม 5 นาทีที่ 37°C (ขั้นตอน
การกำจัดอาร์เอ็นเอนี้ ต้องทำก่อนขั้นตอนผสมกับ silica เพื่อให้การวัดค่าด้วย
UV-spectrophotometer มีความถูกต้องมากขึ้น)
- 7.3.6 เติม Guanidine-HCl (5.16) ปริมาณ 55 ไมโครลิตร และ silica suspension (5.17
ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที
- 7.3.7 ปั่นเหวี่ยงที่ 800 g เป็นเวลา 2 นาที
- 7.3.8 ทิ้งส่วนใสแล้วเติม isopropanol (5.20) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
(อาจใช้ mixer ในการผสม)
- 7.3.9 ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 g เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส
- 7.3.10 ทิ้งให้แห้ง
- 7.3.11 ละลายตะกอนใน TE buffer (5.21) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมอย่างระมัดระวัง
- 7.3.12 บ่มที่ 60°C เป็นเวลา 5 นาที
- 7.3.13 ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 5 นาที
- 7.3.14 ดูด 80% ของส่วนใสใส่หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้มี silica ติดมาด้วย เพราะ silica
มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่น DNA polymerase)
- 7.3.15 เติม RNase-A (5.14) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าความ
เข้มข้น
โดยใช้ UV spectrophotometer เก็บดีเอ็นเอนี้เป็น master stock

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

วัดปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ spectrophotometer วัดการดูดแสงในช่วงความยาวคลื่นที่
260 และ 320 nm ค่า OD (optical density) วัดที่ 260 nm นำมาคำนวณค่าปริมาณดีเอ็นเอ
โดย 1 OD ของดีเอ็นเอเส้นคู่และดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว (ที่ถูกทำให้เสียสภาพโดย 0.2 M NaOH)
จะมีปริมาณ 50 ng/μl และ 37 ng/μl ตามลำดับ



$$\text{DNA} = F \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times 50$$

เมื่อ F เป็นค่า dilution factor

OD_{260} คือค่า absorbance เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm

OD_{320} คือค่า absorbance เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 320 nm

50 เป็นค่า conversion factor ของดีเอ็นเอเส้นคู่มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
บันทึกผลค่าความเข้มข้นที่ได้เป็น ng/ μ l

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 สกัดตัวอย่างทดสอบเป็นจำนวนอย่างน้อย 2 sub-sample

9.2 ต้องมีการควบคุมคุณภาพในการสกัด โดยอย่างน้อยต้องประกอบด้วย extraction blank control และ positive extraction control หรือมีการทดสอบสถานะแวดล้อมเพิ่มเติมด้วย



**DMSc F 4003: Qualitative endogenous gene testing: lectin
(by means of Polymerase Chain Reaction)**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของถั่วเหลือง (Glycine max) โดยตรวจหา ยีน lectin (เป็นยีนที่พบในถั่วเหลืองทั้งจากธรรมชาติและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม) ในอาหารที่มีส่วนประกอบหรือมีการปะปนของถั่วเหลืองและเพื่อทดสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทดสอบที่มีส่วนประกอบหรือมีการปะปนของถั่วเหลือง โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21571: 2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำให้ในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
- 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
- 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
- 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล
- สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ และสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR products ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Water ชนิด PCR grade
- 5.2 PCR buffer (อาจมีหรือไม่มี $MgCl_2$ ผสมอยู่) ความเข้มข้น 10 เท่า
- 5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l
- 5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 5 mM
- 5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μM
- 5.5.1 Forward primer: Soya bean lectin gene (GenBank[®] accession No. K00821) Primer-1
GM03: 5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'
- 5.5.2 Reverse primer: Soya bean lectin gene (GenBank[®] accession No. K00821) Primer-2
GM04: 5'-gCC CAT CTg CAA gCC TTT TTg Tg-3'



- 5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 U/ μ l
- 5.7 Agarose ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดดีเอ็นเอของ PCR products เป้าหมาย
- 5.8 Boric acid (H_3BO_3) สำหรับเตรียม TBE buffer
- 5.9 Bromophenol blue ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) และ/หรือ xylene cyanole FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)
- 5.10 ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมกับขนาดของ PCR products (เช่น restriction-digested λ -Phage DNA สำหรับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ 100 bp ladder)
- 5.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) สำหรับเตรียม TAE buffer
- 5.12 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2 -EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)
- 5.13 Ethidium bromide (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 0.5 mg/l
- 5.14 Glycerol
- 5.15 Sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$) สำหรับเตรียม TAE buffer เท่านั้น
- 5.16 Hydrochloric acid (HCl) = 37%
- 5.17 Sodium hydroxide (NaOH)
- 5.18 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$)
- 5.19 TAE buffer solution (1x) (Tris = 0.050 mol/l, Sodium acetate = 20 mmol/l, Na_2 -EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ glacial acetic acid หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 50x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.20 Tris/borate (TBE) buffer solution (0.5x) (Tris = 0.055 mol/l, boric acid = 0.055 mol/l, Na_2 EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 10x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.21 Sample loading buffer solution (5x) (glycerol = 50%, bromophenol blue = 2.5 g/l และ/หรือ xylene cyanol = 2.5 g/l) ละลายใน buffer ชนิดเดียวกับที่ต้องการใช้งาน (TAE or TBE)
- 5.22 Ethidium bromide solution (EtBr) = 0.5 mg/l



ข้อแนะนำ :

- 5.22.1 หลีกเลี่ยงการเตรียมโดยการชั่ง EtBr ออกมาใส่ภาชนะอื่นแล้วละลายน้ำ แต่ให้เตรียมโดยเทน้ำลงไปในภาชนะบรรจุของ EtBr หรือใช้ EtBr ที่เป็นเม็ดเพื่อละลายน้ำ
- 5.22.2 ควรเตรียมเป็น ethidium bromide solution ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บให้พ้นจากแสงที่ 5°C

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Thermal cycler
- 6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply โดยทั่วไปใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 5V/cm (ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบขึ้นกับขนาด gel tray)
- 6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.
- 6.4 Recording instrument เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ Lectin_1

ตาราง Lectin_1

Reagent	Final concentration
De-ionized water (μl)	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 25
10x buffer + 15 mM MgCl ₂	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
5 mM dNTP	0.8 mM
10 μM primer-1	0.2 μM
10 μM primer-2	0.2 μM
5U/μl DNA taq polymerase	0.5 U
Total (μl)	25
DNA template (μl)	10 – 50 ng



7.2 สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction control

7.2.2 extraction blank control

7.2.3 positive DNA target control จากถั่วเหลือง GTS 40-3-2

7.2.4 negative DNA target control

7.2.5 amplification reagent control

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง Lectin_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง Lectin_2

Step	Time/temp
Activation/ Initial denature	10 min/ 95°C
Amplification	30 s/ 95°C
	30 s/ 60 °C
	60 s/ 72 °C
Number of cycles	35
Final extension	3 min/ 72 °C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR products

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr

7.4.1 ชั่ง agarose ในปริมาณที่เหมาะสม (0.8 – 1.0% ในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ แต่ PCR products ที่มีขนาดเล็กไม่ควรใช้ปริมาณ agarose สูงกว่านี้ และอาจสูงได้ถึง 4.0%) ละลายใน buffer (TAE หรือ TBE ตามชนิดที่ใช้ในขณะที่แยกดีเอ็นเอจากกระแสไฟฟ้า)



- 7.4.2 ละลายใน microwave หรือ water bath เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง
- 7.4.3 ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 60°C แล้วเทลง gel tray โดยใช้ sample comb ที่เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) เจลที่เตรียมไม่ควรมีความหนาเกิน 1 เซนติเมตร
- 7.4.4 แกะ comb ออกและยกเจลไปวางใน electrophoresis chamber
- 7.4.5 เท buffer (ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเจลและ loading buffer) ลงไปให้ท่วมเหนือเจล 2 มิลลิเมตร
- 7.4.6 ผสม PCR products (5 µl หรือ 10 µl) กับ loading buffer ประมาณ 20% ของปริมาตรรวมทั้งหมด (เช่น ใช้ loading buffer 2.5 µl + PCR products 10µl) หยดลงในหลุมเทียบกับ 100 bp ladder
- 7.4.7 เปิดเครื่อง electrophoresis chamber
- 7.4.8 ปิดเครื่องเมื่อครบเวลา แล้วนำเจลออกไปแช่ในสารละลาย EtBr 15 – 50 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกโดยการแช่ในน้ำ 10 – 30 นาที
- 7.4.9 บันทึกภาพเจลภายใต้แสง UV

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ตัวอย่างทดสอบหลอดจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR products เท่ากับ positive control คือเท่ากับ 118 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9
- 8.2 การสรุปผล :
 - 8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ
- 8.3 การรายงาน
 - 8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
ยีนจำเพาะของถั่วเหลือง (lectin) พบ/ detected
 - 8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
ยีนจำเพาะของถั่วเหลือง (lectin) ไม่พบ/ not detected



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 9.1 positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 extraction blank control | ต้องให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |



DMScF 4004: Qualitative endogenous gene testing: the chloroplast *trnL* intron (by means of Polymerase Chain Reaction)

1. ขอบข่าย (Scope)

การทดสอบหาดีเอ็นเอของยีน *trnL* intron ที่มีใน chloroplast ของพืชทุกชนิด โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และเป็นวิธีที่ใช้ควบคุม ว่าวิธีที่สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร มีความเหมาะสมและมีดีเอ็นเอของพืชในอาหารนั้น ๆ ในกรณีอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตจะใช้วิธีนี้ตรวจได้หรือไม่ ขึ้นกับอัตราการสูญเสียสภาพดีเอ็นเอ เนื่องจาก PCR products ที่เกิดจากการทดสอบนี้จะให้ดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า ลำดับเบสที่ใช้ทดสอบหาพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น ๆ ในตัวอย่างทดสอบ วิธีนี้ไม่ควรใช้เป็นวิธีควบคุมในการตรวจเชิงปริมาณ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21571:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
- 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
- 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
- 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล
- สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอและสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย้อมด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR products ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Water ชนิด PCR grade
- 5.2 PCR buffer (อาจมีหรือไม่มี $MgCl_2$ ผสมอยู่) ความเข้มข้น 10 เท่า
- 5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l
- 5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 5 mM



- 5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M
- 5.5.1 Forward primer: Chloroplast tRNA gene (GenBank[®] accession No. Z00044, X15901) Primer-1 c [14]: 5'-CgA AAT Cgg TAg ACg CTA Cg-3'
- 5.5.2 Reverse primer: Chloroplast tRNA gene (GenBank[®] accession No. Z00044, X15901) Primer-2 d [14]: 5'-ggg gAT AgA ggg ACT TgA AC-3'
- 5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR) 5 U/ μ l
- 5.7 Agarose ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดดีเอ็นเอของ PCR products เป้าหมาย
- 5.8 Boric acid (H_3BO_3) สำหรับเตรียม TBE buffer
- 5.9 Bromophenol blue ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) และ/หรือ xylene cyanole FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)
- 5.10 ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล ที่เหมาะสมกับขนาดของ PCR products (เช่น restriction-digested λ -Phage DNA สำหรับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ 100 bp ladder)
- 5.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) สำหรับเตรียม TAE buffer
- 5.12 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2 -EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)
- 5.13 Ethidium bromide (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 0.5 mg/l
- 5.14 Glycerol
- 5.15 Sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$) สำหรับเตรียม TAE buffer เท่านั้น
- 5.16 Hydrochloric acid (HCl) = 37%
- 5.17 Sodium hydroxide (NaOH)
- 5.18 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$)
- 5.19 TAE buffer solution (1x) (Tris = 0.050 mol/l, Sodium acetate = 20 mmol/l, Na_2EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ glacial acetic acid หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 50x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)



- 5.20 Tris/borate (TBE) buffer solution (0.5x) (Tris = 0.055 mol/l, boric acid = 0.055 mol/l, Na_2EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 10x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.21 Sample loading buffer solution (5x) (glycerol = 50 %, bromophenol blue = 2.5 g/l และ/หรือ xylene cyanol = 2.5 g/l) ละลายใน buffer ชนิดเดียวกับที่ต้องการใช้งาน (TAE or TBE)
- 5.22 Ethidium bromide solution (EtBr) = 0.5 mg/l

ข้อแนะนำ :

- 5.22.1 หลีกเลี่ยงการเตรียมโดยการชั่ง EtBr ออกมาใส่ภาชนะอื่นแล้วละลายน้ำแต่ให้เตรียมโดยเทน้ำลงไปในภาชนะบรรจุของ EtBr หรือใช้ EtBr ที่เป็นเม็ดเพื่อละลายน้ำ
- 5.22.2 ควรเตรียมเป็น ethidium bromide solution ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บให้พ้นจากแสงที่ 5°C

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Thermal cycler
- 6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply โดยทั่วไปใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 5V/cm (ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบขึ้นกับขนาด gel tray)
- 6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.
- 6.4 Recording instrument เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ CT_1



ตาราง CT_1

Reagent	Final concentration
De-ionized water (μl)	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 25
10x buffer + 15 mM MgCl ₂	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
5 mM dNTP	0.8 mM
10 μM primer-1	0.8 μM
10 μM primer-2	0.8 μM
5U/μl DNA taq polymerase	0.5 U
Total (μl)	25
DNA template (μl)	10 – 50 ng

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction control

7.2.2 extraction blank control

7.2.3 positive DNA target control เช่น ถั่วเหลือง GT 40-3-2

7.2.4 negative DNA target control

7.2.5 amplification reagent control

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง CT_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ



ตาราง CT_2

Step	Time/temp
Activation/ Initial denature	4 min/ 94°C
Amplification	30 s/ 95°C
	30 s/ 55°C
	120 s/ 72°C
Number of cycles	35
Final extension	5 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR products

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr

7.4.1 ชั่ง agarose ในปริมาณที่เหมาะสม (0.8 – 1.0% ในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ แต่ PCR products ที่มีขนาดเล็กควรใช้ปริมาณ agarose สูงกว่านี้ และอาจสูงได้ถึง 4.0%) ละลายใน buffer (TAE หรือ TBE ตามชนิดที่ใช้ในขณะที่แยกดีเอ็นเอจากกระแสไฟฟ้า)

7.4.2 ละลายใน microwave หรือ water bath เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง

7.4.3 ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 60°C แล้วเทลง gel tray โดยใช้ sample comb ที่เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) เจลที่เตรียมไม่ควรมีความหนาเกิน 1 เซนติเมตร

7.4.4 แกะ comb ออกและยกเจลไปวางใน electrophoresis chamber

7.4.5 เท buffer (ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเจลและ loading buffer) ลงไปให้ท่วมเหนือเจล 2 มิลลิเมตร



- 7.4.6 ผสม PCR products (5µl หรือ 10µl) กับ loading buffer ประมาณ 20% ของปริมาตรรวมทั้งหมด (เช่น ใช้ loading buffer 2.5 µl + PCR products 10 µl) หยอดลงในหลุมเทียบกับ 100 bp ladder
- 7.4.7 เปิดเครื่อง electrophoresis chamber
- 7.4.8 ปิดเครื่องเมื่อครบเวลา แล้วนำเจลออกไปแช่ในสารละลาย EtBr 15 – 50 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกโดยการแช่ในน้ำ 10 – 30 นาที
- 7.4.9 บันทึกภาพเจลภายใต้แสง UV

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR products ใกล้เคียงกับ positive control คืออยู่ในช่วง 500 - 600 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9
- 8.2 การสรุปผล :
 - 8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ
- 8.3 การรายงาน
 - 8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
ยีนจำเพาะของพืช (chloroplast t-RNA) พบ/ detected
 - 8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
ยีนจำเพาะของพืช (chloroplast t-RNA) ไม่พบ/ not detected



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 9.1 positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 extraction blank control | ต้องให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |



**DMSc F 4005: Qualitative endogenous gene testing: Invertase
(by means of Polymerase Chain Reaction)**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพด (*Zea mays*) ในอาหารที่มีส่วนประกอบหรือมีการปะปนของข้าวโพดและเพื่อทดสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทดสอบที่มีส่วนประกอบหรือมีการปะปนของข้าวโพด โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21571:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อนคือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอน คือ

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ และสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย้อมด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR products ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water ชนิด PCR grade

5.2 PCR buffer (อาจมีหรือไม่มี $MgCl_2$ ผสมอยู่) ความเข้มข้น 10 เท่า

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 5 mM



- 5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M
- 5.5.1 Forward primer: Maize invertase gene (GenBank[®] accession No. U16123)
Primer-1 IVR1-F: 5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'
- 5.5.2 Reverse primer: Maize invertase gene (GenBank[®] accession No. U16123)
Primer-2 IVR1-R: 5'-ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'
- 5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 U/ μ l
- 5.7 Agarose ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดดีเอ็นเอของ PCR products เป้าหมาย
- 5.8 Boric acid (H_3BO_3) สำหรับเตรียม TBE buffer
- 5.9 Bromophenol blue ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) และ/หรือ xylene cyanole FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)
- 5.10 ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล ที่เหมาะสมกับขนาดของ PCR products (เช่น restriction-digested λ -Phage DNA สำหรับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ 100 bp ladder)
- 5.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) สำหรับเตรียม TAE buffer
- 5.12 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2 -EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)
- 5.13 Ethidium bromide (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 0.5 mg/l
- 5.14 Glycerol
- 5.15 Sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$) สำหรับเตรียม TAE buffer เท่านั้น
- 5.16 Hydrochloric acid, (HCl) = 37%
- 5.17 Sodium hydroxide (NaOH)
- 5.18 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$)
- 5.19 TAE buffer solution (1x) (Tris = 0.050 mol/l, Sodium acetate = 20 mmol/l, Na_2 -EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ glacial acetic acid หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 50x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)



- 5.20 Tris/borate (TBE) buffer solution (0.5x) (Tris = 0.055 mol/l, boric acid = 0.055 mol/l, Na_2EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 10x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.21 Sample loading buffer solution (5x) (glycerol = 50 %, bromophenol blue = 2.5 g/l และ /หรือ xylene cyanol = 2.5 g/l) ละลายใน buffer ชนิดเดียวกับที่ต้องการใช้งาน (TAE or TBE)
- 5.22 Ethidium bromide solution (EtBr) = 0.5 mg/l

ข้อแนะนำ:

- 5.22.1 หลีกเลี่ยงการเตรียมโดยการชั่ง EtBr ออกมาใส่ภาชนะอื่นแล้วละลายน้ำแต่ให้เตรียมโดยเทน้ำลงไปในภาชนะบรรจุของ EtBr หรือใช้ EtBr ที่เป็นเม็ดเพื่อละลายน้ำ
- 5.22.2 ควรเตรียมเป็น ethidium bromide solution ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บให้พ้นจากแสงที่ 5°C

6. เครื่องมือและอุปกรณ์(Apparatus)

- 6.1 Thermal cycler
- 6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply โดยทั่วไปใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 5V/cm (ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบขึ้นกับขนาด gel tray)
- 6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.
- 6.4 Recording instrument เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ Invertase_1



ตาราง *Invertase_1*

Reagent	Final Concentration
De-ionized water (μl)	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 25
10 × buffer + 15 mM MgCl ₂	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
5 mM dNTP	0.4 mM
10μM primer-1	0.5 μM
10μM primer-2	0.5 μM
5U/μl DNA taq polymerase	1.0 U
Total (μl)	25
DNA template (μl)	10 –50 ng

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction control

7.2.2 extraction blank control

7.2.3 positive DNA target control เช่น CRM ของ Bt11 maize

7.2.4 negative DNA target control

7.2.5 amplification reagent control

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง *Invertase_2* เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp[®] 2400 หรือ GeneAmp[®] 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้ อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ



ตาราง *Invertase_2*

Step	Time/temp
Activation/ Initial denature	12 min/95°C
Amplification	30 s/95°C
	30 s/64°C
	60 s/72°C
Number of cycles	35
Final extension	10 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR products

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr

7.4.1 ชั่ง agarose ในปริมาณที่เหมาะสม (0.8 – 1.0% ในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ แต่ PCR products ที่มีขนาดเล็กควรใช้ปริมาณ agarose สูงกว่านี้ และอาจสูงได้ถึง 4.0%) ละลายใน buffer (TAE หรือ TBE ตามชนิดที่ใช้ในขณะที่ยกดีเอ็นเอจากกระแสไฟฟ้า)

7.4.2 ละลายใน microwave หรือ water bath เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง

7.4.3 ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 60°C แล้วเทลง gel tray โดยใช้ sample comb ที่เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) เจลที่เตรียมไม่ควรมีความหนาเกิน 1 เซนติเมตร



- 7.4.4 แกะ comb ออกและขยเจลไปวางใน electrophoresis chamber
- 7.4.5 เท buffer (ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเจลและ loading buffer) ลงไปให้ท่วมเหนือเจล 2 มิลลิเมตร
- 7.4.6 ผสม PCR products (5 μ l หรือ 10 μ l) กับ loading buffer ประมาณ 20% ของปริมาตรรวมทั้งหมด (เช่น ใช้ loading buffer 2.5 μ l+ PCR products 10 μ l) หยดลงในหลุมเทียบกับ 100 bp ladder
- 7.4.7 เปิดเครื่อง electrophoresis chamber
- 7.4.8 ปิดเครื่องเมื่อครบเวลา แล้วนำเจลออกไปแช่ในสารละลาย EtBr 15 – 50 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำ 10 – 30 นาที
- 7.4.9 บันทึกภาพเจลภายใต้แสง UV

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR products ใกล้เคียงกับ positive control คืออยู่ในช่วง 226 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9
- 8.2 การสรุปผล:
 - 8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ
- 8.3 การรายงาน
 - 8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
ยีนจำเพาะของข้าวโพด (Invertase) พบ/ detected
 - 8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
ยีนจำเพาะของข้าวโพด (Invertase) ไม่พบ/ not detected



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 9.1 positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 extraction blank control | ต้องให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |



DMSc F 4006: Qualitative endogenous gene testing: *hmgA*
(by means of real-time Polymerase Chain Reaction)

1. ขอบข่าย (Scope)

การทดสอบหาดีเอ็นเอของยีน high mobility group A (*hmgA*) ของข้าวโพด (*Zea mays*) ในอาหารที่มีส่วนประกอบหรือมีการปะปนของข้าวโพดและเพื่อทดสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างทดสอบที่มีส่วนประกอบหรือมีการปะปนของข้าวโพด โดยใช้วิธี Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21570:2005(E): Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วน ผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
- 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
- 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็น เป้าหมาย
- 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การทำปฏิกิริยาของ TaqMan Probe TaqMan probe เป็นการใช้อligonucleotide เส้นเดียว ติดฉลาก Fluorescent dye ซึ่งเป็น reporter dye ที่ตำแหน่งปลาย 5' ขณะที่ปลาย 3' ของ Oligonucleotide ถูกติดฉลากด้วย Fluorescence quencher ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการให้สัญญาณ ของ Fluorescence dye ที่ปลาย 5' เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ถ้า TaqMan probe นั้นมีความจำเพาะ กับดีเอ็นเอเป้าหมายก็จะจับที่ตำแหน่งจำเพาะนั้น เมื่อ Taq polymerase สร้างสายใหม่ของ ดีเอ็นเอจาก primer ในแต่ละรอบของ PCR และสายใหม่ของดีเอ็นเอถูกสร้างเข้ามาถึง ตำแหน่งที่ Taqman Probe จับอยู่ เอนไซม์ Taq polymerase ที่มีคุณสมบัติของส่วน 5' nuclease activity จะย่อยสายของ TaqMan probe ที่จับอยู่ตรงตำแหน่งดังกล่าวออกทำให้ ส่วนของ quencher หลุดออกแยกห่างจาก Fluorescence reporter และเมื่อไม่มี quencher มาดูดกลืนแสงจึงทำให้ Fluorescence ที่ปลาย 5' สามารถส่งสัญญาณออกมาให้เครื่อง สามารถตรวจจับและวัดได้ในสภาพจริง (real-time)
- 4.4 การตรวจสอบและยืนยันผล
- 4.4.1 วิธีทดสอบนี้ใช้ตรวจยืนยัน hmg (high mobility group of protein gene) ซึ่งเป็นยีนจำเพาะ ของข้าวโพด มีขนาด 79 bp โดยใช้ primer และ probe สำหรับ probe ให้ติดฉลากสี ฟลูออเรสเซนต์ คือ FAM และ TAMRA เป็น reporter dye และ Quencher ตามลำดับ



- 4.4.2 วิธีนี้ได้ทำการปรับความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ (Optimized) พร้อมทั้งทดสอบความใช้ได้ในการทำซ้ำและความแม่นยำโดยใช้ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรม Bt176 ชนิด IRMM-411 ที่เป็นวัสดุอ้างอิง (Certified reference material) โดยมีการทดสอบเปรียบเทียบกันในระหว่างห้องปฏิบัติการ 17 แห่ง และใช้เครื่อง real-time PCR ของ ABI 7700 SDS และ ABI 5700 SDS
- 4.4.3 วิธีวิเคราะห์นี้ทดสอบกับดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรม 20 ชนิดและไม่เกิดปฏิกิริยาค้างกับดีเอ็นเอพืชอื่น คือถั่วเหลือง ข้าวไรน์ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มิลเลต เล็นทิล ถั่วขาว ถั่วเขียว มะเขือเทศ มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง เรพซิด ข้าวโอ๊ต spelt แพลกงาน มนุษย์ ปลาแซลมอน วัว ยกเว้น teosinte (*Zea mays*, spp. Mexicana) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับข้าวโพดมาก

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 PCR buffer (ไม่มี $MgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 10 เท่า (10x)
- 5.2 สารละลาย $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 25 mmol/l
- 5.3 สารละลาย dNTP ที่ความเข้มข้นแต่ละ nucleotide เป็น 25 mmol/l
- 5.4 Oligonucleotides เป็น probe และ primer ความเข้มข้นปรับเป็น 10 μM และ 20 μM ตามลำดับดังนี้
- 5.4.1 primer
- ZM1-F 5'-TTg gAC TA_g AAA TCT CgT gCT gA-3'
- ZM1-R 5'-gCT ACA TA_g ggA gCC TTg TCC T-3'
- 5.4.2 Probe
- ZM1-P 5'-FAM—CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-TAMRA-3'



5.5 Thermostable DNA polymerase

AmplTaq Gold® DNA polymerase*

(*เป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ใช้ได้ ซึ่งให้ข้อมูลไว้เพื่อความสะดวกในการใช้งาน
วิธีวิเคราะห์นี้เท่านั้น ผลิตภัณฑ์ของบริษัทอื่นที่ใกล้เคียงกันสามารถใช้ได้และให้ผลเหมือนกัน)

5.6 Uracil N-glycolysate (ในกรณีที่ต้องการใช้)

5.7 Amplification reaction mixture ตามตาราง *hmg_1*

6. เครื่องมือและอุปกรณ์(Apparatus)

6.1 Thermal cycler

การทดสอบเริ่มต้นครั้งแรกด้วยเครื่อง ABI 7700 เครื่อง real-time PCR ของบริษัทอื่น
สามารถใช้ได้โดยต้องปรับสภาวะการทำงานและส่วนผสมของปฏิกิริยาน้ำยา PCR ให้
เหมาะสมกับเครื่องก่อนใช้งาน

6.2 Reaction vials

หลอดที่ใช้กับการทำปฏิกิริยา PCR เลือกให้เหมาะสมกับการใช้งาน เช่น ชนิดหลอด
หรือ plate ที่เหมาะสำหรับแต่ละเครื่อง

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ให้มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร/1 ปฏิกิริยา
เพื่อให้สารต่าง ๆ มีความเข้มข้นสุดท้ายตามตาราง *hmg_1*



ตาราง *hmg_1* แสดงส่วนผสมของสารละลายในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 reaction

สารเคมี	ผลิตภัณฑ์ *	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR reaction buffer	TaqMan buffer A (มีสี ROX ^a)	1 fold
	MgCl ₂	6.5 mol/l
DNA polymerase	AmpliTaq Gold [®]	1.25 U
Decontaminant system (ในกรณีที่ต้องการใช้)	dUTP AmpErase uracil N-glycosylase	400 µmol/l 0.5 U
Primer	ตามข้อ 5.4.1	300 nmol/l
dNTP	dATP, dCTP, dGTP	200µmol/l
Probe	ตามข้อ 5.4.2	160 nmol/l
Template DNA 2.3 ng ถึง 150 ng maize DNA		5 µl
ปริมาตรทั้งหมด		25 µl
* ทดสอบจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมครั้งแรก สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยต้องปรับค่าให้เหมาะสมสำหรับแต่ละผลิตภัณฑ์		
ROX ^a = carboxyl-X-Rhodamine		



7.2 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature- Time Program)

รูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature- Time Program) เป็นการทดสอบเริ่มต้นครั้งแรกด้วยเครื่อง ABI 7700 และ GeneAmp 5700 เวลาที่กระตุ่นการทำงานเริ่มต้นของเอ็นไซม์ DNA polymerase ขึ้นกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้สามารถใช้เครื่อง real-time PCR ของบริษัทอื่นได้โดยไม่ต้องปรับสภาวะการทำงานและส่วนผสมของปฏิกิริยาน้ำยา PCR ให้เหมาะสมกับเครื่องก่อนใช้งานเวลาที่กระตุ่นการทำงานเริ่มต้นของเอ็นไซม์ DNA polymerase ขึ้นกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้

ตาราง *hmg_2* แสดงโปรแกรมที่ใช้

ขั้นตอน	เวลา(วินาที)	อุณหภูมิ (°C)
Pre-PCR: decontamination (ในกรณีที่ต้องการใช้)	120	50
Pre-PCR: activation of DNA polymerase and denaturation of template DNA	600	95
PCR (45 cycles)		
Step1 Denaturation	15	95
Step 2 Annealing elongation	60	60



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ค่า Crossing threshold value (Ct) หรือ Quantification cycle (Cq) เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอที่มี ณ รอบการทำงาน PCR ที่สามารถวัดได้ซึ่งเป็นช่วงที่ตัดกับ threshold base line ที่กำหนดของปฏิกิริยานั้นๆ โดยซอฟต์แวร์ของเครื่องจะทำการคำนวณให้ตามสูตร คือ ปริมาณดีเอ็นเอ (Quantity) = 2^{Ct}

8.2 Limit of detection (LOD)

ผู้พัฒนาวิธีได้กำหนดค่า absolute LOD ของวิธีทดสอบนี้ที่ 5 copies ของชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย

หมายเหตุ ถ้าดีเอ็นเอของข้าวโพดถูกกำจัดออกหรือขั้นตอนในการผลิตอาหารได้ทำลายคุณภาพดีเอ็นเอไปแล้ว (เช่น น้ำมันที่ผ่านกรรมวิธี) หรือมีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบในตัวอย่างอาหารนั้นน้อยมากอาจทำให้ตรวจไม่พบยีนจำเพาะของข้าวโพดจึงไม่สามารถใช้วิธีตรวจวิเคราะห์นี้ได้

8.3 การแปลผล

ผลวิเคราะห์ PCR แปลผลได้ ดังนี้

8.3.1 ตัวอย่างทดสอบให้ผลบวกเมื่อตรวจพบยีนจำเพาะของข้าวโพดที่ตรวจทั้ง 2 sub-sample และชุดควบคุมการทดสอบต้องได้ผลตามกำหนดในข้อ 9

8.3.2 ตัวอย่างทดสอบให้ผลลบเมื่อตรวจไม่พบยีนจำเพาะของข้าวโพดที่ตรวจทั้ง 2 sub-sample และชุดควบคุมการทดสอบต้องได้ผลตามกำหนดในข้อ 9

8.3.3 ถ้าผลวิเคราะห์ 2 sub-sample ต่างกัน ให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.4 รายงานผลการทดสอบ (Test Report)

8.4.1 การรายงานผลกรณีที่ได้ผลบวก

ยีนจำเพาะของข้าวโพด (hmg) พบ/ detected

8.4.2 การรายงานผลกรณีที่ได้ผลลบ

ยีนจำเพาะของข้าวโพด (hmg) ไม่พบ/ not detected



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | | |
|-----|-------------------------------|-----------------|
| 9.1 | positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 | extraction blank control | ต้องให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 | positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 | negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 | amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |

หากผลของชุดควบคุม PCR ไม่เป็นไปตามนี้จะต้องสกัดตัวอย่างซ้ำเพื่อตรวจวิเคราะห์ใหม่หรือกรณีที่สงสัยว่าจะมี inhibitor ให้เพิ่มขั้นตอนการทำ DNA ให้บริสุทธิ์เพื่อยับยั้ง inhibitor ก่อนนำไปทำ PCR ต่อไป



DMSc F 4007: Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: CaMV-35S promoter (by means of Polymerase Chain Reaction)

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของยีนจาก cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter ในอาหาร โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เนื่องจากยีนนี้มีในพืชตัดแปรพันธุกรรมมากมายหลายชนิด วิธีทดสอบนี้จึงใช้ตรวจสอบเบื้องต้นในอาหารว่ามีการปะปนของพืชตัดแปรพันธุกรรม ในอาหาร

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006 (E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21571:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-



4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ และสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย้อมด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR products ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน



- 4.4 ผลวิเคราะห์ที่เป็นผลบวกปลอมอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากชิ้นส่วนที่นำมาเพิ่มจำนวนนี้มาจาก Cauliflower Mosaic Virus ที่พบได้ในพืชตระกูลกะหล่ำที่ติดเชื้และพบในพืชวงศ์ Brassicaceae (Cruciferae) รวมทั้ง Resedaceae และ Solanaceae ดังนั้นถ้าตรวจพบผลบวกจากพืชดังกล่าว จะต้องระมัดระวัง ผลบวกของการตรวจอาจแสดงว่ามีชิ้นส่วนของพืชตัดแปรพันธุกรรม แต่ไม่สามารถแปลผลหรือใช้เป็นข้อพิสูจน์ว่ามีพืชตัดแปรพันธุกรรม จนกว่าจะมีการตรวจสอบยืนยันเพิ่มเติม และเพื่อที่จะแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสกับพืชตัดแปรพันธุกรรม อาจต้องใช้วิธีการตรวจไวรัส Cauliflower mosaic virus ด้วย

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Water ชนิด PCR grade
- 5.2 PCR buffer (อาจมีหรือไม่มี $MgCl_2$ ผสมอยู่) ความเข้มข้น 10 เท่า
- 5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l
- 5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 5 mM
- 5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μM
- 5.5.1 Forward primer: CaMV 35S promoter, Designed to amplify the CaMV 35S promoter, e.g. accession No. V00141
Primer-1 35s-cf3: 5'- CCA CgT CTT CAA AgC AAg Tgg-3'
- 5.5.2 Reverse primer: CaMV 35S promoter, Designed to amplify the CaMV 35S promoter, e.g. accession No. V00141
Primer-2 35s-cr4: 5'-TCC TCT CCA AAT gAA ATg AAC TTC C-3'
- 5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 U/ μl
- 5.7 Agarose ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดดีเอ็นเอของ PCR products เป้าหมาย
- 5.8 Boric acid (H_3BO_3) สำหรับเตรียม TBE buffer
- 5.9 Bromophenol blue ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) และ/หรือ xylene cyanole FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)
- 5.10 ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมกับขนาดของ PCR products (เช่น restriction-digested λ -phage DNA สำหรับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ 100 bp ladder)



- 5.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) สำหรับเตรียม TAE buffer
- 5.12 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$)
- 5.13 Ethidium bromide (EtBr) ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) = 0.5 mg/l
- 5.14 Glycerol
- 5.15 Sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) สำหรับเตรียม TAE buffer เท่านั้น
- 5.16 Hydrochloric acid, (HCl) = 37%
- 5.17 Sodium hydroxide (NaOH)
- 5.18 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
- 5.19 TAE buffer solution (1x) (Tris = 0.050 mol/l, Sodium acetate = 20 mmol/l, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ glacial acetic acid หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 50x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.20 Tris/borate (TBE) buffer solution (0.5x) (Tris = 0.055 mol/l, boric acid = 0.055 mol/l, Na_2EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 10x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.21 Sample loading buffer solution (5x) (glycerol = 50 %, bromophenol blue = 2.5 g/l และ /หรือ xylene cyanol = 2.5 g/l) ละลายใน buffer ชนิดเดียวกับที่ต้องการใช้งาน (TAE or TBE)
- 5.22 Ethidium bromide solution (EtBr) = 0.5 mg/l

ข้อแนะนำ :

- 5.22.1 หลีกเลี่ยงการเตรียมโดยการชั่ง EtBr ออกมาใส่ภาชนะอื่นแล้วละลายน้ำแต่ให้เตรียมโดยเทน้ำลงไปในภาชนะบรรจุของ EtBr หรือใช้ EtBr ที่เป็นเม็ดเพื่อละลายน้ำ
- 5.22.2 ควรเตรียมเป็น ethidium bromide solution ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บให้พ้นจากแสง ที่ 5°C



6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Thermal cycler
- 6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply โดยทั่วไปใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 5V/cm (ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบขึ้นกับขนาด gel tray)
- 6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.
- 6.4 Recording instrument เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ CaMV-35S_1

ตาราง CaMV-35S_1

Reagent	Final Concentration
De-ionized water (μl)	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 25
10x buffer + 15 mM MgCl ₂	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
5 mM dNTP	0.64 mM
10 μM primer-1	0.6 μM
10 μM primer-2	0.6 μM
5U/μl DNA taq polymerase	0.8 U
Total (μl)	25
DNA template (μl)	10 –50 ng



7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction control

7.2.2 extraction blank control

7.2.3 positive DNA target control เช่น 0.1% ถั่วเหลือง GTS 40-3-2

7.2.4 negative DNA target control

7.2.5 amplification reagent control

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง CaMV-35S₂ เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง CaMV-35S₂

Step	Time/temp
Activation/ Initial denature	10 min/ 95°C
Amplification	25 s/95°C
	30 s/62°C
	45 s/72°C
Number of cycles	50
Final extension	7 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR products

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr

7.4.1 ชั่ง agarose ในปริมาณที่เหมาะสม (0.8 – 1.0% ในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ แต่ PCR products ที่มีขนาดเล็กไม่ควรใช้ปริมาณ agarose สูงกว่านี้ และอาจสูง



ได้ถึง 4.0%) ละลายใน buffer (TAE หรือ TBE ตามชนิดที่ใช้ในขณะที่แยกดีเอ็นเอ จากกระแสไฟฟ้า)

- 7.4.2 ละลายใน microwave หรือ water bath เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง
- 7.4.3 ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิตกลงประมาณ 60°C แล้วเทลง gel tray โดยใช้ sample comb ที่เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) เจลที่เตรียมไม่ควรมีความหนาเกิน 1 เซนติเมตร
- 7.4.4 แกะ comb ออกและขยเจลไปวางใน electrophoresis chamber
- 7.4.5 เท buffer (ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเจลและ loading buffer) ลงไปให้ท่วมเหนือเจล 2 มิลลิเมตร
- 7.4.6 ผสม PCR products (5 μ l หรือ 10 μ l) กับ loading buffer ประมาณ 20% ของปริมาตร รวมทั้งหมด (เช่น ใช้ loading buffer 2.5 μ l + PCR products 10 μ l) หยดลงในหลุมเทียบกับ 100 bp ladder
- 7.4.7 เปิดเครื่อง electrophoresis chamber
- 7.4.8 ปิดเครื่องเมื่อครบเวลา แล้วนำเจลออกไปแช่ในสารละลาย EtBr 15 – 50 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำ 10 – 30 นาที
- 7.4.9 บันทึกภาพเจลภายใต้แสง UV

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ตัวอย่างทดสอบหลอดจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR products เท่ากับ positive control คือเท่ากับ 123 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9
- 8.2 การสรุปผล :
 - 8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ



8.3 การรายงาน

8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

CaMV-35S promoter พบ/detected

8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

CaMV-35S promoter ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | |
|-----------------------------------|--------------|
| 9.1 positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 extraction blank control ต้อง | ให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |



DMSc F 4008: Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: NOS-terminator (by means of Polymerase Chain Reaction)

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของยีนจาก *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase (NOS) terminator ในอาหารโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เนื่องจากยีนนี้มีในพืชดัดแปรพันธุกรรมมากมายหลายชนิด วิธีทดสอบนี้จึงใช้เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นการปะปนของพืชดัดแปรพันธุกรรมในอาหาร

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21571:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือ ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
- 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
- 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
- 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล
- สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ และสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR products ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน
- 4.4 ผลบวกปลอมอาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนนี้มาจาก Agrobacterium ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดิน ผลบวกอาจแสดงว่ามีพืชตัดแปรพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรวจสอบ แต่ไม่สามารถใช้เป็นข้อพิสูจน์ว่ามีพืชตัดแปรพันธุกรรม จนกว่าจะมีการตรวจสอบยืนยันผลเพิ่มเติม จะต้องมีความระมัดระวังเพราะมีโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อ Agrobacterium หรือแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียง



5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Water ชนิด PCR grade
- 5.2 PCR buffer (อาจมีหรือไม่มี $MgCl_2$ ผสมอยู่) ความเข้มข้น 10 เท่า
- 5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l
- 5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 5 mM
- 5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μM
 - 5.5.1 Forward primer: *Agrobacterium tumefaciens* NOS-terminator, designed to amplify a sequence described in accession No. V0087
Primer-1 HA-nos118f: 5'- gCA TgA CqT TAT TTA TgA gAT ggg-3'
 - 5.5.2 Reverse primer: *Agrobacterium tumefaciens* NOS-terminator, designed to amplify a sequence described in accession No. V0087
Primer-2 HA-nos118r: 5'- gAC ACC gCg CgC gAT AAT TTA TCC-3'
- 5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5U/ μl
- 5.7 Agarose ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดดีเอ็นเอของ PCR products เป้าหมาย
- 5.8 Boric acid (H_3BO_3) สำหรับเตรียม TBE buffer
- 5.9 Bromophenol blue ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) และ/หรือ xylene cyanole FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)
- 5.10 ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมกับขนาดของ PCR products (เช่น restriction-digested λ -Phage DNA สำหรับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ 100 bp ladder)
- 5.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) สำหรับเตรียม TAE buffer
- 5.12 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2 -EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)
- 5.13 Ethidium bromide (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 0.5 mg/l
- 5.14 Glycerol
- 5.15 Sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$) สำหรับเตรียม TAE buffer เท่านั้น
- 5.16 Hydrochloric acid (HCl) = 37 %
- 5.17 Sodium hydroxide (NaOH)



- 5.18 Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$)
- 5.19 TAE buffer solution (1x) (Tris = 0.050 mol/l, Sodium acetate = 20 mmol/l, Na_2 -EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ glacial acetic acid หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 50x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.20 Tris/borate (TBE) buffer solution (0.5x) (Tris = 0.055 mol/l, boric acid = 0.055 mol/l, Na_2 EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 10x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.21 Sample loading buffer solution (5x) (glycerol = 50%, bromophenol blue = 2.5 g/l และ/หรือ xylene cyanol = 2.5 g/l) ละลายใน buffer ชนิดเดียวกับที่ต้องการใช้งาน (TAE or TBE)
- 5.22 Ethidium bromide solution (EtBr) = 0.5 mg/l

ข้อแนะนำ :

- 5.22.1 หลีกเลี่ยงการเตรียมโดยการชั่ง EtBr ออกมาใส่ภาชนะอื่นแล้วละลายน้ำแต่ให้เตรียมโดยเทน้ำลงไปในภาชนะบรรจุของ EtBr หรือใช้ EtBr ที่เป็นเม็ดเพื่อละลายน้ำ
- 5.22.2 ควรเตรียมเป็น ethidium bromide solution ที่ความเข้มข้น 10mg/ml เก็บให้พ้นจากแสงที่ 5°C

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Thermal cycler
- 6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply โดยทั่วไปใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 5V/cm (ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบขึ้นกับขนาด gel tray)
- 6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.
- 6.4 Recording instrument เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ NOS_1

ตาราง NOS_1

Reagent	Final Concentration
De-ionized water (μl)	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 25
10x buffer + 15 mM MgCl ₂	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
5 mM dNTP	0.64 mM
10 μM primer-1	0.6 μM
10 μM primer-2	0.6 μM
5U/μl DNA taq polymerase	0.8 U
Total (μl)	25
DNA template (μl)	10 –50 ng

7.2 สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction control

7.2.2 extraction blank control

7.2.3 positive DNA target control เช่น 0.1% ถั่วเหลือง GTS 40-3-2

7.2.4 negative DNA target control

7.2.5 amplification reagent control



7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง NOS_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง NOS_2

Step	Time/temp
Activation/ Initial denature	10 min/95°C
Amplification	25 s/95°C
	30 s/62°C
	45 s/72°C
Number of cycles	50
Final extension	7 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR products

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr

7.4.1 ชั่ง agarose ในปริมาณที่เหมาะสม (0.8 – 1.0% ในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ แต่ PCR products ที่มีขนาดเล็กควมควรใช้ปริมาณ agarose สูงกว่านี้ และอาจสูงได้ถึง 4.0%) ละลายใน buffer (TAE หรือ TBE ตามชนิดที่ใช้ในขณะแยกดีเอ็นเอจากกระแสไฟฟ้า)

7.4.2 ละลายใน microwave หรือ water bath เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง



- 7.4.3 ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิตกลงประมาณ 60°C แล้วเทลง gel tray โดยใช้ sample comb ที่เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) เจลที่เตรียมไม่ควรมีความหนาเกิน 1 เซนติเมตร
- 7.4.4 แกะ comb ออกและยกเจลไปวางใน electrophoresis chamber
- 7.4.5 เท buffer (ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเจลและ loading buffer) ลงไปให้ท่วมเหนือเจล 2 มิลลิเมตร
- 7.4.6 ผสม PCR products (5 μl หรือ 10 μl) กับ loading buffer ประมาณ 20% ของปริมาตร รวมทั้งหมด (เช่น ใช้ loading buffer 2.5 μl + PCR products 10 μl) หยอดลงในหลุม เทียบกับ 100 bp ladder
- 7.4.7 เปิดเครื่อง electrophoresis chamber
- 7.4.8 ปิดเครื่องเมื่อครบเวลา แล้วนำเจลออกไปแช่ในสารละลาย EtBr 15 – 50 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำ 10 – 30 นาที
- 7.4.9 บันทึกภาพเจลภายใต้แสง UV

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ตัวอย่างทดสอบหลอดจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR products เท่ากับ positive control คือเท่ากับ 118 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9
- 8.2 การสรุปผล :
 - 8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ
- 8.3 การรายงาน
 - 8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
NOS-terminator พบ/detected
 - 8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
NOS-terminator ไม่พบ/not detected



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่
ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 9.1 positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 extraction blank control | ต้องให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |



DMSc F 4009: Screening method for the detection of genetically modified plant DNA : *nptII* (by means of Polymerase Chain Reaction)

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของยีน neomycin phosphotransferase (*npt II*) ที่มาจาก *E. coli* K12 ซึ่งสอดแทรกอยู่ในชุดของยีนพืชตัดแปรพันธุกรรมบางชนิด วิธีทดสอบยีน *npt II* โดยใช้ Polymerase Chain Reaction (PCR) นี้สามารถใช้ตรวจสอบเบื้องต้นว่ามีการปะปนของพืชตัดแปรพันธุกรรมในอาหาร

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 ISO 21571:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอ และสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR products ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water ชนิด PCR grade

5.2 PCR buffer (อาจมีหรือไม่มี $MgCl_2$ ผสมอยู่) ความเข้มข้น 10 เท่า

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 5 mM



- 5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M
 - 5.5.1 Forward primer: *nptII* gene (GenBank[®] accession No. AF269238)
Primer-1 APH2 short: 5'-CTC ACC TTg CTC CTg CCg AgA-3'
 - 5.5.2 Reverse primer:
Primer-2 APH2 reverse: 5'-CgC CTT gAg CCT ggC gAA CAg -3'
- 5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 U/ μ l
- 5.7 Agarose ที่เหมาะสมสำหรับการแยกขนาดดีเอ็นเอของ PCR products เป้าหมาย
- 5.8 Boric acid (H_3BO_3) สำหรับเตรียม TBE buffer
- 5.9 Bromophenol blue ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) และ/หรือ xylene cyanole FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$)
- 5.10 ดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมกับขนาดของ PCR products (เช่น restriction-digested λ -Phage DNA สำหรับ DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือ 100 bp ladder)
- 5.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) สำหรับเตรียม TAE buffer
- 5.12 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2 -EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$)
- 5.13 Ethidium bromide (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 0.5 mg/l
- 5.14 Glycerol
- 5.15 Sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$) สำหรับเตรียม TAE buffer เท่านั้น
- 5.16 Hydrochloric acid (HCl) = 37 %
- 5.17 Sodium hydroxide (NaOH)
- 5.18 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$)
- 5.19 TAE buffer solution (1x) (Tris = 0.050 mol/l, Sodium acetate = 20 mmol/l, Na_2 -EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ glacial acetic acid หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 50x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)



- 5.20 Tris/borate (TBE) buffer solution (0.5x) (Tris = 0.055 mol/l, boric acid = 0.055 mol/l, Na_2EDTA = 0.001 mol/l) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl หรือ NaOH (ควรเตรียมเป็น 10x แล้วเจือจางเป็น 1x ก่อนใช้งานโดยใช้น้ำ mono-distilled หรือ deionised water ที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนใช้)
- 5.21 Sample loading buffer solution (5x) (glycerol = 50 %, bromophenol blue = 2.5 g/l และ/หรือ xylene cyanol = 2.5 g/l) ละลายใน buffer ชนิดเดียวกับที่ต้องการใช้งาน (TAE or TBE)
- 5.22 Ethidium bromide solution (EtBr) = 0.5 mg/l

ข้อแนะนำ :

- 5.22.1 หลีกเลี่ยงการเตรียมโดยการชั่ง EtBr ออกมาใส่ภาชนะอื่นแล้วละลายน้ำ แต่ให้เตรียมโดยเทน้ำลงไปในภาชนะบรรจุของ EtBr หรือใช้ EtBr ที่เป็นเม็ดเพื่อละลายน้ำ
- 5.22.2 ควรเตรียมเป็น ethidium bromide solution ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บให้พ้นจากแสงที่ 5°C

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Thermal cycler
- 6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply โดยทั่วไปใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 5V/cm (ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบขึ้นกับขนาด gel tray)
- 6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.
- 6.4 Recording instrument เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ npt II_1



ตาราง *npt 11_1*

Reagent	Final Concentration
De-ionized water (μl)	ปรับให้ได้ปริมาตรรวม 25
10 × buffer + 15 mM MgCl ₂	1x
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
5 mM dNTP	0.2 mM
10 μM primer-1	0.4 μM
10 μM primer-2	0.4 μM
5U/μl DNA taq polymerase	2 U
Total (μl)	25
DNA template (μl)	10 –50ng

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction control

7.2.2 extraction blank control

7.2.3 positive DNA target control (สามารถใช้ MON863 maize)

7.2.4 negative DNA target control

7.2.5 amplification reagent control

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง *npt 11_2* เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ



ตาราง npt ll_2

Step	Time/temp
Activation/ Initial denature	10 min/ 95°C
Amplification	25 s/ 95°C
	30 s/ 62°C
	45 s/ 72°C
Number of cycles	35
Final extension	7 min/ 72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR products

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr

7.4.1 ชั่ง agarose ในปริมาณที่เหมาะสม (0.8 – 1.0% ในดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ แต่ PCR products ที่มีขนาดเล็กไม่ควรใช้ปริมาณ agarose สูงกว่านี้ และอาจสูงได้ถึง 4.0%) ละลายใน buffer (TAE หรือ TBE ตามชนิดที่ใช้ในขณะที่แยกดีเอ็นเอจากกระแสไฟฟ้า)

7.4.2 ละลายใน microwave หรือ water bath เขย่าให้เข้ากันโดยไม่ให้เกิดฟอง

7.4.3 ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 60°C แล้วเทลง gel tray โดยใช้ sample comb ที่เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) เจลที่เตรียมไม่ควรมีความหนาเกิน 1 เซนติเมตร

7.4.4 แกะ comb ออกและยกเจลไปวางใน electrophoresis chamber



- 7.4.5 เท buffer (ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเจลและ loading buffer) ลงไปให้ท่วมเหนือเจล 2 มิลลิเมตร
- 7.4.6 ผสม PCR products (5 μ l หรือ 10 μ l) กับ loading buffer ประมาณ 20% ของปริมาตรรวมทั้งหมด (เช่น ใช้ loading buffer 2.5 μ l+ PCR products 10 μ l) หยอดลงในหลุมเทียบกับ 100 bp ladder
- 7.4.7 เปิดเครื่อง electrophoresis chamber
- 7.4.8 ปิดเครื่องเมื่อครบเวลา แล้วนำเจลออกไปแช่ในสารละลาย EtBr 15 – 50 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำ 10 – 30 นาที
- 7.4.9 บันทึกภาพเจลภายใต้แสง UV

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ตัวอย่างทดสอบหลอดจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR products เท่ากับ positive control คือ เท่ากับ 215 bp (เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Rsa* I ตัดชิ้นส่วน PCR products จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 122 และ 93 bp) และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9
- 8.2 การสรุปผล :
 - 8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ
- 8.3 การรายงาน
 - 8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

$$npt II \quad \text{พบ/detected}$$
 - 8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

$$npt II \quad \text{ไม่พบ/not detected}$$



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้สารควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- | | | |
|-----|-------------------------------|-----------------|
| 9.1 | positive extraction control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.2 | extraction blank control | ต้องให้ผลเป็นลบ |
| 9.3 | positive DNA target control | ต้องให้ผลบวก |
| 9.4 | negative DNA target control | ต้องให้ผลลบ |
| 9.5 | amplification reagent control | ต้องให้ผลลบ |



ภาคผนวก

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1001	การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดย Kjeldahl method
2	DMSc F 1002	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนม
3	DMSc F 1003	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมผงและผลิตภัณฑ์นมชนิดผง
4	DMSc F 1004	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมข้นจืดและนมข้นหวาน
5	DMSc F 1005	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนยแข็ง
6	DMSc F 1006	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนมและผลิตภัณฑ์นม
7	DMSc F 1007	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในนมข้นหวาน
8	DMSc F 1008	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในเนยแข็ง
9	DMSc F 1009	การวิเคราะห์เนื้อมันรวมไขมันในนมพร้อมดื่มแลนมแปลงไขมัน
10	DMSc F 1010	การวิเคราะห์เนื้อมันรวมไขมันในนมข้นไม่หวานและนมข้นแปลงไขมันไม่หวาน
11	DMSc F 1011	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชา
12	DMSc F 1012	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในกาแฟ
13	DMSc F 1013	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในโกโก้ผง
14	DMSc F 1014	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาสมุนไพร
15	DMSc F 1015	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในชา
16	DMSc F 1016	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในกาแฟ
17	DMSc F 1017	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา
18	DMSc F 1018	การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักผลไม้
19	DMSc F 1019	การวิเคราะห์ปริมาณอะซีซัลเฟม-เค, แอสพาเทม และซัคคาริน ในอาหาร
20	DMSc F 1020	การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมซัยคลาเมตในอาหาร
21	DMSc F 1021	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วแคดเมียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี ในอาหาร
22	DMSc F 1022	การวิเคราะห์ปริมาณดินบุกในอาหารกระป๋อง
23	DMSc F 1023	การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง
24	DMSc F 1024	การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง



วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2001	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2002	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium perfringens</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2003	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2004	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร
5	DMSc F 2005	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในน้ำและน้ำแข็ง
6	DMSc F 2006	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
7	DMSc F 2007	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
8	DMSc F 2008	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter sakazakii</i> ในนมและผลิตภัณฑ์นม



รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1025	การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำ
2	DMSc F 1026	การวิเคราะห์ปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำ
3	DMSc F 1027	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม
4	DMSc F 1028	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในไอศกรีมโดย Kjeldahl method
5	DMSc F 1029	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม
6	DMSc F 1030	การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกในเครื่องดื่ม
7	DMSc F 1031	การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ และไนเตรต ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์
8	DMSc F 1032	การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหยอาหารจำลอง
9	DMSc F 1033	การวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล เอ (Bisphenol A; 2, 2-bis (4-hydroxy phenyl propane) ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
10	DMSc F 1034	การวิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'-Dichlorodiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
11	DMSc F 1035	การวิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
12	DMSc F 1036	การวิเคราะห์ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
13	DMSc F 1037	การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสีที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
14	DMSc F 1038	การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากห้วนมยาง
15	DMSc F 1039	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในห้วนมยางสังเคราะห์
16	DMSc F 1040	การวิเคราะห์ปริมาณ 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber
17	DMSc F 1041	การวิเคราะห์ปริมาณ 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) และ 2, 2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethyl ethyl)-4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber



วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2009	วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหาร โดยวิธี pour plate และ spread plate
2	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2012	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร โดยวิธี MPN
5	DMSc F 2013	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร โดยวิธี pour plate
6	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 3001	การวิเคราะห์น้ำหนักสุทธิและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง
2	DMSc F 3002	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง