

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 2

Standard Methods for Food Analysis

Volume II

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2

Standard Methods for Food Analysis Volume II



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
www.dmsc.moph.go.th



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐาน
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร
เล่มที่ 2

Standard Methods
for Food Analysis

Volume II



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2

Standard Methods for Food Analysis, Volume II

กันยายน 2557 จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN 978-616-11-2236-2

สงวนลิขสิทธิ์

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี

โทรศัพท์/โทรสาร 0-2951-1021

<http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/index.htm>

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ

314-316 ถนนบำรุงเมือง ป้อมปราบฯ กรุงเทพมหานคร 10100

โทร. 0 2223 3351, 0 2223 5548

คำปรารภ

การคุ้มครองสุขภาพของผู้บริโภคให้ได้รับอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีความปลอดภัย จากสารเคมีอันตราย และเชื้อโรคต่างๆ เป็นภารกิจหนึ่งของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ มีบทบาทในการวิเคราะห์ วิจัย พัฒนาศักยภาพความรู้ในเรื่องดังกล่าวมาเป็นระยะเวลายาวนาน ได้นำระบบมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 มาใช้ในการดำเนินการทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้การตรวจ วิเคราะห์มีคุณภาพมาตรฐานเป็นที่ยอมรับทั้งภายในประเทศและนานาชาติ ได้มอบหมายให้สำนักคุณภาพ และความปลอดภัยอาหาร ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับประเทศ รวบรวมวิธีวิเคราะห์ให้เป็นมาตรฐาน ไว้ใช้ โดยมีการกำหนดหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกวิธีอย่างเป็นระบบ ซึ่งได้รวบรวมและจัดพิมพ์ เผยแพร่ ไปแล้ว 1 เล่มนั้น มีหน่วยงานทั้งภาครัฐ ภาคเอกชน ให้ความสนใจ นำไปใช้และอ้างอิง เพื่อประโยชน์ ทั้งด้านการศึกษา งานวิจัย การพัฒนาห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำผลวิเคราะห์ไปใช้ในการวางแผนงาน ด้านการคุ้มครองผู้บริโภค รวมทั้งการดำเนินการด้านกฎหมายของหน่วยงานต่างๆ เช่น สำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและสำนักงานตำรวจแห่งชาติ เป็นต้น

ในการนี้ เพื่อการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ได้จัดทำวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2 มีการเพิ่มเติมทั้งด้านเคมี จุลชีววิทยา กายภาพ รวมทั้งวัสดุสัมผัสอาหาร วิธีวิเคราะห์เหล่านี้ได้ ผ่านการคัดเลือกตามหลักเกณฑ์แล้วทั้งสิ้น จึงหวังว่าจะเป็นประโยชน์ต่องานวิเคราะห์อาหาร สามารถ พัฒนาระบบประกันคุณภาพ ให้มีคุณภาพมาตรฐานไปในทิศทางเดียวกัน เพื่อประโยชน์ในการแก้ไขปัญหา สาธารณสุขของประเทศที่จะสามารถสร้างเสริมสุขภาพที่ดีแก่ประชาชนต่อไป



(นายแพทย์อภิชัย มงคล)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

26 สิงหาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	9
นิยามและคำย่อ	11
รหัสวิธี	13
DMSc F 1025: การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำ	15
DMSc F 1026: การหาปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำ	19
DMSc F 1027: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม	25
DMSc F 1028: การวิเคราะห์ไนโตรเจนในไอศกรีม โดย Kjeldahl method	29
DMSc F 1029: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม	37
DMSc F 1030: การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกในเครื่องดื่ม	39
DMSc F 1031: การวิเคราะห์ปริมาณ ไนไตรต์ และไนเตรด ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	43
DMSc F 1032: การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจาก การระเหยอาหารจำลอง	47
DMSc F 1033: การวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล เอ (Bisphenol A; 2,2-bis (4- hydroxyphenyl) propane) ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง	55
DMSc F 1034: การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง	65
DMSc F 1035: การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'- Dihydroxydiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง	73
DMSc F 1036: การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง	81
DMSc F 1037: การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสีที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง	87

	หน้า
DMSc F 1038: การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากหัวนมยาง	91
DMSc F 1039: การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในหัวนมยางสังเคราะห์	103
DMSc F 1040: การวิเคราะห์ปริมาณ 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber	105
DMSc F 1041: การวิเคราะห์ปริมาณ 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) และ 2,2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber	111
วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	117
นัยามและคำย่อ	119
รหัสวิธี	119
DMSc F 2009: วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหาร โดยวิธี pour plate และ spread plate	121
DMSc F 2010: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร	131
DMSc F 2011: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร	147
DMSc F 2012: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหารโดยวิธี MPN	163
DMSc F 2013: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารโดยวิธี pour plate	179

	หน้า
DMSc F 2014: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี pour plate และ spread plate	187
วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	199
รหัสวิธี	201
DMSc F 3001: การวิเคราะห์น้ำหนักสุกสุติและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง	203
DMScF 3002: การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง	205

วิธีมาตรฐาน
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร
เล่มที่ 2

Standard Methods
for Food Analysis

Volume II



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2

Standard Methods for Food Analysis, Volume II

กันยายน 2557 จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN 978-616-11-2236-2

สงวนลิขสิทธิ์

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี

โทรศัพท์/โทรสาร 0-2951-1021

<http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/index.htm>

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ

314-316 ถนนบำรุงเมือง ป้อมปราบฯ กรุงเทพมหานคร 10100

โทร. 0 2223 3351, 0 2223 5548

คำปรารภ

การคุ้มครองสุขภาพของผู้บริโภคให้ได้รับอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีความปลอดภัย จากสารเคมีอันตราย และเชื้อโรคต่างๆ เป็นภารกิจหนึ่งของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ มีบทบาทในการวิเคราะห์ วิจัย พัฒนานองค์ความรู้ในเรื่องดังกล่าวมาเป็นระยะเวลายาวนาน ได้นำระบบมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 มาใช้ในการดำเนินการทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้การตรวจ วิเคราะห์มีคุณภาพมาตรฐานเป็นที่ยอมรับทั้งภายในประเทศและนานาชาติ ได้มอบหมายให้สำนักคุณภาพ และความปลอดภัยอาหาร ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับประเทศ รวบรวมวิธีวิเคราะห์ให้เป็นมาตรฐาน ไว้ใช้ โดยมีการกำหนดหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกวิธีอย่างเป็นระบบ ซึ่งได้รวบรวมและจัดพิมพ์ เผยแพร่ ไปแล้ว 1 เล่มนั้น มีหน่วยงานทั้งภาครัฐ ภาคเอกชน ให้ความสนใจ นำไปใช้และอ้างอิง เพื่อประโยชน์ ทั้งด้านการศึกษา งานวิจัย การพัฒนาห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำผลวิเคราะห์ไปใช้ในการวางแผนงาน ด้านการคุ้มครองผู้บริโภค รวมทั้งการดำเนินการด้านกฎหมายของหน่วยงานต่างๆ เช่น สำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและสำนักงานตำรวจแห่งชาติ เป็นต้น

ในการนี้ เพื่อการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ได้จัดทำวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2 มีการเพิ่มเติมทั้งด้านเคมี จุลชีววิทยา กายภาพ รวมทั้งวัสดุสัมผัสอาหาร วิธีวิเคราะห์เหล่านี้ได้ ผ่านการคัดเลือกตามหลักเกณฑ์แล้วทั้งสิ้น จึงหวังว่าจะเป็นประโยชน์ต่องานวิเคราะห์อาหาร สามารถ พัฒนาระบบประกันคุณภาพ ให้มีคุณภาพมาตรฐานไปในทิศทางเดียวกัน เพื่อประโยชน์ในการแก้ไขปัญหา สาธารณสุขของประเทศที่จะสามารถสร้างเสริมสุขภาพที่ดีแก่ประชาชนต่อไป



(นายแพทย์อภิชัย มงคล)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

26 สิงหาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	9
นิยามและคำย่อ	11
รหัสวิธี	13
DMSc F 1025: การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำ	15
DMSc F 1026: การหาปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำ	19
DMSc F 1027: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม	25
DMSc F 1028: การวิเคราะห์ไนโตรเจนในไอศกรีม โดย Kjeldahl method	29
DMSc F 1029: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม	37
DMSc F 1030: การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกในเครื่องดื่ม	39
DMSc F 1031: การวิเคราะห์ปริมาณ ไนไตรต์ และไนเตรด ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	43
DMSc F 1032: การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจาก การระเหยอาหารจำลอง	47
DMSc F 1033: การวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล เอ (Bisphenol A; 2,2-bis (4- hydroxyphenyl) propane) ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง	55
DMSc F 1034: การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง	65
DMSc F 1035: การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'- Dihydroxydiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง	73
DMSc F 1036: การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง	81
DMSc F 1037: การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสีที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง	87

	หน้า
DMSc F 1038: การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากหัวนมยาง	91
DMSc F 1039: การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในหัวนมยางสังเคราะห์	103
DMSc F 1040: การวิเคราะห์ปริมาณ 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber	105
DMSc F 1041: การวิเคราะห์ปริมาณ 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) และ 2,2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber	111
วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	117
นัยามและคำย่อ	119
รหัสวิธี	119
DMSc F 2009: วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหาร โดยวิธี pour plate และ spread plate	121
DMSc F 2010: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร	131
DMSc F 2011: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร	147
DMSc F 2012: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหารโดยวิธี MPN	163
DMSc F 2013: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารโดยวิธี pour plate	179

	หน้า
DMSc F 2014: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี pour plate และ spread plate	187
วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	199
รหัสวิธี	201
DMSc F 3001: การวิเคราะห์น้ำหนักสุกสุติและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง	203
DMScF 3002: การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง	205

วิธีมาตรฐานทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. นางกนกพร อธิสุข | ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหาร
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) |
| 2. นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย | ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) |
| 3. นางนิภาภรณ์ ลักษณะสมยา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางสาวสุวรรณี วีระภาพธรรมกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางอุมา บริบูรณ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 6. นางกัญญา พุกสุ่น | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |



นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

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

5. คำย่อที่ใช้ และคำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
A	Ampere
AAS	Atomic absorption spectrometer
Ac	acetyl, CH ₃ CO-
cm	Centimeter
diam.	diameter
dm ²	Square decimeter
FAAS	Flame atomic absorption spectrophotometer
FLD	Fluorescence detector
g	gram
<i>g</i>	gravity in centrifuging
GC	Gas Chromatograph
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer
HPLC	High performance liquid chromatograph
hr	hour
id	inner diameter or dimension
in	Inch(es) (2.54 cm)
kg	Kilogram(s)
L	Liter(s)



Abbreviation	Word/คำเต็ม
LC	Liquid Chromatograph
lb	Pound(s) (453.6 g)
M	Molar
Me	Methyl, CH ₃ -
MeOH	Methanol, CH ₃ OH
m	Meter(s), milli-as prefix
mΩ	Megaohm
mg	Milligram(s)
min	Minutes
ml	Milliliter(s)
mm	Millimeter(s)
MS	Mass spectrometer
MW	molecular weight
N	Normal
ng	Nanogram (10 ⁻⁹ g)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
-OAc	acetate
-OCN	cyanate
od	outer diameter or dimension
ppm	Parts per million (10 ⁻⁶)
ppb	Parts per billion (10 ⁻⁹)
sec	second
SPE	Solid phase extraction
UV	Ultraviolet
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
wt	Weight
μ	Micro-as prefix
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 F 1025	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่างๆ ยกเว้น น้ำเสีย	สารทั้งหมด (total solids)	I	15
DMSc F 1026	น้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากแหล่งต่างๆ ยกเว้น น้ำเสีย	ความกระด้างทั้งหมด (total hardness)	I	19
DMSc F 1027	ไอศกรีม	ไขมัน (fat)	I	25
DMSc F 1028	ไอศกรีม	ไนโตรเจน (nitrogen)	I	29
DMSc F 1029	ไอศกรีม	ของแข็งทั้งหมด (total solids)	I	37
DMSc F 1030	เครื่องดื่ม	กรดซิตริก (citric acid)	I	39
DMSc F 1031	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	ไนไตรต์ และไนเตรด (nitrite and nitrate)	I	43
DMSc F 1032	ขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ทำด้วยพลาสติกใช้เพื่อการบริโภคของทารก และเด็กเล็ก	สารตกค้างที่เหลือจากการระเหย (residues left after evaporation)	I	47
DMSc F 1033	ขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ	บิสฟีนอล เอ (Bisphenol A)	I	55
DMSc F 1034	ขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ทำด้วยพลาสติกชนิด Polyethersulfone (PES) และ Polyarylsulfone (PASf)	4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone	I	65
DMSc F 1035	ขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ทำด้วยพลาสติกชนิด Polyethersulfone (PES)	4,4'- Dihydroxydiphenyl sulfone	I	73
DMSc F 1036	ผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ และยางสังเคราะห์	ฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde)	I	81



รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1037	ผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ และยางสังเคราะห์	สังกะสี (Zinc)	I	87
DMSc F 1038	หัตถ์ยางประเภทใช้กับขดนมและใช้ตุ๋นเล่นทั้งยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์	N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances	I	91
DMSc F 1039	หัตถ์ยางสังเคราะห์	สารที่ระเหยได้ (volatile compounds)	I	103
DMSc F 1040	ผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber	2- Mercaptobenzothiazole (MBT)	I	105
DMSc F 1041	ผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber	Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246	I	111



DMSc F 1025: การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำ
Determination of total solids in water

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งต่างๆ ยกเว้นน้ำเสียในช่วง 25 - 2,000 mg/L

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. 2-64.

3. หลักการ (Principle)

ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำเป็นผลรวมของสารแขวนลอยทั้งหมด (total suspended solids) และสารที่ละลายน้ำทั้งหมด (total dissolved solids) หาได้โดยการระเหยน้ำจนแห้งและอบในตู้อบร้อนที่ 103 - 105°C จนน้ำหนักคงที่

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g
- 4.2 อ่างน้ำร้อน (water bath)
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven) สำหรับใช้งานที่อุณหภูมิ 103 - 105°C
- 4.4 โถดูดความชื้น (desiccator)
- 4.5 Magnetic stirrer with TFE stirring bar (ใช้ในกรณีที่น้ำมีความขุ่น)
- 4.6 คีมคีบ (forcep)
- 4.7 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุ 100 ml เป็นแก้วชนิด high silica หรือเป็นกระเบื้อง porcelain
- 4.8 Pipette ขนาด 100 ml
- 4.9 Low form beaker



5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

5.1 การจัดการตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

วิเคราะห์ทันทีที่ได้รับตัวอย่าง ถ้าไม่สามารถทำได้ให้เก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่ $\leq 6^{\circ}\text{C}$ และวิเคราะห์ภายใน 7 วัน

5.2 การเตรียมตัวอย่าง ผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

6.1 อบถ้วยระเหยที่ล้างสะอาดแล้วในตู้อบที่ $103 - 105^{\circ}\text{C}$ นาน 1 hr เก็บในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งทันทีก่อนใช้งานและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (A)

6.2 ปิเปิดตัวอย่างน้ำขณะผสมเป็นเนื้อเดียวกัน 100 ml โดยดูดที่ระดับกลางภาชนะใส่ในถ้วยระเหยที่ชั่งน้ำหนักแล้วและระเหยบนอ่างน้ำร้อนจนแห้งกรณีที่มีน้ำมีความขุ่นให้ใช้ magnetic stirrer with TFE stirring bar

6.3 อบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ $103-105^{\circ}\text{C}$ อย่างน้อย 1 hr หลีกเลียงการวางถ้วยระเหย ณ ตำแหน่งในตู้อบที่อุณหภูมิไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ทั้งนี้พิจารณาจากผลการสอบเทียบตู้อบ

6.4 เก็บในโถดูดความชื้นใกล้บริเวณเครื่องชั่ง ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (B)

6.5 อบซ้ำอีก 1 hr ชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (B) เก็บในโถดูดความชื้น คำนวณผลต่างของการชั่งน้ำหนักครั้งก่อน (ข้อ 6.4) ถ้าผลต่างเกิน 0.5 mg อบซ้ำอีก 1 hr ทำเช่นนั้นจนน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกัน 2 ครั้งต่างกันไม่เกิน 0.5 mg

7. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

7.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารทั้งหมด (mg/L)} = \frac{(B - A) \times 10^6}{V}$$

โดย B = น้ำหนักของถ้วย + สิ่งที่เหลือจากการอบแห้ง (g)(ใช้น้ำหนักสุดท้าย)

A = น้ำหนักถ้วย (g)

V = ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)

7.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณสารทั้งหมด หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร รายงานค่าที่พบเป็นเลขจำนวนเต็ม



8. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

8.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

8.1.1 สอบเทียบเครื่องชั่งโดยห้องปฏิบัติการสอบเทียบจากภายนอก ปีละ 1 ครั้ง หรือมากกว่า หากพบว่าสถานะของเครื่องชั่งมีการเปลี่ยนแปลงไปจากที่เคยสอบเทียบ

8.1.2 ตรวจสอบเครื่องชั่งประจำวัน (daily check)

8.1.3 สอบเทียบตุ้มน้ำหนักโดยห้องปฏิบัติการสอบเทียบจากภายนอก ปีละ 1 ครั้ง หรือมากกว่า หากพบว่าสถานะของตุ้มน้ำหนักมีการเปลี่ยนแปลงไปจากที่เคยสอบเทียบ

8.1.4 ตรวจสอบ silica gel ในโถดูดความชื้นให้เป็นสีน้ำเงินเมื่อจะใช้งาน

8.2 การวิเคราะห์

ทุกชุดตัวอย่าง (ชุดละไม่เกิน 10 ตัวอย่าง) ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) 1 ตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

9. รายละเอียดอื่น

9.1 ห้ามจับถ้วยระเหยด้วยมือเปล่า ให้ใช้คีมคีบ

9.2 ถ้าน้ำหนักในข้อ 6.4 น้อยกว่าหรือเท่ากับน้ำหนักถ้วยเปล่า (ในข้อ 6.1) ให้ทำข้อ 6.3-6.4 ซ้ำ อีกเพียงครั้งเดียว

9.3 ถ้า total solids มากกว่า 200 mg ให้วิเคราะห์ใหม่โดยลดปริมาตรตัวอย่างให้เหมาะสม เนื่องจากอาจมีการเกิดเป็น water-trapping crust ได้ ทำให้น้ำไม่สามารถระเหยได้หมด



DMSc F 1026: การหาปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำ
Determination of total hardness in water

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้หาปริมาณความกระด้างทั้งหมด (total hardness) ในน้ำดื่ม น้ำแข็ง น้ำใช้ในการผลิตอาหาร น้ำประปา น้ำบาดาล และน้ำจากแหล่งต่างๆ ยกเว้นน้ำเสีย

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. 2-44 to 2-47.

3. หลักการ (Principle)

ความกระด้างในน้ำมีสาเหตุจากไอออนบวกของโลหะที่มีวาเลนซ์ 2 ได้แก่แคลเซียม (Ca^{2+}) กับแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ที่มีอยู่ในน้ำ ความกระด้างหมายถึงผลรวมความเข้มข้นของแคลเซียมกับแมกนีเซียม โดยคำนวณเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร วิธีวิเคราะห์หาปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำได้อย่างรวดเร็ว คือการไตเตรทด้วย EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate) โดย EDTA เป็น chelating agent สามารถสร้างไอออนเชิงซ้อนกับไอออนบวกของโลหะ ที่เป็นสาเหตุของความกระด้างในน้ำ เมื่อเติม eriochrome black T เป็น indicator จำนวนเล็กน้อยลงไปในการละลายที่ pH 10.0 ± 0.1 eriochrome black T จะรวมกับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เกิดเป็นสารละลายสีม่วงแดง เมื่อเติม EDTA ซึ่งเป็น titrant ลงไปในการละลายจะไปดึงไอออนบวกของ Ca^{2+} , Mg^{2+} เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าถึงจุดยุติ (end point)

$\text{metal}^{2+} + \text{eriochrome black T} \rightleftharpoons (\text{metal}^{2+} - \text{eriochrome black T})$ (สีม่วงแดง)

$(\text{metal}^{2+} - \text{eriochrome black T}) + \text{EDTA} \rightleftharpoons (\text{metal}^{2+} - \text{EDTA}) + \text{eriochrome black T}$ (สีน้ำเงิน)



4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g
- 4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven)
- 4.3 เตาไฟฟ้า (hot plate)
- 4.4 pH-Meter
- 4.5 โถดูดความชื้น (desiccator)
- 4.6 ข้อนตักสาร
- 4.7 Beaker
- 4.8 Volumetric flask
- 4.9 Erlenmeyer flask
- 4.10 Glass funnel
- 4.11 Dropper
- 4.12 Graduated cylinder
- 4.13 ขวดพลาสติกชนิด polyethylene หรือขวดแก้วชนิด borosilicate
- 4.14 Pipette
- 4.15 Buret

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าและ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

- 5.1 EDTA
- 5.2 0.1% methyl red indicator: ละลาย methyl red 0.01 g ใน 95% ethanol ปรับปริมาตรครบ 10 ml
- 5.3 3 N NH_4OH : เจือจาง NH_4OH เข้มข้น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร NH_4OH
- 5.4 1:1 HCl: ค่อยๆ เติม conc. HCl ลงใน H_2O ในปริมาตรที่เท่ากัน คนให้เข้ากัน ทั้งให้เย็น



5.5 0.5% eriochrome black T indicator: ผสม eriochrome black T 0.5 g ซึ่งเป็นเกลือโซเดียมของ 1-(1-hydroxy-2-naphthylazo)-5-nitro-2-naphthol-4-sulfonic acid; No. 203 และ NaCl 100 g เข้าด้วยกัน

5.6 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

5.7 NH_4Cl

5.8 NaCl

5.9 CaCO_3 , anhydrous

5.10 95 % ethanol

5.11 การเตรียมสารละลาย buffer และ indicator

ชั่ง EDTA 1.179 g และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 644 mg ละลายใน H_2O 50 ml เติมสารละลายนี้ลงใน NH_4Cl ที่ชั่งมา 16.9 g และเติม conc. NH_4OH 143 ml เทลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วย H_2O จนครบ 250 ml เก็บสารละลายในขวดพลาสติกชนิด polyethylene หรือขวดแก้วชนิด borosilicate ปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นป้องกันการสูญเสียแอมโมเนีย เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

5.12 สารมาตรฐาน (Standards)

5.12.1 สารละลายมาตรฐาน 0.01 M EDTA

ชั่ง EDTA 3.723 g ละลายในน้ำ ปรับปริมาตรจนครบ 1L volumetric flask ใช้เป็นสารละลาย titrant เก็บในขวดพลาสติกชนิด polyethylene หรือขวดแก้วชนิด borosilicate (หากเก็บในขวดแก้วธรรมดาสารละลาย EDTA สามารถดึงไอออนบวกจากแก้วได้)

5.12.2 สารละลายมาตรฐาน 0.01 M CaCO_3

CaCO_3 ที่สามารถสอบกลับได้ (traceable to SI unit หรือ CRM); primary standard หรือ ชนิดพิเศษมีโลหะหนัก ความเป็นต่าง และ magnesium ต่ำ ชั่ง CaCO_3 (ที่ผ่านการอบแห้งและทำให้เย็นในโถดูดความชื้น) 1.000 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml วาง funnel ไว้บนคอ flask ค่อยๆ เติม 1:1 HCl ลงไปที่ละน้อยเพื่อละลาย CaCO_3 จนหมด เติม H_2O 200 ml นำไปต้มให้เดือดประมาณ 2-3 min เพื่อไล่ CO_2 ที่ไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หยด methyl red ลงไปเล็กน้อยด้วย



dropper แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย 3 N NH_4OH หรือ 1:1 HCl จนมีสีเหลืองส้ม
ถ่ายลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1 L; 1 ml = 1.00 mg
 CaCO_3

5.12.3 การปรับเทียบสารละลายมาตรฐาน

ใช้ pipette ตูด 0.01 M CaCO_3 ใส่ลงใน Erlenmeyer flask เติมสารละลาย buffer
1–2 ml แกว่งให้เข้ากัน เติม eriochrome black T เล็กน้อย แกว่งให้เข้ากันนำไป
ไตเตรทด้วย 0.01 M EDTA จนถึงจุดยุติได้สารละลายเป็นสีน้ำเงิน
คำนวณความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน 0.01 M EDTA จากสมการ

$$N_1 = (N_2 \times V_2) / V_1$$

N_1 = ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน 0.01 M EDTA

N_2 = ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน 0.01 M CaCO_3

V_1 = ปริมาตร (ml) สารละลายมาตรฐาน 0.01 M EDTA

V_2 = ปริมาตร (ml) สารละลายมาตรฐาน 0.01 M CaCO_3

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ใช้ pipette ตูดตัวอย่างปริมาตรตามต้องการใส่ลงใน erlenmeyer flask

7.2 เติมสารละลาย buffer 1 – 2 ml ให้ได้ pH ช่วง 10.0 ± 0.1 แกว่งให้เข้ากัน

7.3 เติม eriochrome black T ลงไปเล็กน้อย แกว่งให้เข้ากัน

7.4 ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.01 M EDTA ที่ปรับเทียบแล้วจนถึงจุดยุติซึ่งสารละลาย
จะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน

7.5 blank ใช้ H_2O แทนตัวอย่าง แล้วดำเนินการตามข้อ 7.2 – 7.4



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ปริมาณความกระด้างทั้งหมด โดยคำนวณเป็น CaCO_3 (mg/L) จากสูตร

$$\text{ปริมาณความกระด้างทั้งหมด คำนวณเป็น } \text{CaCO}_3 = \frac{A \times B \times 1,000}{V}$$

เมื่อ A = ปริมาตร 0.01 M EDTA ที่ใช้ (ml)

B = CaCO_3 (mg) ซึ่งคือปริมาตรของ CaCO_3 ที่ใช้ (เนื่องจาก 1 ml = 1.00 mg CaCO_3)

V = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (ml)

8.2 รายงานปริมาณความกระด้างทั้งหมด โดยคำนวณเป็น CaCO_3 ในหน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the Quality of Test Results)

ทุกชุดตัวอย่าง (ชุดละไม่เกิน 10 ตัวอย่าง) ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) 1 ตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

10.2 จุดยุติจะชัดเจนที่ค่า pH ของสารละลายสูงแต่หากสูงเกินไปจะเกิดการตกตะกอนของ CaCO_3 หรือ $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ค่า pH ของสารละลายควรอยู่ในช่วง 10.0 ± 0.1 และใช้เวลาในการไทเตรทหลังจากเติมสารละลาย buffer ภายใน 5 min มีวิธีที่ช่วยลดการเกิดตะกอนได้แก่

10.2.1 เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเพื่อลดความเข้มข้นของ CaCO_3 หากเจือจางที่ 1:1 ยังเกิดตะกอนให้ใช้วิธีดังนี้

10.2.1.1 ประมาณค่าความกระด้างแล้วเติม titrant ให้ได้ 90% หรือมากกว่า
ลงไปในตัวอย่างก่อนปรับ pH ด้วย buffer หรือ

10.2.1.2 ทำตัวอย่างให้เป็นกรดแล้วกวน 2 min เพื่อไล่ CO_2 ก่อนปรับ pH

10.2.2 การไทเตรทควรทำที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำสีเปลี่ยนช้า ที่อุณหภูมิสูง indicator จะสลายตัว



- 10.2.3 ในการไตเตรทควรเลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างโดยพิจารณาจากปริมาตร EDTA ที่ใช้ให้น้อยกว่า 15 ml และไตเตรทให้เสร็จภายใน 5 min หลังจากเติมสารละลาย buffer
- 10.2.4 กรณีไม่เห็นจุดยุติใช้ปริมาตรตัวอย่าง 25 ml เจือจางด้วย H_2O 25 ml เติมสารละลาย buffer 1-2 ml ซึ่งปกติใช้ 1 ml เพียงพอที่จะทำให้ได้ pH 10.0-10.1 เติม indicator ปริมาณที่เหมาะสม เติม EDTA อย่างช้าๆ และกวนอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งไม่ปรากฏสีอมแดงอ่อนๆ จึงเติมหยดสุดท้ายเล็กน้อยในช่วงเวลา 3-5 sec จุดยุติจะได้สารละลายสีน้ำเงิน
- 10.2.5 ตัวอย่างมีความกระด้างต่ำ (น้อยกว่า 5 mg/L) เช่น น้ำที่ผ่านการแลกเปลี่ยน ไอออนน้ำอ่อน น้ำธรรมชาติ สามารถเพิ่มปริมาตรของตัวอย่างเป็น 100 - 1000 ml ในการไตเตรท และเพิ่มปริมาณของสารละลาย buffer และ indicator ได้ตามส่วน
- 10.2.6 blank ใช้ H_2O ที่ปริมาตรเดียวกับตัวอย่าง เติม EDTA อย่างช้าๆ นำปริมาตรที่ใช้ไปลบออกจาก EDTA ที่ใช้กับตัวอย่าง



DMSc F 1027:

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม

Determination of fat content in ice cream

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม โดยใช้หลักการ Roese-Gottlieb

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 952.06 Fat in Ice Cream and Frozen Desserts. *IDF-ISO-AOAC Method*. Codex –Adopted –AOAC Method*

*Adopted as a Codex Defining Method (Type I) for gravimetry (Roese-Gottlieb) of fat in edible ices.

3. หลักการ (Principle)

หลังจากทำการดัดในนมให้เป็นกลาง (neutralization) และละลายโปรตีนในนม (casein) ด้วย ammonia solution เติม alcohol เพื่อป้องกันการเกิด emulsion ระหว่างการสกัด ไขมันจะถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดย diethyl ether และ petroleum ether หลังจากระเหย ether ออกแล้วอบไขมันให้แห้ง คำนวณปริมาณไขมันในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก หลักการนี้เรียกว่า Roese-Gottlieb principle

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ $100 \pm 1^{\circ}\text{C}$

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 Fat-extraction flasks or tube ชนิดมีจุกปิดที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีผลต่อ solvent ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น PTFE

4.5 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 125 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Ammonia solution ความเข้มข้นประมาณ 25% [$p_{20}(\text{NH}_3) = 910 \text{ g/L}$]

5.2 Petroleum ether, boiling range $30 - 60^{\circ}\text{C}$



5.3 Diethyl ether ชนิดไม่มีสาร peroxide

5.4 Ethanol ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 94% โดยปริมาตร

5.5 Potassium iodide (KI) 10%

6. การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

6.1 การสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กให้เก็บตัวอย่างประมาณ 3 - 4 หน่วย ในขวดปากกว้าง ปิดฝาให้แน่น หรืออาจเก็บในสภาพภาชนะบรรจุเดิม สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ให้ตัดไอศกรีมออกเป็นชิ้น เก็บในขวดปากกว้าง ให้ได้น้ำหนักประมาณ 100 - 150 g ปิดฝาให้แน่น เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ $\leq -18^{\circ}\text{C}$

6.2 นำตัวอย่างที่เก็บไว้ออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย คนให้เข้ากัน ในกรณีที่ตัวอย่างไอศกรีมมีอาหารอื่นผสมอยู่ เช่น ถั่ว ผลไม้ ให้กรองเอาอาหารออก แล้วคนไอศกรีมให้เข้ากันดี ตัวอย่างที่วิเคราะห์เพื่อนำผลที่ได้ไปทำผลลากโภชนาการให้ปั่นตัวอย่างทั้งเนื้อไอศกรีมและอาหารอื่นด้วยเครื่องปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยระเหย

อบถ้วยระเหยในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ $100 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็น ลงจนถึงอุณหภูมิห้องซึ่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 4 - 5 g ลงใน fat-extraction flask or tube บันทึกรับน้ำหนักที่แน่นอน (W) เติมน้ำด้วยน้ำจนได้ปริมาตรประมาณ 10 ml ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ ammonia solution 2 ml ผสมให้เข้ากัน แช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 20 min โดยเขย่าเป็นครั้งคราว ปลดปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำ ethanol 10 ml ผสมให้เข้ากัน

7.3 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 1 โดยการเติมน้ำ diethyl ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1min เติมน้ำ petroleum ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหย ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ $40 - 60^{\circ}\text{C}$

7.4 เติมน้ำ ethanol 5 ml ลงใน extracting flask สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 โดยการเติมน้ำ diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติมน้ำ petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหยไปเติมน้ำระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ $40 - 60^{\circ}\text{C}$



- 7.5 อบถ้วยระเหยที่มีไขมันในตู้อบที่อุณหภูมิ $100 \pm 1^\circ\text{C}$ จนได้น้ำหนักคงที่ (ประมาณ 1 hr) ตั้งทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องซึ่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_2)
- 7.6 วิเคราะห์ blank โดยใช้ น้ำ 10 ml แทนตัวอย่าง น้ำหนักของสารที่เหลืออยู่ในถ้วยระเหย (W_B) ควรน้อยกว่า 0.001 g

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = (W_2 - W_1 - W_B) \times 100 / W$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยระเหย (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยระเหยที่มีไขมันอยู่ (g)

W_B = น้ำหนักสารที่เหลืออยู่ ที่ได้จากการวิเคราะห์ blank = $W_{B2} - W_{B1}$ (g)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณไขมันในหน่วย กรัมต่อ 100 กรัม (g/100 g) หรือ ร้อยละของน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณไขมันในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไม่เกิน 0.2 g
- 10.2 ทดสอบ peroxide ใน diethyl ether โดยการเปิด diethyl ether 10 ml ลงในกระบอกตวง ชนิดที่มีจุกปิดซึ่งผ่านการ rinse ด้วย diethyl ether เดิมสารละลาย 10% KI 1 ml เขย่า กระบอกตวง และตั้งทิ้งไว้ 1min จะต้องไม่เกิดสีเหลืองในชั้นของ diethyl ether ทดสอบเมื่อ เปิดใช้งานครั้งแรก ทดสอบครั้งต่อไปสัปดาห์ละ 1 ครั้ง
- 10.3 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้ง ติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ
- 10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่ายจึงควรทำในที่ที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้
- 10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน



DMSc F 1028: การวิเคราะห์ไนโตรเจนในไอศกรีมโดย Kjeldahl method
Determination of nitrogen in ice cream by
the Kjeldahl method

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในไอศกรีม

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 930.33 (A) Protein in Ice Cream and Frozen Desserts

2.2 ISO 1871: 2009 (E), Food and Feed Products- General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method

2.3 AOAC Official Method 936.15 Standard Solution of Hydrochloric Acid.

3. หลักการ (Principle)

โปรตีนในตัวอย่างถูกย่อยใน H_2SO_4 ใช้ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ เป็น catalyst และ K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของ H_2SO_4 ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น แกล๊อมโมเนียม เติม NaOH มากเกินพอ และกลั่นด้วยไอน้ำ NH_3 ถูกจับไว้ใน H_3BO_3 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยการไตเตรท ด้วยหลักการเดียวกันสามารถดำเนินการได้ 2 วิธี คือ Traditional method และ Block digestion/Steam distillation method

4. เครื่องมือ (Apparatus)

Traditional method

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g

4.2 Digestion flasks-Kjeldahl flask ขนาด 500 หรือ 800 ml

4.3 Distillation flasks-Kjeldahl flask ขนาด 500 หรือ 800 ml ที่มีจุกยาง สามารถต่อกับ trap ที่ป้องกัน NaOH ล้นระหว่างการกลั่น และต่อกับ condenser ใช้ graduated Erlenmeyer titration flask ขนาด 500 ml เก็บ distillate

4.4 Digestion/distillation system-Traditional apparatus สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

4.5 Titration buret-Class A ขนาด 50 ml หรือ Automatic titrator provided with a pH meter ที่สามารถวัดค่า pH ในช่วง 4 - 7



Block digestion/Steam distillation method

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g
- 4.2 Digestion block-Aluminium alloy block หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า ที่สามารถปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ พร้อมทั้งอุปกรณ์วัดอุณหภูมิ
- 4.3 Digestion tubes ขนาด 250 ml
- 4.4 Distillation unit-ใช้สำหรับ steam distillation สามารถต่อได้กับ digestion tubes ขนาด 250 ml และ distillation titration flasks ขนาด 500 ml
- 4.5 Distillation titration flask-graduated Erlenmeyer titration flask ขนาด 500 ml
- 4.6 Titration buret-Class A ขนาด 50 ml หรือ Automatic titrator provided with a pH meter ที่สามารถวัดค่า pH ในช่วง 4 - 7

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 H_2SO_4 ความเข้มข้น 95-98% Nitrogen free
- 5.2 Copper catalyst solution - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ Nitrogen free เตรียมเป็นสารละลาย 0.05g/ml H_2O
- 5.3 K_2SO_4 Nitrogen free (หรือใช้ Kjeldahl catalyst tablets สำเร็จรูปแทน catalyst ในข้อ 5.2 และ 5.3)
- 5.4 Sodium hydroxide solution - 50% (w/w) nitrate free NaOH (ความเข้มข้นและปริมาณเปลี่ยนแปลงได้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต)
- 5.5 Boiling chips-Mesh size 10
- 5.6 Methyl red/Bromocresol green indicator solution-ละลาย methyl red 0.2g ใน 95% ethanol และปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol ครบ 100 ml ละลาย bromocresol green 1 g ใน 95% ethanol และปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol ครบ 500 ml ผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน
- 5.7 Boric acid solution - 4% with indicator ละลาย H_3BO_3 40 g ด้วยน้ำ เจือจางจนครบปริมาตร 1 L เติม indicator (5.6) 3 ml สารละลายนี้จะมีสีส้มอ่อน (1-4% สำหรับ Block digestion)
- 5.8 0.1000 M Hydrochloric acid standard solution-เตรียมเอง หรือใช้ สารละลายที่มีใบรับรองความเข้มข้น 0.0995-0.1005 M และ ใช้ค่า 0.1000 M ในการคำนวณ
 - 5.8.1 ปิเปต conc. HCl 8.6 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 1 L ซึ่งมีน้ำอยู่ประมาณ 600 ml ปรับให้ครบปริมาตร 1L ด้วย H_2O ผสมให้เข้ากัน
 - 5.8.2 standardization 0.1000 M HCl: ชั่ง anh. Na_2CO_3 (อบที่ $120^\circ C$ เป็นเวลา 3 hr และเก็บใน desiccator) ประมาณ 0.25 g ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วย H_2O (ใช้ H_2O ที่ต้มให้เดือดเพื่อไล่ CO_2 และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง)



ประมาณ 80 ml เติม methyl red indicator ประมาณ 5 หยดจะได้สารละลายสีส้มอ่อนนำไปไตเตรทกับ 0.1000 M HCl ที่เตรียมไว้จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีของ reference solution เล็กน้อย (reference solution: H_2O ที่ปราศจาก CO_2 80 ml เติม methyl red indicator 5 หยด) นำไปต้มให้เดือดเบาๆ บน hot plate นานประมาณ 2min ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปไตเตรทต่อกับ 0.1000 M HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม บันทึกปริมาตรรวมของ 0.1000 M HCl ที่ใช้ไตเตรท คำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของ 0.1000 M HCl จากสมการ

$$M = [(W \times 1000)/(V \times 52.994)]$$

โดย M = Molarity ของ HCl (mole/L)

W = น้ำหนักของ anh. Na_2CO_3 (g)

V = ปริมาตรของสารละลาย 0.1000 M HCl ที่ใช้ไตเตรท (ml)

52.994 = น้ำหนักสมมูลของ Na_2CO_3

5.9 Ammonium sulfate - 99.9% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.10 Tryptophan หรือ lysine hydrochloride - 99% $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ หรือ $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$

5.11 Sucrose - Nitrogen free

6. การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

- 6.1 การสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กให้เก็บตัวอย่างประมาณ 3 - 4 หน่วย ในขวดปากกว้าง ปิดฝาให้แน่น หรืออาจเก็บในสภาพภาชนะบรรจุเดิม สำหรับตัวอย่างมีขนาดใหญ่ให้ตัดไอศกรีมออกเป็นชิ้น เก็บในขวดปากกว้าง ให้น้ำหนักประมาณ 100 - 150 กรัม ปิดฝาให้แน่น เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ $\leq -18^\circ\text{C}$
- 6.2 นำตัวอย่างที่เก็บไว้จากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย คนให้เข้ากัน ในกรณีที่ตัวอย่างไอศกรีมมีอาหารอื่นผสมอยู่ เช่น ถั่ว ผลไม้ให้กรองเอาอาหารออก แล้วคนไอศกรีมให้เข้ากันดี ตัวอย่างที่วิเคราะห์เพื่อนำผลที่ได้ไปทำฉลากโภชนาการให้ปั่นตัวอย่างทั้งเนื้อไอศกรีมและอาหารอื่นด้วยเครื่องปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

Traditional method

- 7.1 ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใส่ใน beaker ประมาณ 4 - 5 g (ปริมาณไนโตรเจน 0.005 - 0.2 g)
- 7.2 ถ่ายตัวอย่างลงใน digestion flask ใช้ H_2O ประมาณ 25 ml rinse ตัวอย่างที่ติดอยู่ที่คอขวดลงไปใน flask เติม K_2SO_4 15.00 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution 1 ml และ boiling chips 8 - 10 ชิ้น ลงใน digestion flask แล้วปิดจุกและวิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O แทนตัวอย่าง



- 7.3 Digestion burner setting - ปรับตั้ง heater โดย ใช้ flask ที่มี H_2O ประมาณ 250 ml เติม boiling chips 3 - 4 ชิ้น ตั้งความร้อนให้สามารถทำให้น้ำเดือดได้ภายในเวลา 5 - 6 min
- 7.4 Digestion - ย่อยตัวอย่าง โดยใช้ความร้อนต่ำไม่ให้เกิดฟองล้นออกจากคอของ Kjeldahl flask เป็นเวลาประมาณ 20 min หรือจนกว่ามีควันขาวเกิดขึ้น หลังจากนั้นเพิ่มความร้อนประมาณครึ่งหนึ่งของความร้อนที่ได้ทดลองไว้ในข้อ 7.3 ประมาณ 15 min แล้วเพิ่มความร้อนเท่ากับความร้อนที่ได้ทดลองไว้ในข้อ 7.3 จนกระทั่งได้ตัวอย่างมีสีเขียวอมฟ้าจางๆ และใส ต้มให้เดือดต่อไปอีก 1 - 1.5 hr หลังจากนั้น ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 min เติม H_2O 300 ml แก้ว flask เพื่อให้สารละลายผสมกัน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปกลั่นขั้นตอนนี้สามารถเก็บไว้ได้โดยปิดจุกให้แน่น
- 7.5 Distillation-เปิดน้ำหล่อเย็น เติม H_3BO_3 solution ที่มี indicator 50 ml ลงใน graduated Erlenmeyer titration flask ขนาด 500 ml ต่อ flask รองรับ distillate โดยให้ปลายของ tube ที่ต่อจากปลายของ condenser จุ่มอยู่ใน H_3BO_3 solution ค่อยๆ เติม 50% NaOH 75 ml อย่างระมัดระวังโดยเทลงข้างๆ flask ช้าๆ ห้ามแกว่ง ชั้นของ NaOH จะอยู่ข้างใต้ ประกอบ flask เข้ากับ condenser ทันที หลังจากนั้น เขย่าอย่างแรงเพื่อให้สารละลายผสมกัน ให้ความร้อนจนกระทั่ง NH_3 ถูกกลั่นออกมา (≥ 150 ml distillate หรือ ≥ 200 ml total volume) ระหว่างกลั่นต้องเฝ้าดูตลอดเวลา เนื่องจากอาจเกิดการ bump ที่จุดนี้ เมื่อการกลั่นสมบูรณ์ ยก receiving flask ออก หยุดให้ความร้อน ใต้เตา H_3BO_3 solution ด้วย 0.1000 M HCl จนกระทั่งจุดยุติเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้

Block digestion/Steam distillation method

- 7.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1 - 5 g ใส่ลงใน digestion tube ที่มี K_2SO_4 12 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ solution 1 ml (หรือใช้ Kjeldahl catalyst tablets) เติม H_2SO_4 20 ml (หรือตามคำแนะนำของผู้ผลิต) และวิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O แทนตัวอย่าง
- 7.2 นำ digestion tube วางลงใน tube rack วาง heat shields แล้วสวม exhaust manifold ลงบนปากของ digestion tube ให้ปิดพอดี ยก rack ไปวางบน digestion block 180 - 230 °C เปิดระบบดูดควัน (ในกรณีที่ใช้น้ำเป็นตัวดูดควันให้ต่อสายจาก exhaust manifold ไปยังก๊อกน้ำที่เตรียมไว้ และเปิดน้ำ) ย่อยจนกระทั่งเกิดควันสีขาว (ประมาณ 30 min) เพิ่มอุณหภูมิของ digestion block 410 - 430 °C ย่อยจนได้ตัวอย่างสีเขียวอมฟ้าจางๆ และใส (clear with light blue-green color) และย่อยตัวอย่างให้เดือดต่ออีกประมาณ 1 hr (เวลาที่ใช้ในการย่อยทั้งหมดประมาณ 1.75-2.5 hr)
- 7.3 ยก tube rack ออกจากเครื่องย่อย โดยยังมี exhaust manifold สวมอยู่ ตั้งหลอดย่อยให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 min) เติม H_2O 85 ml แก้วเบาๆ เพื่อให้สารในหลอดย่อยผสมกัน ต้องทิ้งให้เย็นก่อนนำไปกลั่น (blank ให้เติม H_2O 100 ml)



ข้อควรระวัง

- หลังจากทิ้งให้เย็นแล้วของเหลวที่ได้ควรใส่น้ำไม่มีตะกอน หรือมีตะกอนเพียงเล็กน้อยที่ก้นของหลอดย่อย การเกิดตะกอนแสดงว่าปริมาณ H_2SO_4 ที่เหลืออยู่ในหลอดย่อยน้อยเกินไป ซึ่งอาจมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าความเป็นจริง
- การเกิดตะกอนอาจเป็นผลมาจากการใช้เวลาในการย่อยนานเกินไปหรือการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit แรงเกินไป
- ถ้าเกิดตะกอนในหลอดย่อยให้อุ่นหลอดย่อยใน block digester จนกระทั่งตะกอนละลาย
- ในกรณีที่มีความจำเป็นต้องตั้งหลอดย่อยที่ยังไม่วิเคราะห์ค้างคืน ให้เติมน้ำลงในหลอดย่อยประมาณ 20 ml เพื่อป้องกันการตกตะกอนของสารในหลอด

7.4 วางหลอดย่อยในเครื่องกลั่น เติมน้ำ 50% NaOH 65 ml ทำการกลั่น เก็บ distillate ใน distillation titration flask ที่มี H_3BO_3 50 ml กลั่นจนได้ distillate ประมาณ 150 ml (รวมปริมาตรทั้งหมด 200 ml)

7.5 ไตเตรท distillate ที่ได้ด้วย 0.1000 M HCl ถึงจุดยุติเห็นเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของ HCl

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

$$\text{ไนโตรเจน (g/100 g)} = \frac{14.007 \times M \times (V_A - V_B) \times 100}{1000 \times W}$$

โดย V_A = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (ml)

V_B = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรท blank (ml)

M = Molarity ของ HCl solution

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{โปรตีน (g/100 g)} = \text{ไนโตรเจน} \times 6.38$$

โดย 6.38 = factor ในการคำนวณปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม

8.3 เกณฑ์ยอมรับความแตกต่างของปริมาณโปรตีนจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate); relative percentage different (%RPD) $\leq 1.3\%$ protein

8.4 รายงานปริมาณโปรตีนในหน่วย กรัมต่อ 100 กรัม (g/100 g) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และแสดง factor ที่ใช้ในการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นโปรตีน



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อย (digestion efficiency)

ซึ่ง lysine monohydrochloride 0.1 g (หรือ tryptophan 0.18 g) และ sucrose 0.67 g พร้อมสารต่าง ๆ ทำการย่อย กลั่น และไตเตรทเช่นเดียวกับตัวอย่าง recovery ที่ได้ควรมีค่าระหว่าง 98-101 % โดย lysine monohydrochloride มี ไนโตรเจน = 15.34% และ tryptophan มี ไนโตรเจน = 13.72% ถ้าค่า recovery ที่ได้ต่ำกว่า 98% ให้ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจนในข้อ 9.3

9.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกลั่น และการไตเตรท

ซึ่ง ammonium sulfate (อบที่ 102°C นาน 3 hr เก็บใน desiccator) 0.12 g ลงในหลอดย่อยนำไปกลั่นและไตเตรท recovery ที่ได้ควรมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 99-101% (ammonium sulfate มีไนโตรเจน = 21.2%) ถ้า % recovery น้อยกว่า 99% แสดงว่ามีการสูญเสียไนโตรเจนในขั้นตอนการกลั่นหรือความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการคำนวณน้อยกว่าที่ควรเป็น

9.3 ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน (nitrogen loss)

ซึ่ง ammonium sulfate (อบที่ 102°C นาน 3hr เก็บไว้ใน desiccator) 0.12 g, sucrose 0.67 g ใส่สารต่าง ๆ ทำการย่อย กลั่น และไตเตรทเช่นเดียวกับตัวอย่าง recovery ที่ได้ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 99 - 101 % ถ้า % recovery ได้ตามเกณฑ์ โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไม่ได้ตามเกณฑ์ แสดงว่าเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยไม่เหมาะสมการคำนวณ

$$\text{recovery (\%)} = \frac{\text{ไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ (\%)}}{\text{ไนโตรเจนของสารมาตรฐานที่ใช้ (\%) \times \text{ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน}}} \times 100$$

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ข้อมูลผล Interlaboratory study นมพร้อมดื่ม (milk) - แสดงเป็นปริมาณโปรตีน
(N x 6.38) : $s_r = 0.006$; $s_R = 0.012$; $RSD_r = 2.817\%$; $RSD_R = 5.707\%$;
 $r \text{ value} = 0.038$ และ $R \text{ value} = 0.049$

10.2 ถ้า blank มีสีชมพูก่อนการไตเตรท แสดงว่าอาจเกิดข้อผิดพลาด เช่น titration vessel ไม่สะอาดให้เปลี่ยน blank ใหม่



10.3 สาเหตุและการแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น

ขั้นตอนการย่อย

สิ่งที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข
เกิดฟองมาก	- ตัวอย่างมีน้ำตาลหรือไขมันสูง - ปริมาณของตัวอย่างมากเกินไป	- เติมน antifoam เช่น silicone - ลดปริมาณตัวอย่าง
หลังการย่อยมีตะกอนดำ	- เวลาและ/หรืออุณหภูมิในการย่อยไม่เหมาะสม - catalyst ที่ใช้ไม่เหมาะสม	- ปรับอุณหภูมิและเวลาในการย่อย - ใช้ปริมาณตัวอย่าง กรด และชนิดของ catalyst ให้เหมาะสม
หลังการย่อยเกิดผลึกจำนวนมาก	- มีการสูญเสียกรด	- ลดความแรงของการดูดควัน - ใช้ปริมาณตัวอย่าง กรด และชนิดของ catalyst ให้เหมาะสม

ระหว่างการกลั่น และการไตเตรท

สิ่งที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข
% recovery ของการกลั่น และการไตเตรท ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด	- มีการสูญเสียแอมโมเนีย - ปริมาณ H_3BO_3 ไม่เพียงพอ - การกลั่นยังไม่สมบูรณ์ - ความเข้มข้นของกรดไม่ถูกต้อง - ค่าของ blank สูงเกินไป	- ตรวจสอบอุปกรณ์เครื่องมือ บริเวณที่มีการรั่วได้ - เพิ่มความเข้มข้นหรือปริมาตรของ H_3BO_3 - เพิ่มเวลาในการกลั่น - ตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นของกรด - ทำ blank ซ้ำ
% recovery ของการกลั่น และการไตเตรทสูงเกินไป	- ความเข้มข้นของกรดไม่ถูกต้อง - เกิดการปนเปื้อนเนื่องจากไอของแอมโมเนีย	- ตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นของกรด - หลีกเลี่ยงการกลั่นในบริเวณที่มีไอของแอมโมเนีย



DMSc F 1029: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม
Determination of total solids content in ice cream

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 941.08 Total Solids in Ice Cream and Frozen Desserts. Gravimetric method

3. หลักการ (Principle)

ระเหยนํ้าออกจากตัวอย่างตัวอย่างด้วยอ่างนํ้าร้อน และทำตัวอย่างให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ $100 \pm 1^{\circ}\text{C}$ สารที่เหลืออยู่คือของแข็งทั้งหมด

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.2 ตู้อบร้อน (drying oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ $100 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4.3 อ่างนํ้าร้อน (water bath)
- 4.4 โถดูดความชื้นพร้อมสารดูดความชื้น (desiccator with desiccant)
- 4.5 ถ้วยอลูมิเนียมชนิดมีฝาปิด (flat bottom aluminum dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥ 5 cm

5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 5.1 การสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กให้เก็บตัวอย่างประมาณ 3-4 หน่วย ในขวดปากกว้าง ปิดฝาให้แน่น หรืออาจเก็บในสภาพภาชนะบรรจุเดิม สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ให้ตัดไอศกรีมออกเป็นชิ้น เก็บในขวดปากกว้าง ให้ได้น้ำหนักประมาณ 100-150 g ปิดฝาให้แน่น เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ $\leq -18^{\circ}\text{C}$
- 5.2 นำตัวอย่างที่เก็บไว้ออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย คนให้เข้ากัน ในกรณีที่ตัวอย่างไอศกรีมมีอาหารอื่นผสมอยู่ เช่น ถั่ว ผลไม้ให้กรองเอาอาหารออก แล้วคนไอศกรีมให้เข้ากันดี ตัวอย่างที่วิเคราะห์เพื่อนำผลที่ได้ไปทำผลลากโภชนาการให้ปั่นตัวอย่างทั้งเนื้อไอศกรีมและอาหารอื่นด้วยเครื่องปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน



6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 6.1 เตรียมถ้วยอลูมิเนียม: เขียนรหัสบนถ้วยอลูมิเนียมที่แห้งและสะอาด นำไปอบพร้อมฝาโดยเปิดฝาชะลอบ ในตู้อบร้อนที่ $100 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1.5 hr ปิดฝาค้วยอลูมิเนียมและเอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องซึ่ง (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก (W_1)
- 6.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 g ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) แล้วนำไปประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำเดือด 30 min อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมตัวอย่างโดยเปิดฝาชะลอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ $100 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 3.5 hr ปิดฝาค้วยอบ เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก อบอีกครั้งละ 1 hr จนได้น้ำหนักคงที่ (W_2)

7. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

7.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ร้อยละของน้ำหนัก)} = (W_2 - W_1) \times 100 / W$$

$$\text{เมื่อ } W_1 = \text{น้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียมหลังอบ (g)}$$

$$W_2 = \text{น้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่างหลังอบ (g)}$$

$$W = \text{น้ำหนักของตัวอย่าง (g)}$$

7.2 รายงานผลการทดสอบ (Test report)

รายงานปริมาณของแข็งทั้งหมดในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก ด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

8. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

9. รายละเอียดอื่น

- 9.1 น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้ง ติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ
- 9.2 ห้ามจับถ้วยอลูมิเนียมที่อบแล้วด้วยมือเปล่า ให้ใช้ tong หรือสวมถุงมือที่สะอาด
- 9.3 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณของแข็งทั้งหมดในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไปไม่เกิน 0.2 g



DMSc F 1030: การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกในเครื่องดื่ม
Determination of citric acid in beverage

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริก (citric acid) ในน้ำผลไม้และเครื่องดื่มเกลือแร่

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Methods of Analysis 986.13 Quinic, Malic, and Citric Acids in Cranberry Juice Cocktail and Apple Juice.

3. หลักการ (Principle)

กรดซิตริกในตัวอย่างถูกกรองผ่าน SPE cartridge เพื่อกำจัดตัวรบกวน และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-UV detector

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 HPLC-UV detector หรือ diode array detector

4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 กรัม

4.3 Mixer/blender

4.4 Ultrasonic bath

4.5 pH meter

4.6 อุปกรณ์

4.6.1 Column: reversed phase C₁₈ (5 µm, 4.6 x 250 mm) หรือ เทียบเท่า

4.6.2 ชุดกรองสารละลาย (solvent clarification kit) และชุดกรองตัวอย่าง (sample clarification kit): membrane filter (CA, 0.45 µm, dia. 47 mm), syringe filter (CA, 0.45 µm, dia. 13 mm)

4.6.3 Luer-Lok syringe ขนาด 10 ml

4.6.4 SPE cartridges, Sep-Pak® Vac 3cc (500 mg) C₁₈ หรือเทียบเท่า

4.6.5 Volumetric flask ขนาด 50, 100, 200, 250 และ 1,000 ml

4.6.6 Beaker ขนาด 10, 50 และ 1,000 ml

4.6.7 Pipette ขนาด 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 ml



5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Acetonitrile (HPLC grade)
- 5.2 Methanol (HPLC grade)
- 5.3 Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)
- 5.4 85% phosphoric acid (H_3PO_4)
- 5.5 H_2O ใช้ล้าง 3 ครั้ง หรือน้ำที่มีคุณภาพเทียบเท่า
- 5.6 mobile phase (phosphate buffer, 0.2 M KH_2PO_4 , pH 2.4): ชั่ง KH_2PO_4 27.2 g ลงใน beaker 50 ml ละลายด้วย H_2O และถ่ายลงใน beaker ขนาด 1,000 ml เติม H_2O ให้มีปริมาตร 950 ml จากนั้นนำมาปรับ pH ให้ได้ 2.4 ด้วย 85% H_3PO_4 แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O และกรองผ่านกระดาษกรองชนิด CA ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ และ degas นาน 5min ในเครื่อง ultrasonic bath
- 5.7 Conditioning solution (acetonitrile: H_2O = 50:50)
- 5.8 สารมาตรฐานกรดซิติริก (monohydrate): purity $\geq 99.5\%$
 - 5.8.1 สารละลายมาตรฐานกรดซิติริก (2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$): ชั่งสารมาตรฐานกรดซิติริก 0.2000 g ใน beaker ขนาด 10 ml ละลายด้วย H_2O ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O
 - 5.8.2 intermediate standard solution (1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$): ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.8.1) ปริมาตร 50 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O
 - 5.8.3 working standard solution (10, 20, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$): ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.8.2) ปริมาตร 1, 2, 5, 10 และ 20 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แต่ละใบ แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O
 - 5.8.4 working standard solution (400 และ 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$): ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.8.1) ปริมาตร 10 และ 20 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml แต่ละใบ แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 สุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาเจือจาง หรือละลายด้วยน้ำกลั่น โดยการปิเปต (V_1) ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml (V_2) หรือตามความเหมาะสม ในกรณีที่ตัวอย่างอัดแก๊ส ให้ทำการ degas โดยนำไป sonicate ประมาณ 3-5 min ก่อนเจือจาง
- 6.2 condition cartridge โดยใช้ Luer-Lok syringe ดูด conditioning solution (5.7) จำนวน 10 ml ผ่านลงใน SPE cartridge



- 6.3 บีบสารละลายที่ได้จากข้อ 6.1 ปริมาตร 10 ml ผ่าน SPE cartridge ที่ได้ทำการ condition แล้ว (6.2) ทั้งสารละลายที่ได้ประมาณ 4-5 ml ไปแล้วเก็บส่วนที่เหลือไว้
- 6.4 กรองส่วนที่เหลือด้วย syringe filter

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ฉีด working standard solution ที่ได้จากข้อ 5.8.3 และ 5.8.4 เข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐาน โดย plot ระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และคำนวณค่า R^2 โดยเกณฑ์การยอมรับคือ ≥ 0.9995
- 7.2 นำสารละลายที่ได้จาก 6.4 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และหาปริมาณโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน
- 7.3 สภาวะเครื่อง HPLC
Column: RP C₁₈ (5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Detector: UV 214 nm หรือ DAD
Flow rate: 1.0 ml/min

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{กรดซิตริก (mg/L)} = (c \times v_2 \times d) / v_1$$

$$\text{กรดซิตริกคำนวณเมื่อปราศจากน้ำ (mg/L)} = (c \times v_2 \times 192.124 \times d) / (v_1 \times 210.14)$$

$$\text{หรือปริมาณกรดซิตริกคำนวณเป็นซิเตรต (mg/L)} = (c \times v_2 \times 189.1 \times d) / v_1 \times 210.14$$

เมื่อ c	=	ปริมาณกรดซิตริกในตัวอย่างที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน (μ g/ml)
v_1	=	ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)
v_2	=	ปริมาตรของตัวอย่างที่เตรียม (ml)
d	=	dilution factor
192.124	=	molecular weight ของ citric acid anhydrous
210.14	=	molecular weight ของ citric acid monohydrate
189.1	=	molecular weight ของ citrate

8.2 การรายงานผล

ให้รายงานผลปริมาณกรดซิตริกคำนวณเมื่อปราศจากน้ำ หรือกรดซิตริกคำนวณเป็นซิเตรต ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ทำการตรวจเช็คระบบของเครื่อง HPLC (system suitability) โดยการฉีดสารมาตรฐาน 1 ระดับความเข้มข้น 5 ซ้ำ ก่อนทำการวิเคราะห์ทุกครั้ง โดย % RSD ของ retention time และ peak area ต้องไม่เกิน 1 และ 2.5 ตามลำดับ
- 9.2 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดย R^2 ต้องมากกว่า 0.9995
- 9.3 ทำการวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate analysis) ไม่น้อยกว่า 10% ของการวิเคราะห์แต่ละรุ่นและ % RPD ไม่เกิน 5
- 9.4 ทุก 10 ตัวอย่างให้ฉีดสารละลายมาตรฐาน 1 ครั้งโดย % difference ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีด กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เตรียม ต้องไม่เกิน 5
- 9.5 กรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณกรดซิติริกสูง ให้เจือจางหรือลดขนาดตัวอย่างตามความเหมาะสม โดยค่าความเข้มข้นที่อ่าน ต้องอยู่ภายในช่วงของกราฟมาตรฐานที่เตรียม
- 9.6 ทุก 10 ตัวอย่างให้ทำการวิเคราะห์ control sample โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ในช่วง $\pm 3SD$



DMSc F 1031: การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์และไนเตรตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Determination of nitrite and nitrate in meat products

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ และไนเตรต (nitrite and nitrate) ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

BS EN 12014-4: 2005. Foodstuffs-Determination of nitrate and/or nitrite content-Part 4: Ion-exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products.

3. หลักการ (Principle)

ไนไตรต์ และไนเตรตจะถูกสกัดออกจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยน้ำร้อน และเติม acetonitrile เพื่อกำจัดสารรบกวน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Ion-exchange column และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 205 nm

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 HPLC-UV detector หรือ diode array detector

4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.3 Mixer/blender

4.4 Ultrasonic bath

4.5 pH meter

4.6 Magnetic stirrer

4.7 อุปกรณ์

4.7.1 Column: anion exchange (4.6 mm × 150 mm), packing material: polymethacrylate resin with a quarternary ammonium functional group, particle size of 10 μm, capacity (30 ± 3 μeq/ml) with a precolumn

4.7.2 ชุดกรองตัวอย่าง (sample clarification kit) และ ชุดกรองสารละลาย (solvent clarification kit): membrane filter (nylon, 0.2 μm, dia. 47 mm), syringe filter (nylon, 0.45 และ/หรือ 0.2 μm, dia. 13 mm)



- 4.7.3 กระดาษกรอง Whatman No.1 หรือเทียบเท่า
- 4.7.4 Volumetric flask ขนาด 100, 200 และ 1,000 ml
- 4.7.5 Beaker ขนาด 20, 50 และ 100 ml
- 4.7.6 Pipette ขนาด 1, 5, 10, 15 และ 20 ml
- 4.7.7 Cylinder ขนาด 25, 50 และ 100 ml
- 4.7.8 Wide neck conical flask ขนาด 150 ml

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดใช้ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้เพิ่มเติม และ H_2O ใช้น้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือที่มีคุณภาพเทียบเคียง

- 5.1 Acetonitrile (HPLC grade)
- 5.2 Glycerol
- 5.3 Lithium hydroxide anhydrous or lithium hydroxide monohydrate
- 5.4 Boric acid (purity $\geq 99.0\%$)
- 5.5 Hydrochloric acid (1.8 M และ 0.1 M)
 - 1.8 M HCl: ตวง HCl (conc.) ปริมาตร 15 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ที่มี H_2O อยู่ประมาณ 50 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O
 - 0.1 M HCl: ตวง 1.8 M HCl ประมาณ 5.6 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ที่มี H_2O อยู่ประมาณ 50 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O
- 5.6 Gluconic acid solution: เจือจาง gluconic acid solution ปริมาตร 50 ml ด้วย H_2O ใน volumetric flask ขนาด 100 ml
- 5.7 Lithium borate gluconate buffer solution: ละลาย boric acid (5.4) 34 g และ gluconic acid solution (5.6) 19.6 ml ลงใน volumetric flask ที่มี H_2O อยู่ประมาณ 500 ml เติมน้ำ lithium hydroxide anhydrous (5.3) 11 g (หรือ lithium hydroxide monohydrate 19.26 g) เติมน้ำ glycerol (5.2) ปริมาตร 125 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml ด้วย H_2O แล้วเขย่าให้เข้ากัน (สารละลายนี้สามารถเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ ได้นาน 6 เดือน)
- 5.8 mobile phase: ผสม buffer solution (5.7) ปริมาตร 17 ml และ acetonitrile ปริมาตร 125 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml ที่มี H_2O อยู่ประมาณ 500 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O และเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาปรับ pH ด้วย 1.8 M HCl ปรับให้ได้ pH ประมาณ 7.0 จากนั้นค่อยๆ หยด 0.1 M HCl เพื่อปรับ pH เป็น 6.5 ± 0.1 จากนั้นกรองผ่าน membrane filter ขนาด $0.2\ \mu m$ ชนิด nylon และ degas นาน 5 min ในเครื่อง ultrasonic bath



5.9 สารมาตรฐาน potassium nitrate และ sodium nitrite: purity $\geq 99.0\%$

5.9.1 stock solution of nitrate and nitrite (2,000 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ nitrate และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ nitrite): ชั่งสารมาตรฐาน potassium nitrate 3.258 g และ sodium nitrite 1.500 g ใน beaker ขนาด 20 ml ละลายด้วย H_2O ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O (สารมาตรฐานผสมนี้สามารถเก็บในตู้เย็นที่ 4°C ได้นาน 2 สัปดาห์)

5.9.2 intermediate standard solution (200 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ nitrate และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ nitrite): ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.9.3 working standard solution (0, 1, 5, 10, 15 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ nitrate และ 0, 0.5, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ nitrite): ปิเปต intermediate standard solution ปริมาตร 0, 1, 5, 10, 15 และ 20 ml ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 200 ml แต่ละใบ แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างมาสับและบดให้ละเอียดด้วย blender แล้วผสมตัวอย่างจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการวิเคราะห์ (Procedure)

7.1 การสกัด และกำจัดสารรบกวน

7.1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน wide neck conical flask ขนาด 150 ml เติมน้ำร้อน ($50 - 60^\circ\text{C}$) 50 ml ทำการกวนให้เข้ากัน แล้วถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 200 ml

7.1.2 เติม acetonitrile 50 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรด้วย H_2O

7.1.3 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 หรือเทียบเท่า

7.1.4 กรองผ่าน syringe filter ชนิด nylon ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ ถ้าตัวอย่างไม่ใสให้กรองผ่าน syringe filter ขนาด $0.2\ \mu\text{m}$

7.1.5 วิเคราะห์ blank โดยใช้ น้ำกลั่น 10 ml แทนตัวอย่าง

7.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

7.2.1 ฉีด working standard solution ความเข้มข้นละ 1 μl ปริมาตร 40 μl เข้าเครื่อง HPLC

7.2.2 สร้างกราฟมาตรฐานของไนเตรต และไนไตรต์ โดย plot ระหว่าง peak area กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และคำนวณค่า R^2 โดยเกณฑ์การยอมรับคือ ≥ 0.9995



7.3 นำสารละลายที่ได้จาก 7.1.4 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และหาปริมาณโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

7.4 สภาวะเครื่อง HPLC

Column: anion exchange (4.6 mm × 150 mm)

Detector: UV, 205 nm หรือ DAD

Flow rate: 2.0 ml/min

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนไตรต์ หรือไนเตรต (mg/kg)} = (c \times v \times F) / w$$

เมื่อ c = ปริมาณไนไตรต์ หรือไนเตรตในตัวอย่างที่อ่านจากกราฟ ($\mu\text{g/ml}$)

v = ปริมาตรของตัวอย่าง (200 ml)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

F = dilution factor

8.2 การรายงานผล

รายงานผลเป็นจำนวนเต็ม หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทำการตรวจเช็คระบบของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการใช้งานทุกครั้ง โดยการฉีดสารมาตรฐาน 1 ระดับความเข้มข้น จำนวน 5 ซ้ำ % RSD ของ retention time และ peak area ต้องไม่เกิน 1 และ 2.5 ตามลำดับ

9.2 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดย R^2 ต้องมากกว่า 0.9995

9.3 ทำการฉีด blank ทุกครั้งก่อนฉีด sample

9.4 ทุก 5 ตัวอย่างให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate analysis) โดย % RPD ไม่เกิน 5

9.5 ทุก 5 ตัวอย่างให้ฉีดสารละลายมาตรฐาน 1 ครั้งโดย % difference ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เตรียม ต้องไม่เกิน 5

9.6 กรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณไนเตรต หรือไนไตรต์ ไม่อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธี ให้เจือจางตามความเหมาะสมด้วย mobile phase โดยค่าความเข้มข้นที่อ่านต้องอยู่ภายในช่วงของกราฟมาตรฐานที่เตรียม

9.7 ทุก 10 ตัวอย่างให้ทำการวิเคราะห์ control sample โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ในช่วง $\pm 3\text{SD}$



DMSc F 1032: การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหยอาหารจำลอง **Determination of residues left after evaporation of food simulants**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหยอาหารจำลอง (food simulants) ที่ได้จากการทดสอบ migration ภายใต้สภาวะทดสอบที่กำหนดโดยวิธีนี้ ของขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ทำด้วยพลาสติกใช้เพื่อการบริโภคของทารกและเด็กเล็ก

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 BS EN 1186-1: 2002 Material and articles in contact with food stuffs-Plastics-Part 1 : Guide to the selection of conditions and test methods for overall migration
- 2.2 BS EN 1186-3: 2002 Material and articles in contact with food stuffs-Plastics-Part 3 : Test methods for overall migration into aqueous food simulants by total immersion
- 2.3 BS EN 1186-9: 2002 Material and articles in contact with food stuffs-Plastics-Part 9 : Test methods for overall migration into aqueous food simulants by article filling
- 2.4 Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food

3. หลักการ (Principle)

สกัดสารต่างๆที่ตกค้างในตัวอย่างพลาสติก ภายใต้สภาวะการทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 hr โดยมี ethanol 50% (v/v) in aqueous solution และ acetic acid 3% (w/v) in aqueous solution เป็น food simulants ระเหยสารละลายออกไปจนหมด แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลืออยู่ (non-volatile substances) โดยการชั่งน้ำหนัก

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g
- 4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) หรือ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 70 ± 2°C และ 105-110°C
- 4.3 อ่างน้ำร้อน (steam bath)
- 4.4 เตาไฟฟ้า (hot plate)



- 4.5 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ หรือ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)
- 4.6 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.7 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.8 ตะแกรงลวดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel gauze)
- 4.9 ถ้วยระเหย (dish) เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-90 mm น้ำหนักไม่เกิน 100 g ทำด้วยแก้ว หรือ วัสดุอื่นที่เหมาะสม เช่น แพลตินัม (platinum), แพลตินัมอัลลอยด์ (platinum alloy), เซรามิก (glass ceramic and glazed ceramic) เป็นต้น
- 4.10 โถดูดความชื้น (desiccator) และสารดูดความชื้น anhydrous calcium chloride หรือ silica gel
- 4.11 Glass tube ชนิด ground glass stopper เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm สูง 120-200 mm ปริมาตร 125 ml
- 4.12 Measuring cylinder
- 4.13 Beaker
- 4.14 Pipette
- 4.15 ขวดแก้วปากกว้าง พร้อมฝาปิด สามารถบรรจุตัวอย่างทดสอบได้
- 4.16 ขวดแก้วปากเกลียว (glass bottle with screw finish) หรือภาชนะแก้วประเภทอื่นที่เหมาะสม
- 4.17 Flask ชนิด ground glass stopper
- 4.18 Glass beads ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm
- 4.19 Glass rods ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm
- 4.20 แผ่นอะลูมิเนียมเปลว (aluminium foil) หรือวัสดุทนความร้อนอื่น ที่ไม่มีผลรบกวนในการวิเคราะห์

5. สารเคมี (Reagent)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

5.1 Food simulants

- 5.1.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B): ละลาย acetic acid (glacial) 3 g ใน H_2O 100 ml
- 5.1.2 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1): ผสม ethanol (HPLC grade) กับ H_2O ในอัตราส่วน 1:1



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ เช่น ขวดนม หรือภาชนะบรรจุแบบใช้ซ้ำ ใช้ตัวอย่างทดสอบ (test specimen) จำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชิ้น เพื่อวัดปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ทดสอบ วัดปริมาตรโดยใส่ food simulant ลงในตัวอย่างจนถึงระดับสูงสุดที่กำหนดไว้เพื่อการใช้งาน (ถ้ามี) หรือที่ระดับต่ำกว่าขอบบนสุด 5 mm บันทึกปริมาตรและคำนวณค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น ml

6.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ เช่น ฝา และ อุปกรณ์ประกอบอื่น

6.2.1 ฝา ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 3 ชิ้น

6.2.2 อุปกรณ์ประกอบอื่น

6.2.2.1 ตัวอย่างที่มีพื้นที่ประมาณ 1.0 dm^2 ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้น ถ้ามีรูปทรงไม่สมมาตร (irregular shape) ตัดให้มีขนาดและรูปร่างที่สมมาตร จำนวนชิ้นทดสอบที่ใช้ 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และใช้ชิ้นทดสอบ 2 ชิ้น เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว คำนวณพื้นที่ผิวเฉพาะด้านที่สัมผัสอาหารของชิ้นทดสอบแต่ละชิ้น แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย พื้นที่ผิวที่ต้องการ 1.0 dm^2 วัดละเอียดถึง 0.01 dm^2

6.2.2.2 ตัวอย่างที่มีพื้นที่น้อยกว่า 1.0 dm^2 ใช้ชิ้นทดสอบหลายชิ้นประกอบกันเป็นชุดจำนวน 3 ชุด เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชุด เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว คำนวณพื้นที่ผิวให้รวมกัน 1.0 dm^2 วัดละเอียดถึง 0.01 dm^2 คำนวณค่าเฉลี่ยของชิ้นทดสอบแต่ละชุด

หมายเหตุ วิธีคำนวณพื้นที่ผิวปฏิบัติตาม EN ISO 8442-2: 1997 annex B หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม

6.3 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ migration ทำความสะอาดด้วยผ้าหรือแปรงขนนุ่ม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 min ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น หรือปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตสินค้า (ถ้ามี)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test ทำการทดสอบโดยใช้ food simulant ทั้ง 2 ชนิดแต่ละชนิดแยกกัน

7.1.1 ตัวอย่างที่สามารถบรรจุของเหลวได้ ใช้วิธี Article filling ดังนี้

7.1.1.1 ใส่ food simulant (5.1) ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใส่ในตัวอย่างทดสอบตามที่คำนวณไว้ในข้อ 6.1 และเพิ่มอีก 200 ml เพื่อเตรียม blank นำไปอุ่นบน hot plate หรืออุปกรณ์ให้ความร้อนอื่นๆ จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เทใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 แต่ละตัวอย่างให้มีปริมาตรตามที่ได้คำนวณไว้ในข้อ 6.1 $\pm 2 \text{ ml}$ จุ่มอุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ (4.5) ลงในตัวอย่างเพียง 1 ตัวอย่าง ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน หรือใส่ขวดแก้วปากกว้าง (4.15) ปิดฝา สารละลายที่เหลือใน beaker ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อน เพื่อใช้เตรียม blank



- 7.1.1.2 นำตัวอย่างและ blank ไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ สังเกตอุณหภูมิของ food simulant เมื่อถึงระดับ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำตัวอย่างและ blank ออกมา ตรวจสอบระดับของสารละลายที่เหลือ ต้องไม่ต่ำกว่าเดิมมากกว่า 10 mm (กรณีที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดนี้ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้นโดยใช้ตัวอย่างชุดใหม่) ปิเปตสารละลายออกจากตัวอย่างทั้งหมดเก็บใน flask (4.17) และเทสารละลายออกจาก beaker เก็บใน flask ปิดฝาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น test solution และ blank
- 7.1.1.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างเดิม ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง และปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.1.1-7.1.1.2
- 7.1.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท ฝา ใช้วิธี Filling in jar/container ดังนี้
- 7.1.2.1 ใส่ food simulant ลงใน ขวดปากเกลียว (4.16) หรือภาชนะแก้วชนิดอื่น ที่สวมได้พอดีกับฝา จำนวน 5 ใบ แต่ละใบปริมาตรเท่ากับความจุของภาชนะที่ใช้ประกอบกับฝานั้น ± 2 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน จุ่มอุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ ลงในภาชนะที่บรรจุ food simulant เพียง 1 ใบ (ใช้เป็น blank) ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว นำวัสดุที่ปิดไว้ถอดออกสวมฝาที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 กับภาชนะบรรจุ food simulant แต่ละฝากับภาชนะแต่ละใบ จำนวน 3 ใบ ที่เหลือใช้เป็น blank หมุนเกลียวหรือยึดให้แน่น กรณีฝาชนิดเปิดด้านบนใช้แผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน ปิดทับส่วนที่เปิดไว้เพื่อกันไม่ให้สารละลายไหลออก แล้วคว่ำภาชนะบรรจุ food simulant ลงให้ตัวอย่างฝาที่สวมไว้อยู่ด้านล่าง และสัมผัสกับ food simulant อาจใช้ beaker รองรับเพื่อป้องกันภาชนะบรรจุ food simulant ล้ม ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่
- 7.1.2.2 นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิของ food simulant ถึงระดับ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำภาชนะบรรจุ food simulant ออกมา นำฝาดตัวอย่างออกเหลือ food simulant ไว้ในภาชนะบรรจุ ตรวจสอบระดับของสารละลายที่เหลือต้องไม่ต่ำกว่าเดิม 10 mm (กรณีที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดนี้ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้นโดยใช้ตัวอย่างชุดใหม่) ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อนวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น test solution และ blank
- 7.1.2.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ขั้นตอนทดสอบเดิม ล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.2.1-7.1.2.2



7.1.3 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท อุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ใช้วิธี Total immersion ดังนี้

- 7.1.3.1 ใส่ food simulant ลงใน glass tube (4.11) จำนวน 5 ใบแต่ละใบปริมาตร 100 ± 2 ml ปิดฝา จุ่มอุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ ลงใน glass tube เพียง 1 ใบ ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อน นำ glass tube ไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว ใส่ชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.3 แต่ละชิ้นหรือแต่ละชุดลงใน glass tube แต่ละใบจำนวน 3 ใบ glass tube ที่เหลือใช้เป็น blank ใช้ glass bead (4.18) หรือ glass rod (4.19) รองชิ้นทดสอบไม่ให้สัมผัสผนัง tube แยกชิ้นทดสอบไม่ให้ซ้อนทับกันด้วย glass rod ชิ้นทดสอบทุกชิ้นต้องจมในสารละลาย ถ้ามีชิ้นทดสอบลอยขึ้นมาใช้ stainless steel gauze (4.8) กดทับ กรณีที่ใช้ food simulant B ให้ใช้ glass rod แทน ปิดฝาให้สนิท ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่
- 7.1.3.2 นำ glass tube ไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิของ food simulant ถึงระดับ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำ glass tube ออกมา ยกชิ้นทดสอบและอุปกรณ์ทั้งหมดที่ใส่ใน glass tube ขึ้น ปล่อยให้สารละลายที่ติดค้างอยู่ไหลลงสู่ glass tube จนหมด ตรวจสอบระดับของสารละลายที่เหลือต้องไม่ต่ำกว่าเดิม 10 mm (กรณีที่ไม่น่าเป็นไปตามข้อกำหนดนี้ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้นโดยใช้ตัวอย่างชุดใหม่) ปิดฝา วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น test solution และ blank
- 7.1.3.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ชิ้นทดสอบเดิมล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.3.1.-7.1.3.2

7.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหย

7.2.1 การเตรียมถ้วยระเหย

อบถ้วยระเหย (4.9) ที่ล้างสะอาดแล้วในตู้อบร้อนอุณหภูมิ $105 - 110^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 ± 5 min ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (4.10) ประมาณ 1 hr ชั่งน้ำหนักและบันทึกปฏิบัติตามขั้นตอนนี้ซ้ำจนกว่าจะได้น้ำหนักถ้วยคงที่ (มีค่าความแตกต่างของน้ำหนักที่ได้ไม่เกิน 0.5 mg) ห้ามจับถ้วยระเหยที่อบแล้วด้วยมือเปล่า ให้ใช้ tong หรือสวมถุงมือที่สะอาด

7.2.2 การระเหย test solution และ blank

- 7.2.2.1 กรณีทดสอบ migration ด้วยวิธี Article filling (7.1.1) และ Filling in jar/ container (7.1.2) ปริมาตรที่ใช้ระเหย 200 ml ทั้ง test solution และ blank



กรณี test solution ที่เตรียมได้มีปริมาตรน้อยกว่า 200 ml ให้นำมาใช้ทั้งหมด เทใส่ถ้วยระเหย (7.2.1) ครั้งละประมาณ 50 ml นำไประเหยบนอ่างน้ำร้อน หรือ hot plate จนหมด ล้างภาชนะบรรจุด้วยสารละลาย food simulant ชนิดเดียวกับ test solution 10 ml 2 ครั้ง เทลงในถ้วยระเหยใบเดิม ระเหยต่อไปจนเหลือประมาณ 1 ml

7.2.2.2 กรณีทดสอบ migration ด้วยวิธี Total immersion (7.1.3) ใช้ test solution และ blank ที่เตรียมได้ทั้งหมด (ปริมาตรประมาณ 100 ml) เทใส่ถ้วยระเหย ครั้งละประมาณ 50 ml นำไประเหยบนอ่างน้ำร้อน หรือ hot plate จนหมด ล้าง glass tubes ด้วยสารละลาย food simulant ชนิดเดียวกับ test solution 5 ml 2 ครั้ง เทลงในถ้วยระเหยใบเดิม ระเหยต่อไปจนเหลือประมาณ 1 ml

7.2.3 นำถ้วยระเหยไปอบในตู้อบร้อน ที่อุณหภูมิ 105-110°C เป็นเวลา 30 ± 5 min ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 1 hr ชั่งและบันทึกน้ำหนักที่ได้ ปฏิบัติตามขั้นตอนนี้ซ้ำจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่ (มีค่าความแตกต่างของน้ำหนักที่ได้ไม่เกิน 0.5 mg) เมื่อน้ำหนักของถ้วยระเหยคงที่แล้ว ให้ใช้น้ำหนักค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

8.1.1 กรณีใช้วิธี Article filling หรือ Filling in jar/container คำนวณผลดังนี้

$$\text{สารตกค้างที่เหลือจากการระเหย (mg/L)} = \frac{(W_a - W_b) \times 1000}{V}$$

เมื่อ W_a = น้ำหนักที่เหลือของสารจากการระเหย test solution หลังจากหักน้ำหนักถ้วยระเหย (g)

W_b = น้ำหนักที่เหลือของสารจากการระเหย blank หลังจากหักน้ำหนักถ้วยระเหย (g)

V = ปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ระเหย (L) เช่น 0.2 L (200 ml) หรือ 0.1 L (100 ml) เป็นต้น

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/L เป็น mg/kg โดยใช้ค่าตัวแปร 1 L เท่ากับ 1 kg



8.1.2 กรณีใช้วิธี Total immersion คำนวณผลวิเคราะห์จากสูตร

$$\text{สารตกค้างที่เหลือจากการระเหย (mg/dm}^2\text{)} = \frac{(W_a - W_b) \times 1000}{S}$$

เมื่อ W_a = น้ำหนักที่เหลือของสารจากการระเหย test solution หลังจากหักน้ำหนักถ้วยระเหย (g)
 W_b = น้ำหนักที่เหลือของสารจากการระเหย blank หลังจากหักน้ำหนักถ้วยระเหย (g)
 S = พื้นที่ผิวของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (dm^2)

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/dm^2 เป็น mg/kg โดยใช้ factor = 6

8.2 การรายงาน หน่วยเป็น mg/kg

8.2.1 รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหยในการทดสอบ migration ทั้ง 3 ครั้ง ของ food simulant ทั้ง 2 ชนิด

8.2.2 ผลการทดสอบ migration แต่ละครั้งรายงานจากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 3 ซ้ำ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทุกตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (triplicate) กรณีที่ผลการวิเคราะห์ค่าต่ำสุด ต่างจากค่าอื่นมากกว่า 6 mg/kg (analytical tolerance) ต้องทำการวิเคราะห์ตัวอย่างนั้นซ้ำ

9.2 ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหย blank ต้องน้อยกว่า 5 mg/L

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ขวดนม หมายถึง ภาชนะสำหรับใช้บรรจุนมหรือของเหลวเพื่อการบริโภคของทารกและเด็กเล็ก ซึ่งประกอบด้วย ขวด (feeding bottle) ฝาครอบ (protective cover) หัวนมยาง (feeding teat) ฝายึดหัวนมยาง (locking ring) หลอดดูด (straw) จุกหัดดูด (feeding spout) เป็นต้น

10.2 ภาชนะบรรจุนมสำหรับทารกและเด็กเล็ก หมายถึง ภาชนะที่สร้างขึ้นโดยมีเจตนาสำหรับใช้บรรจุนม หรือของเหลวอื่นเพื่อการบริโภคซึ่งมีทั้งแบบใช้ซ้ำ เช่น ถ้วยหัดดื่ม เป็นต้น และแบบใช้ครั้งเดียว เช่น ถ้วยพลาสติกที่ใช้เก็บน้ำนมมารดา และถ้วยพลาสติกบรรจุนมแบบใช้ครั้งเดียวที่ต้องใช้ร่วมกับขวดนม

10.3 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม



10.4 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 กำหนดให้

- 10.4.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี $\text{pH} \leq 4.5$ และ 50% ethanol (V/V) in aqueous solution (food simulant D1) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารนม (Annex III)
- 10.4.2 กำหนดสภาวะทดสอบ migration ที่ 70°C เป็นเวลา 2 hr สำหรับตัวอย่างซึ่งอาจต้องสัมผัสอาหารที่อุณหภูมิสูงสุด 70°C ในระยะเวลาสูงสุด 2 hr หรือที่อุณหภูมิสูงสุด 100°C ในระยะเวลาสูงสุด 15 min (Annex V Chapter 3)
- 10.4.3 กรณีตัวอย่างแบบใช้งานซ้ำ ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างนั้นๆ ซ้ำ 3 ครั้ง และพิจารณาผลการวิเคราะห์ครั้งที่ 3 เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน อย่างไรก็ตามถ้าสามารถพิสูจน์ได้ว่าผลวิเคราะห์จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 2 และ 3 ไม่เพิ่มขึ้นและถ้าผลวิเคราะห์จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 1 ไม่เกินค่ามาตรฐาน ไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบ migration อีก (Annex V Chapter 3)

10.5 ตามเอกสารอ้างอิง BS EN 1186-3:2002

“The precision data were determined for a polyamide sample under the test conditions of 24 hr at 40°C with simulants B level 10.7 mg/dm^2 , Repeatability (r) = 1.1 mg/dm^2 , Reproducibility (R) = 2.3 mg/dm^2 ”



DMSc F 1033: การวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล เอ
(Bisphenol A; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane)
ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
Determination of migrated Bisphenol A (2,2-bis
(4-hydroxyphenyl) propane) into food simulants

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ Bisphenol A ที่แพร่จากขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ลงสู่อาหารจำลอง (food simulants) ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้โดย HPLC - FLD เท่ากับ 0.04 ng (signal/noise = 3)

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 EURL-Food Contact Material ILC 2009/02 BPA in 50% ethanol; Annex I Standard Operation Procedure: Determination of Bisphenol A in 50% aqueous ethanol
- 2.2 BS EN 13130-1: 2004 Material and articles in contact with foodstuffs-Plastics substances subject to limitation-Part 1 Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants
- 2.3 Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food

3. หลักการ (Principle)

สกัด Bisphenol A จากตัวอย่างภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 hr ใช้ ethanol 50% (V/V) in aqueous solution และ acetic acid 3% (W/V) in aqueous solution เป็น food simulants วิเคราะห์ Bisphenol A ด้วย HPLC - FLD และวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน



4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่อง HPLC - FL detector
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven) หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.4 เตาไฟฟ้า (hot plate)
- 4.5 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิ เช่นเทอร์โมมิเตอร์ หรือ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)
- 4.6 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.7 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.8 ตะแกรงลวดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel gauze) อุ่นให้ร้อนก่อนใช้
- 4.9 Glass tube ชนิด ground glass stopper เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm สูง 120-200 mm ปริมาตร 125 ml
- 4.10 Volumetric flask
- 4.11 Vial สำหรับ HPLC
- 4.12 Measuring cylinder
- 4.13 Beaker
- 4.14 ขวดแก้วสีชา ground glass stopper
- 4.15 ขวดแก้วปากกว้าง พร้อมฝาปิด ใช้เพื่อบรรจุตัวอย่างทดสอบ
- 4.16 ขวดแก้วปากเกลียว (glass bottle with screw finish) หรือภาชนะแก้วประเภทอื่นที่เหมาะสม
- 4.17 เยื่อกรอง (membrane filter) pore size 0.45 μm
- 4.18 Glass beads ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm อุ่นให้ร้อนก่อนใช้
- 4.19 Glass rods ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm อุ่นให้ร้อนก่อนใช้
- 4.20 แผ่นอะลูมิเนียมเปลว (aluminium foil) หรือวัสดุทนความร้อนชนิดอื่นที่ไม่มีผลรบกวนในการวิเคราะห์

5. สารเคมี (Reagents)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) ชนิด HPLC grade หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

- 5.1 Methanol (HPLC grade)
- 5.2 Food simulants



- 5.2.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B): ละลาย acetic acid (glacial) 3g ใน H_2O 100 ml
- 5.2.2 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1): ผสม ethanol (HPLC grade) กับ H_2O ในอัตราส่วน 1:1
- 5.3 ก๊าซไนโตรเจนสำหรับระเหยตัวอย่าง
- 5.4 สารมาตรฐาน Bisphenol A; (2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane) ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99
- 5.4.1 สารละลายมาตรฐาน Bisphenol A 0.75 mg/ml : ชั่งสารมาตรฐาน Bisphenol A 75 mg ให้ละเอียดถึง 0.1 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol สารละลายมีอายุการใช้งาน 3 เดือน เมื่อเก็บในภาชนะปิดสนิท อุณหภูมิ $+20^{\circ}C$ ถึง $-20^{\circ}C$ ในที่มืด เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bisphenol A ที่ความเข้มข้นเดียวกันซ้ำอีกชุดเพื่อใช้ตรวจสอบไขว้กัน หรืออาจใช้วิธีอื่นที่เหมาะสมต่อการควบคุมคุณภาพ
- 5.4.2 สารละลายมาตรฐาน Bisphenol A 0.075 mg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Bisphenol A จาก 5.4.1 ปริมาตร 2 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 20 ml ปรับปริมาตร ด้วย methanol เตรียมซ้ำอีกครั้งที่ความเข้มข้นเดียวกันเพื่อใช้ตรวจสอบไขว้กัน
- 5.4.3 สารละลายมาตรฐาน Bisphenol A 0.0075 mg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Bisphenol A จาก 5.4.2 ปริมาตร 2 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 20 ml ปรับปริมาตร ด้วย methanol เตรียมซ้ำอีกครั้งที่ความเข้มข้นเดียวกัน เพื่อใช้ตรวจสอบไขว้กัน
- 5.4.4 working standard solution ใน food simulant B 0, 0.0018, 0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.018, 0.024 และ 0.03 mg/l ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Bisphenol A จาก 5.4.3 ปริมาตร 0, 6, 10, 20, 30, 40, 60, 80, และ 100 μ l ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย food simulant B
- 5.4.5 working standard solution ใน food simulant D1 0, 0.0018, 0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.018, 0.024 และ 0.03 mg/l ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Bisphenol A จาก 5.4.3 ปริมาตร 0, 6, 10, 20, 30, 40, 60, 80, และ 100 μ l ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย food simulant D1



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ เช่น ขวดนม หรือภาชนะบรรจุนมแบบใช้ซ้ำ ใช้ตัวอย่างทดสอบ (test specimen) จำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชิ้น เพื่อวัดปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ทดสอบ วัดปริมาตรโดยใส่ food simulant ลงในตัวอย่างจนถึงระดับสูงสุดที่กำหนดไว้เพื่อการใช้งาน (ถ้ามี) หรือที่ระดับต่ำกว่าขอบบนสุด 5 mm บันทึกปริมาตรและคำนวณค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น ml
- 6.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ เช่น ฝา และ อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.1 ฝา ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 3 ชิ้น
- 6.2.2 อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.2.1 ตัวอย่างที่มีพื้นที่ประมาณ 0.6 dm^2 ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้น ถ้ามีรูปทรงไม่สมมาตร (irregular shape) ตัดให้มีขนาดและรูปร่างที่สมมาตร จำนวนชิ้นทดสอบที่ใช้ 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และใช้ชิ้นทดสอบ 2 ชิ้น เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว คำนวณพื้นที่ผิวเฉพาะด้านที่สัมผัสอาหารของชิ้นทดสอบแต่ละชิ้น แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย พื้นที่ผิวที่ต้องการ 0.6 dm^2 วัดละเอียดถึง 0.05 dm^2
- 6.2.2.2 ตัวอย่างที่มีพื้นที่น้อยกว่า 0.6 dm^2 ใช้ชิ้นทดสอบหลายชิ้นประกอบกันเป็นชุดจำนวน 3 ชุด เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชุด เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว คำนวณพื้นที่ผิวให้ได้รวมกัน 0.6 dm^2 วัดละเอียดถึง 0.05 dm^2 คำนวณค่าเฉลี่ยของชิ้นทดสอบแต่ละชุด

หมายเหตุ วิธีคำนวณพื้นที่ผิวปฏิบัติตาม EN ISO 8442-2: 1997 annex B หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม

- 6.3 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ migration ทำความสะอาดด้วยผ้าหรือแปรงขนนุ่ม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 min ผึ่งให้แห้งในที่ ปลอดฝุ่น หรือ ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตสินค้า (ถ้ามี)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 Migration test ทำการทดสอบโดยใช้ food simulant ทั้ง 2 ชนิดแต่ละชนิดแยกกัน
- 7.1.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ ใช้วิธี Article filling ดังนี้
- 7.1.1.1 ใส่ food simulant (5.2) ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใส่ในตัวอย่างตามที่คำนวณไว้ในข้อ 6.1 และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank จุ่มอุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ (4.5) ลงใน beaker นำไปอุ่นบน hot plate หรืออุปกรณ์



ให้ความร้อนอื่นๆ จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เทใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 แต่ละตัวอย่างให้มีปริมาตรตามที่ได้คำนวณไว้ในข้อ 6.1 ± 1 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อนให้สนิท หรือใส่ขวดแก้วปากกว้าง (4.15) ปิดฝา สารละลายที่เหลือใน beaker ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน เพื่อใช้เตรียม blank

7.1.1.2 นำตัวอย่างและ blank ไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่ออุณหภูมิถึงระดับที่ต้องการ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำตัวอย่างและ blank ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เปิดสารละลาย (test solution) ออกจากตัวอย่าง และ blank ใส่ในขวดแก้วสีชา (4.14) กรองด้วยเยื่อกรอง (4.17) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

7.1.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท ฝา ใช้วิธี Filling in jar/container ดังนี้

7.1.2.1 ใส่ food simulant ลงในขวดปากเกลียว (4.16) หรือภาชนะแก้วชนิดอื่นที่สวมได้พอดีกับฝา จำนวน 4 ใบ แต่ละใบปริมาตรเท่ากับความจุของภาชนะที่จะใช้ประกอบกับฝานั้น ± 1 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อนให้สนิท นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว นำวัสดุที่ปิดไว้ออกสวมฝาที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 กับภาชนะบรรจุ food simulant แต่ละฝากับภาชนะแต่ละใบ จำนวน 3 ใบ ที่เหลือใช้เป็น blank หมุนเกลียว หรือยึดให้แน่น กรณีฝาชนิดเปิดด้านบนใช้แผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อน ปิดทับส่วนที่เปิดไว้ เพื่อกันไม่ให้สารละลายไหลออก แล้วคว่ำภาชนะบรรจุ food simulant ลงให้ตัวอย่างฝาสวมไว้อยู่ด้านล่าง และสัมผัสกับ food simulant อาจใช้ beaker รองรับเพื่อป้องกันภาชนะบรรจุ food simulant ล้ม ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่

7.1.2.2 นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำภาชนะบรรจุ food simulant ออกมา ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เปิด test solution และ blank ออกจากภาชนะบรรจุ ใส่ในขวดแก้วสีชา กรองด้วยเยื่อกรองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC



7.1.3 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท อุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ใช้วิธี Total immersion ดังนี้

7.1.3.1 ใส่ food simulant ลงใน glass tube (4.9) จำนวน 4 ใบแต่ละใบปริมาตร 100 ± 1 ml ปิดฝา นำไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว ใส่ชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.3 แต่ละชิ้นหรือแต่ละชุด ลงใน glass tube แต่ละใบ จำนวน 3 ใบ glass tube ที่เหลือใช้เป็น blank ใช้ glass bead (4.18) หรือ glass rod (4.19) รองชิ้นทดสอบไม่ให้สัมผัสผนัง tube แยกชิ้นทดสอบไม่ให้ซ้อนทับกันด้วย glass rod ชิ้นทดสอบต้องจมในสารละลายทั้งหมด ถ้ามีชิ้นทดสอบลอยขึ้นมาใช้ stainless steel gauze (4.8) กดทับ กรณีที่ใช้ food simulant B ให้ใช้ glass rod แทน ปิดฝาให้สนิท ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็ว เพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่

7.1.3.2 นำ glass tube ไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำ glass tube ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง ปิด test solution และ blank ออกจาก glass tube ใส่ในขวดแก้วสีชา กรองด้วยเยื่อกรองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สภาวะเครื่อง HPLC

column: stainless steel 150 x 3.0 mm packed with C_{18} coated spherical silica gel, particle size 5 μm , (load of 17.5 % carbon and end-capped)

mobile phase: methanol/water (70:30)

injection volume: 20 μl (maximum 200 μl)

flow rate: 0.5 ml/min

detector: fluorescence detector

excitation: 235 nm

emission: 317 nm

alternative fluorescence excitation and emission wavelengths at

excitation: 275 nm

emission: 305 nm

ปรับสภาวะการใช้งาน ให้สามารถวิเคราะห์ Bisphenol A ได้ที่ปริมาณ 0.04 ng โดยมี signal/noise = 3



7.2.2 กราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ working standard solution ใน food simulant B (5.4.4) สำหรับ test solution ที่ได้จาก food simulant B และใช้ working standard solution ใน food simulant D1 (5.4.5) สำหรับ test solution ที่ได้จาก food simulant D1 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง peak area กับ ความเข้มข้นของ Bisphenol A โดยค่า correlation coefficient (r) ต้อง ≥ 0.998

7.2.3 วิเคราะห์ Bisphenol A โดย ฉีด test solution และ blank ไม่น้อยกว่า 2 ครั้ง หรือ ระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้เข้มข้นขึ้นก่อนฉีด หรือเพิ่มปริมาตรที่ฉีดเพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์ และวัดปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน หรือคำนวณจาก regression line equation

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณผลจาก regression line equation: $y = (ax) + b$

$$\text{ความเข้มข้นของ Bisphenol A ใน food simulant (x) (mg/L)} = \frac{y - b}{a}$$

เมื่อ y = peak area ของ Bisphenol A

a = slope ของกราฟมาตรฐาน (regression line)

b = intercept ของ กราฟมาตรฐาน (regression line)

8.2 กรณีใช้วิธี Article filling หรือ Filling in jar/container คำนวณผลวิเคราะห์จาก mg/L เป็น mg/kg โดยนำค่าความหนาแน่น (density) ของ food simulants มาใช้คำนวณค่า

8.3 กรณีใช้วิธี Total immersion คำนวณผลวิเคราะห์จากสูตร

$$M = \frac{(C \times V)}{S}$$

เมื่อ M = ปริมาณ Bisphenol A (mg/dm²)

C = ปริมาณ Bisphenol A ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

V = ปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ (L ; 100 ml = 0.1L)

S = พื้นที่ผิวของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (dm²)

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/dm² เป็น mg/kg โดยใช้ factor = 6

8.4 รายงานผลวิเคราะห์ปริมาณ Bisphenol A ใน food simulant ทั้ง 2 ชนิด จากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 3 ซ้ำ หน่วยเป็น mg/kg ทศนิยม 5 ตำแหน่ง



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบความเหมาะสมการทำงานของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์
- 9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่มี retention time (RT) ตรงกับ peak ของ Bisphenol A
- 9.3 วิเคราะห์ spiked food simulants เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับความเข้มข้น $\mu\text{g/l}$ อยู่ในช่วง 60–115%

10 รายละเอียดอื่น

- 10.1 ขวดนม หมายถึง ภาชนะสำหรับใช้บรรจุนมหรือของเหลวเพื่อการบริโภคของทารกและเด็กเล็ก ซึ่งประกอบด้วย ขวด (feeding bottle) ฝาครอบ (protective cover) หัวนมยาง (feeding teat) ฝายึดหัวนมยาง (locking ring) หลอดดูด (straw) จุกหัดดูด (feeding spout) เป็นต้น
- 10.2 ภาชนะบรรจุนมสำหรับทารกและเด็กเล็ก หมายถึง ภาชนะที่สร้างขึ้นโดยมีเจตนาสำหรับใช้บรรจุนม หรือของเหลวอื่นเพื่อ การบริโภคซึ่งมีทั้งแบบใช้ซ้ำ เช่น ถ้วยหัดดื่ม และแบบใช้ครั้งเดียว เช่น ถ้วยพลาสติกที่ใช้เก็บน้ำนมมารดา และถ้วยพลาสติกบรรจุนมแบบใช้ครั้งเดียวที่ต้องใช้ร่วมกับขวดนม
- 10.3 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายหรือแพร่ของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม
- 10.4 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 กำหนดให้
 - 10.4.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี $\text{pH} \leq 4.5$ และ 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารนม (Annex III)
 - 10.4.2 กำหนดสภาวะทดสอบ migration ที่ 70°C เป็นเวลา 2 hr. สำหรับตัวอย่างซึ่งอาจต้องสัมผัสอาหาร อุณหภูมิ สูงสุด 70°C ในระยะเวลาสูงสุด 2 hr หรือที่อุณหภูมิสูงสุด 100°C ในระยะเวลาสูงสุด 15 min (Annex V Chapter 3)
 - 10.4.3 กรณีตัวอย่างแบบใช้ซ้ำนั้น ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างนั้น ซ้ำ 3 ครั้ง และพิจารณาผลการวิเคราะห์ครั้งที่ 3 เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ยกเว้นในกรณีที่มาตรฐานกำหนดต้องตรวจไม่พบ ให้พิจารณาผลการวิเคราะห์ครั้งที่ 1 เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (Annex V Chapter 2)



10.5 ข้อมูล precision การวิเคราะห์ Bisphenol A ใน 50% ethanol ตามตาราง (EURL-Food Contact Material ILC 2009/02 BPA in 50% ethanol)

Table Summary of results from the precision experiment for validation of the method

Concentration Level mg/kg	Reproducibility (R), %	Horrat R	Repeatability (r), %
0.0067	15	0.7	5
0.021	10	0.4	4
0.075	7	0.3	1.5
0.56	6	0.3	0.8



**DMSc F 1034: การวิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'- Dichlorodiphenyl sulfone
ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง**
**Determination of migrated 4, 4'- Dichlorodiphenyl
sulfone into food simulants**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'- Dichlorodiphenyl sulfone ที่แพร่จากขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ทำด้วยพลาสติกชนิด Polyethersulfone (PES) และ Polyarylsulfone (PASf) ลงสู่อาหารจำลอง (food simulants) ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ วิเคราะห์และวัดปริมาณ โดย HPLC-UV

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Korea Food and Drug Administration (KFDA). 2013. Korea Standards and Specifications for Utensils, Containers and Packaging for Food Products
- 2.2 Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food
- 2.3 BS EN 13130-1:2004 Material and articles in contact with foodstuffs-Plastics substances subject to limitation-Part 1 Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants

3. หลักการ (Principle)

สกัด 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone จากตัวอย่างภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 hr โดยมี ethanol 50% (v/v) in aqueous solution และ acetic acid 3% (w/v) in aqueous solution เป็น food simulants วิเคราะห์ 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone ด้วย HPLC-UV และวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 HPLC UV detector
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven) หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$



- 4.4 เตาไฟฟ้า (hot plate)
- 4.5 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ หรือ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)
- 4.6 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.7 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.8 ตะแกรงลวดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel gauze) อุ้มน้ำร้อนก่อนใช้
- 4.9 Glass tube ชนิด ground glass stoppers เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm สูง 120–200 mm ปริมาตร 125 ml
- 4.10 Volumetric flask
- 4.11 Vial สำหรับ HPLC
- 4.12 Measuring cylinder
- 4.13 Beaker
- 4.14 ขวดแก้วสีชา ground glass stopper
- 4.15 ขวดแก้วปากกว้าง พร้อมฝาปิด ใช้เพื่อบรรจุตัวอย่างทดสอบ
- 4.16 ขวดแก้วปากเกลียว (glass bottle with screw finish) หรือภาชนะแก้วประเภทอื่นที่เหมาะสม
- 4.17 เยื่อกรอง (membrane filter) pore size 0.45 μm
- 4.18 Glass beads ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2–3 mm อุ้มน้ำร้อนก่อนใช้
- 4.19 Glass rods ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2–3 mm อุ้มน้ำร้อนก่อนใช้
- 4.20 แผ่นอะลูมิเนียมเปลว (aluminium foil) หรือวัสดุทนความร้อนชนิดอื่น ที่ไม่มีผลรบกวนในการวิเคราะห์

5. สารเคมี (Reagents)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) ชนิด HPLC grade หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

- 5.1 Methanol (HPLC grade)
- 5.2 Food simulants
 - 5.2.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B): เจือจาง acetic acid (glacial) 3 g ใน H_2O 100 ml
 - 5.2.2 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1): ผสม ethanol (HPLC grade) กับ H_2O ในอัตราส่วน 1:1
- 5.3 สารมาตรฐาน 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99
 - 5.3.1 สารละลายมาตรฐาน 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone 100 $\mu\text{g/ml}$: ชั่งสารมาตรฐาน 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone (5.3) 10 mg ควรให้ละเอียดถึง 0.1 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol



- 5.3.2 สารละลายมาตรฐาน 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone 5 µg/ml: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone จาก 5.3.1 ปริมาตร 5 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตร ด้วย methanol
- 5.3.3 working standard solution 0.05 µg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 4,4'- Dichlorodiphenyl sulfone จาก 5.3.2 ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย methanol

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ เช่น ขวดนม หรือภาชนะบรรจุนมแบบไข้ซ้ำ ใช้ตัวอย่างทดสอบ (test specimen) จำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และ จำนวน 2 ชิ้น เพื่อวัดปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ทดสอบ
- วัดปริมาตรโดยใส่ food simulant ลงในตัวอย่างจนถึงระดับสูงสุดที่กำหนดไว้เพื่อการใช้งาน (ถ้ามี) หรือที่ระดับต่ำกว่าขอบบนสุด 5 mm บันทึกปริมาตรและคำนวณค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น ml
- 6.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ เช่น ฝา และ อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.1 ฝา ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 3 ชิ้น
- 6.2.2 อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.2.1 ตัวอย่างที่มีพื้นที่ประมาณ 0.6 dm² ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้น ถ้ามีรูปทรงไม่สมมาตร (irregular shape) ตัดให้มีขนาดและรูปร่างที่สมมาตร จำนวนชิ้นทดสอบที่ใช้ 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และใช้ชิ้นทดสอบ 2 ชิ้น เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว
- คำนวณพื้นที่ผิวเฉพาะด้านที่สัมผัสอาหารของชิ้นทดสอบแต่ละชิ้นแล้ว
คำนวณค่าเฉลี่ย พื้นที่ผิวที่ต้องการ 0.6 dm² วัดละเอียดถึง 0.05 dm²
- 6.2.2.2 ตัวอย่างที่มีพื้นที่น้อยกว่า 0.6 dm² ใช้ชิ้นทดสอบหลายชิ้นประกอบกันเป็นชุดจำนวน 3 ชุด เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชุด เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว
- คำนวณพื้นที่ผิวให้ได้รวมกัน 0.6 dm² วัดละเอียดถึง 0.05 dm² คำนวณค่าเฉลี่ยของชิ้นทดสอบแต่ละชุด
- หมายเหตุ** วิธีคำนวณพื้นที่ผิวปฏิบัติตาม EN ISO 8442-2: 1997 annex B หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม
- 6.3 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ migration ทำความสะอาดด้วยผ้าหรือแปรงขนนุ่ม ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 min แล้วผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น หรือปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตสินค้า (ถ้ามี)



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test ทำการทดสอบโดยใช้ food simulant ทั้ง 2 ชนิด แต่ละชนิดแยกกัน

7.1.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ ใช้วิธี Article filling ดังนี้

7.1.1.1 ใส่ food simulant (5.2) ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใส่ในตัวอย่างตามที่คำนวณไว้ในข้อ 6.1 และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank จุ่มอุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ (4.5) ลงใน beaker นำไปอุ่นบน hot plate หรืออุปกรณ์ให้ความร้อนอื่นๆ จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เทใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 แต่ละตัวอย่างให้มีปริมาตรตามที่ได้อ้างอิงไว้ในข้อ 6.1 ± 1 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อนให้สนิท หรือใส่ขวดแก้วปากกว้าง (4.15) ปิดฝา สารละลายที่เหลือใน beaker ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน เพื่อใช้เตรียม blank

7.1.1.2 นำตัวอย่างและ blank ไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่ออุณหภูมิถึงระดับที่ต้องการ จับเวลา 2 hr ไม่เกิน 5 min นำตัวอย่างและ blank ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เปิดสารละลาย (test solution) ออกจากตัวอย่าง และ blank ใส่ในขวดแก้วสีชา (4.14) กรองด้วยเยื่อกรอง (4.17) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

7.1.1.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างเดิม ล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและปฏิบัติตาม 7.1.1.1-7.1.1.2

7.1.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท ฝา ใช้วิธี Filling in jar/container ดังนี้

7.1.2.1 ใส่ food simulant ลงในขวดปากเกลียว (4.16) หรือภาชนะแก้วชนิดอื่นที่สวมได้พอดีกับฝา จำนวน 4 ใบ แต่ละใบปริมาตรเท่ากับความจุของภาชนะที่จะใช้ประกอบกับฝานั้น ± 1 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อนให้สนิท นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว นำวัสดุที่ปิดไว้สวมฝาที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 กับภาชนะบรรจุ food simulant แต่ละฝากับภาชนะแต่ละใบ จำนวน 3 ใบ ที่เหลือใช้เป็น blank หมุนเกลียว หรือยึดให้แน่น กรณีฝาชนิดเปิดด้านบนใช้แผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อน ปิดทับส่วนที่เปิดไว้ เพื่อกันไม่ให้สารละลายไหลออก แล้วคว่ำภาชนะบรรจุ food simulant ลงให้ตัวอย่างฝาที่สวมไว้อยู่ด้านล่าง และสัมผัสกับ food simulant อาจใช้ beaker รองรับเพื่อป้องกันภาชนะบรรจุ food simulant ล้ม ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่



- 7.1.2.2 นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำภาชนะบรรจุ food simulant ออกมา ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง ปิเปิด test solution และ blank ออกจากภาชนะบรรจุ ใส่ในขวดแก้วสีชา กรองด้วยเยื่อกรอง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
- 7.1.2.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ชั้นทดสอบเดิม ล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.2.1 – 7.1.2.2
- 7.1.3 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ประเภทอุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ใช้วิธี Total immersion ดังนี้
- 7.1.3.1 ใส่ food simulant ลงใน glass tube (4.9) จำนวน 4 ใบแต่ละใบปริมาตร 100 ± 1 ml ปิดฝา นำไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว ใส่ชั้นทดสอบ ที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.3 แต่ละชั้นหรือแต่ละชุด ลงใน glass tube แต่ละใบ จำนวน 3 ใบ glass tube ที่เหลือใช้เป็น blank ใช้ glass bead หรือ glass rod รองชั้นทดสอบไม่ให้สัมผัสผนัง tube แยกชั้นทดสอบไม่ให้ซ้อนทับกันด้วย glass rod ชั้นทดสอบต้องจมในสารละลายทั้งหมด ถ้ามีชั้นทดสอบลอยขึ้นมาใช้ stainless steel gauze กดทับ กรณีที่ใช้ food simulant B ให้ใช้ glass rod แทน ปิดฝาให้สนิท ทุกขั้นตอนควรทำการอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่
- 7.1.3.2 นำ glass tube ไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำ glass tube ออกมา ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง ปิเปิด test solution และ blank ออกจาก glass tube ใส่ในขวดแก้วสีชา กรองด้วยเยื่อกรองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
- 7.1.3.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ชั้นทดสอบเดิมล้างน้ำ ผึ่งให้แห้ง และปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.3.1 – 7.1.3.2

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สภาวะเครื่อง HPLC

column : C_{18} (4.6 mm x 250 mm, 5 μm) หรือคอลัมน์อื่นที่เทียบเท่ากัน
mobile phase : H_2O (A)/acetonitrile (B) linear gradient from A:B (70:30) to A:B (20:80) for 20 min
injection volume : 20 μl
column oven : 40°C
flow rate : 1.0 ml/min
detector : UV absorbance detector (wavelength 247 nm)



7.2.2 การวิเคราะห์คุณภาพ (Qualitative test)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน working standard solution (5.3.3) test solution และ blank (7.1) เปรียบเทียบ retention time (RT) ของสารมาตรฐานกับ test solution ถ้าตรงกันแสดงว่ามี 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone และต้องไม่พบ peak ที่ RT เดียวกันนี้ใน blank

7.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ (Quantitative test)

กรณีที่พบ 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone และมี peak area $\geq$ peak area ที่ระดับ LOQ วิเคราะห์ปริมาณ โดยสร้างกราฟมาตรฐานให้มีระดับความเข้มข้นต่ำสุด ที่ระดับ LOQ วัดปริมาณ 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone ใน test solution เทียบกับกราฟมาตรฐาน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กรณีใช้วิธี Article filling หรือ Filling in jar/container คำนวณผลวิเคราะห์ จาก mg/L เป็น mg/kg โดยนำค่าความหนาแน่น (density) ของ food simulants มาใช้คำนวณค่า

8.2 กรณีใช้วิธี Total immersion คำนวณผลวิเคราะห์จากสูตร

$$M = \frac{(C \times V)}{S}$$

เมื่อ M = ปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone (mg/dm²)

C = ปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

V = ปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ (L; 100 ml = 0.1L)

S = พื้นที่ผิวของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (dm²)

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/dm² เป็น mg/kg โดยใช้ factor = 6

8.3 การรายงาน หน่วยเป็น mg/kg ทศนิยม 3 ตำแหน่ง

8.3.1 รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'-Dichlorodiphenyl sulfone จากการทดสอบ migration ทั้ง 3 ครั้งของ food simulant ทั้ง 2 ชนิด

8.3.2 ผลการทดสอบ migration แต่ละครั้งรายงานจากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 3 ซ้ำ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจสอบความเหมาะสมการทำงานของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์

9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่มี RT ตรงกับ peak ของ 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone

9.3 วิเคราะห์ spiked food simulants เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg (ระดับค่ามาตรฐาน) อยู่ในช่วง 80-110%



10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ขวดนม หมายถึง ภาชนะสำหรับใช้บรรจุนมหรือของเหลวเพื่อการบริโภคของทารกและเด็กเล็ก ซึ่งประกอบด้วยขวด (feeding bottle) ฝาครอบ (protective cover) หัวนมยาง (feeding teat) ฝายึดหัวนมยาง (locking ring) หลอดดูด (straw) จุกหัดดูด (feeding spout) เป็นต้น
- 10.2 ภาชนะบรรจุนมสำหรับทารกและเด็กเล็ก หมายถึง ภาชนะที่ทำขึ้นโดยมีเจตนาสำหรับใช้บรรจุนม หรือของเหลวอื่นเพื่อการบริโภคซึ่งมีทั้งแบบใช้ซ้ำ เช่น ถ้วยหัดดื่ม และแบบใช้ครั้งเดียว เช่น ถ้วยพลาสติกที่ใช้เก็บน้ำนมมารดา และถ้วยพลาสติกบรรจุนมแบบใช้ครั้งเดียวที่ต้องใช้ร่วมกับขวดนม
- 10.3 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้าย หรือแพร่ของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม
- 10.4 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 กำหนดให้
 - 10.4.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี $\text{pH} \leq 4.5$ และ 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารนม (Annex III)
 - 10.4.2 กำหนดสภาวะทดสอบ migration ที่ 70°C เป็นเวลา 2 hr สำหรับตัวอย่างซึ่งอาจต้องสัมผัสอาหารที่อุณหภูมิสูงสุด 70°C ในระยะเวลาสูงสุด 2 hr หรือที่อุณหภูมิสูงสุด 100°C ในระยะเวลาสูงสุด 15 min (Annex V Chapter 3)
 - 10.4.3 กรณีตัวอย่างแบบใช้งานซ้ำ ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างนั้น ซ้ำ 3 ครั้ง และพิจารณาผลการวิเคราะห์ครั้งที่ 3 เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน อย่างไรก็ตาม ถ้าสามารถพิสูจน์ได้ว่าผลวิเคราะห์จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 2 และ 3 ไม่เพิ่มขึ้น และถ้าผลวิเคราะห์จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 1 ไม่เกินค่ามาตรฐาน ไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบ migration อีก (Annex V Chapter 2)



**DMSc F 1035: การวิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'- Dihydroxydiphenyl sulfone
ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง**
**Determination of migrated 4, 4'- Dihydroxydiphenyl
sulfone into food simulants**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ 4,4'- Dihydroxydiphenyl sulfone ที่แพร่จากขวดนม ภาชนะบรรจุนมและอุปกรณ์ต่างๆ ทำด้วยพลาสติกชนิด Polyethersulfone (PES) ลงสู่อาหารจำลอง (food simulants) ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ วิเคราะห์และวัดปริมาณโดย HPLC-UV

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Korea Food and Drug Administration (KFDA). 2013. Korea Standards and Specifications for Utensils, Containers and Packaging for Food Products
- 2.2 Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastics materials and articles intended to come into contact with food
- 2.3 BS EN 13130-1:2004 Material and articles in contact with foodstuffs-Plastics substances subject to limitation-Part 1 Guide to test methods for the specific migration of substances from plastic to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants

3. หลักการ (Principle)

สกัด 4, 4'- Dihydroxydiphenyl sulfone จากตัวอย่างภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 hr โดยมี ethanol 50% (v/v) in aqueous solution และ acetic acid 3% (w/v) in aqueous solution เป็น food simulants วิเคราะห์ 4, 4'- Dihydroxydiphenyl sulfone ด้วย HPLC-UV และวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน



4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 HPLC UV detector
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven) หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.4 เตาไฟฟ้า (hot plate)
- 4.5 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ หรือ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)
- 4.6 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.7 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.8 ตะแกรงลวดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel gauze) อุณหภูมิให้ร้อนก่อนใช้
- 4.9 Glass tube ชนิด ground glass stopper เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm สูง 120 - 200 mm ปริมาตร 125 ml
- 4.10 Volumetric flask
- 4.11 Vial สำหรับ HPLC
- 4.12 Measuring cylinder
- 4.13 Beaker
- 4.14 ขวดแก้วสีชา ground glass stopper
- 4.15 ขวดแก้วปากกว้าง พร้อมฝาปิด ใช้เพื่อบรรจุตัวอย่างทดสอบ
- 4.16 ขวดแก้วปากเกลียว (glass bottle with screw finish) หรือภาชนะแก้วประเภทอื่นที่เหมาะสม
- 4.17 เยื่อกรอง (membrane filter) pore size 0.45 μm
- 4.18 Glass beads ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm อุณหภูมิให้ร้อนก่อนใช้
- 4.19 Glass rods ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm อุณหภูมิให้ร้อนก่อนใช้
- 4.20 แผ่นอะลูมิเนียมเปลว (aluminium foil) หรือวัสดุทนความร้อนชนิดอื่น ที่ไม่มีผลรบกวนในการวิเคราะห์

5. สารเคมี (Reagents)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) ชนิด HPLC grade หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

- 5.1 Methanol (HPLC grade)
- 5.2 Food simulants



- 5.2.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B): ละลาย acetic acid (glacial) 3 g ใน H₂O 100 ml
- 5.2.2 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1): ผสม ethanol (HPLC grade) กับ H₂O ในอัตราส่วน 1:1
- 5.3 สารมาตรฐาน 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99
- 5.3.1 สารละลายมาตรฐาน 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone 1,000 µg/ml
ชั่งสารมาตรฐาน 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone(5.3) 100 mg ให้ละเอียดถึง 0.1 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
- 5.3.2 สารละลายมาตรฐาน 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone 10 µg/ml
ปิเปตสารละลายมาตรฐาน จาก 5.3.1 ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย methanol
- 5.3.3 working standard solution 0.05 µg/ml
ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone จาก 5.3.2 ปริมาตร 0.5 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย methanol

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ เช่น ขวดนม หรือภาชนะบรรจุนมแบบใช้ซ้ำ ใช้ตัวอย่างทดสอบ (test specimens) จำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชิ้น เพื่อวัดปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ทดสอบ
วัดปริมาตรโดยใส่ food simulant ลงในตัวอย่างจนถึงระดับสูงสุดที่กำหนดไว้เพื่อการใช้งาน (ถ้ามี) หรือที่ระดับต่ำกว่าขอบบนสุด 5 mm บันทึกปริมาตรและคำนวณค่าเฉลี่ยหน่วยเป็น ml
- 6.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ เช่น ฝา และ อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.1 ฝา ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 3 ชิ้น
- 6.2.2 อุปกรณ์ประกอบอื่น
- 6.2.2.1 ตัวอย่างที่มีพื้นที่ประมาณ 0.6 dm² ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้น ถ้ามีรูปทรงไม่สมมาตร (irregular shape) ตัดให้มีขนาดและรูปร่างที่สมมาตร จำนวนชิ้นทดสอบที่ใช้ 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และใช้ชิ้นทดสอบ 2 ชิ้น เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว



คำนวณพื้นที่ผิวเฉพาะด้านที่สัมผัสอาหารของชั้นทดสอบแต่ละชั้นแล้วคำนวณค่าเฉลี่ย พื้นที่ผิวที่ต้องการ 0.6 dm^2 วัดละเอียดถึง 0.05 dm^2

6.2.2.2 ตัวอย่างที่มีพื้นที่น้อยกว่า 0.6 dm^2 ใช้ชั้นทดสอบหลายชั้นประกอบกันเป็นชุดจำนวน 3 ชุด เพื่อทดสอบ migration และจำนวน 2 ชุด เพื่อคำนวณพื้นที่ผิว

คำนวณพื้นที่ผิวให้ได้รวมกัน 0.6 dm^2 วัดละเอียดถึง 0.05 dm^2

คำนวณค่าเฉลี่ยของชั้นทดสอบแต่ละชุด

หมายเหตุ วิธีคำนวณพื้นที่ผิวปฏิบัติตาม EN ISO 8442-2: 1997 annex B หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม

6.3 ตัวอย่างเพื่อทดสอบ migration ทำความสะอาดด้วยผ้าหรือแปรงขนนุ่ม แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 min ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น หรือปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตสินค้า (ถ้ามี)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test ทำการทดสอบโดยใช้ food simulant ทั้ง 2 ชนิดแต่ละชนิดแยกกัน

7.1.1 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวได้ ใช้วิธี Article filling ดังนี้

7.1.1.1 ใส่ food simulant (5.2) ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใส่ในตัวอย่างตามที่คำนวณไว้ในข้อ 6.1 และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank จุ่มอุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ (4.5) ลงใน beaker นำไปอุ่นบน hot plate หรืออุปกรณ์ให้ความร้อนอื่นๆ จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เทใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 แต่ละตัวอย่างให้มีปริมาตรตามที่ได้คำนวณไว้ในข้อ 6.1 $\pm 1 \text{ ml}$ ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อนให้สนิท หรือใส่ขวดแก้วปากกว้าง (4.15) ปิดฝา สารละลายที่เหลือใน beaker ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวหรือวัสดุทนความร้อน เพื่อใช้เตรียม blank

7.1.1.2 นำตัวอย่างและ blank ไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เมื่ออุณหภูมิถึงระดับที่ต้องการ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำตัวอย่างและ blank ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เปิดสารละลาย (test solution) ออกจากตัวอย่างและ blank ใส่ในขวดแก้วสีชา (4.14) กรองด้วยเยื่อกรอง (4.17) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC



- 7.1.1.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างเดิมล้างน้ำสะอาด ฝั่ให้แห้งและปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.1.1 - 7.1.1.2
- 7.1.2 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ ประเภท ฝา ใช้วิธี Filling in jar/container ดังนี้
- 7.1.2.1 ใส่ food simulant ลงในขวดปากเกลียว (4.16) หรือภาชนะแก้วชนิดอื่น ที่สวมได้พอดีกับฝา จำนวน 4 ใบ แต่ละใบปริมาตรเท่ากับความจุของภาชนะ ที่จะใช้ประกอบกับฝานั้น ± 1 ml ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุ ทนความร้อนให้สนิท นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว นำวัสดุที่ปิดไว้ ออกสวมฝาที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3 กับภาชนะบรรจุ food simulant แต่ละฝากับ ภาชนะแต่ละใบ จำนวน 3 ใบ ที่เหลือใช้เป็น blank หมุนเกลียว หรือยึดให้แน่น กรณีฝาชนิดเปิดด้านบนใช้แผ่นอะลูมิเนียมเปลว หรือวัสดุทนความร้อน ปิดทับส่วนที่เปิดไว้ เพื่อกันไม่ให้สารละลายไหลออก แล้วคว่ำภาชนะบรรจุ food simulant ลงให้ตัวอย่างฝาสวมไว้อยู่ด้านล่าง และสัมผัสกับ food simulant อาจใช้ beaker รองรับเพื่อป้องกันภาชนะบรรจุ food simulant ล้ม ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่
- 7.1.2.2 นำไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำภาชนะบรรจุ food simulant ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง ปิเปิด test solution และ blank ออกจากภาชนะบรรจุ ใส่ในขวดแก้วสีชา กรองด้วยเยื่อกรอง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
- 7.1.2.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ขั้นตอนทดสอบเดิมล้างน้ำสะอาด ฝั่ให้แห้ง และปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.2.1-7.1.2.2
- 7.1.3 ตัวอย่างที่บรรจุของเหลวไม่ได้ประเภทอุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ใช้วิธี Total immersion ดังนี้
- 7.1.3.1 ใส่ food simulant ลงใน glass tube (4.9) จำนวน 4 ใบแต่ละใบปริมาตร 100 ± 1 ml ปิดฝา นำไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เมื่อได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการแล้ว ใส่ขั้นตอนทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.3 แต่ละชิ้นหรือแต่ละชุด ลงใน glass tube แต่ละใบ จำนวน 3 ใบ glass tube ที่เหลือใช้เป็น blank ใช้ glass bead (4.18) หรือ glass



rod (4.19) รองขึ้นทดสอบไม่ให้สัมผัสผนัง tube แยกขึ้นทดสอบไม่ให้ซ้อนทับกันด้วย glass rod ขึ้นทดสอบต้องจมน้ำสารละลายทั้งหมด ถ้ามีขึ้นทดสอบลอยขึ้นมาใช้ stainless steel gauze (4.8) กดทับ กรณีที่ใช้ food simulant B ให้ใช้ glass rod แทน ปิดฝาให้สนิท ทุกขั้นตอนควรทำอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่

7.1.3.2 นำ glass tube ไปวางในตู้อบร้อนหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิตามเดิม เมื่ออุณหภูมิถึงระดับ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จับเวลา 2 hr ไม่ให้เกิน 5 min นำ glass tube ออกมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง เปิด test solution และ blank ออกจาก glass tube ใส่ในขวดแก้วสีชา กรองด้วยเยื่อกรองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

7.1.3.3 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ขึ้นทดสอบเดิมล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง และปฏิบัติตามขั้นตอน 7.1.3.1.-7.1.3.2

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สภาวะเครื่อง HPLC

column : C_{18} (4.6 mm I.D. x 250 mm, 5 μm) หรือคอลัมน์อื่นที่เทียบเท่ากัน

mobile phase : H_2O (A)/acetonitrile (B) linear gradient from A:B (70:30) to A:B (20:80) for 20 min

injection volume : 50 μl

column oven : 40°C

flow rate : 1.0 ml/min

detector : UV absorbance detector (ที่ความยาวคลื่น 259 nm.)

7.2.2 การวิเคราะห์คุณภาพ (Qualitative test) ฉีดสารละลายมาตรฐาน working standard solution (5.3.3) test solution และ blank (7.1) เปรียบเทียบ retention time (RT) ของสารมาตรฐานกับ test solution ถ้าตรงกันแสดงว่ามี 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone และต้องไม่พบ peak ที่ RT เดียวกันนี้ใน blank

7.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ (Quantitative test) กรณีที่พบ 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone และมี peak area $\geq$ peak area ที่ระดับ LOQ วิเคราะห์ปริมาณโดยสร้างกราฟมาตรฐานให้มีระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ระดับ LOQ วัดปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ใน test solution เทียบกับกราฟมาตรฐาน



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กรณีใช้วิธี Article filling หรือ Filling in jar/container คำนวณผลวิเคราะห์ จาก mg/l เป็น mg/kg โดยนำค่าความหนาแน่น (density) ของ food simulants มาใช้คำนวณค่า

8.2 กรณีใช้วิธี Total immersion คำนวณผลดังนี้

$$M = \frac{(C \times V)}{S}$$

เมื่อ M = ปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone (mg/dm²)

C = ปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

V = ปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ (L; 100 ml = 0.1L)

S = พื้นที่ผิวของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (dm²)

คำนวณผลวิเคราะห์จากหน่วย mg/dm² เป็น mg/kg โดยใช้ factor = 6

8.3 การรายงานผล หน่วยเป็น mg/kg ทศนิยม 3 ตำแหน่ง

8.3.1 รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone จากการทดสอบ migration ทั้ง 3 ครั้งของ food simulant ทั้ง 2 ชนิด

8.3.2 ผลการทดสอบ migration แต่ละครั้งรายงานจากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 3 ซ้ำ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจสอบความเหมาะสมการทำงานของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์

9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่ RT ตรงกับ peak ของ 4, 4'-Dihydroxydiphenyl sulfone

9.3 วิเคราะห์ spiked food simulants เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg (ระดับค่ามาตรฐาน) อยู่ในช่วง 80-110%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ขวดนม หมายถึง ภาชนะสำหรับใช้บรรจุนมหรือของเหลวเพื่อการบริโภคของทารกและเด็กเล็ก ซึ่งประกอบด้วย ขวด (feeding bottle) ฝาครอบ (protective cover) หัวนมยาง (feeding teat) ฝายึดหัวนมยาง (locking ring) หลอดดูด (straw) จุกหัดดูด (feeding spout) เป็นต้น



- 10.2 ภาชนะบรรจุสำหรับทารกและเด็กเล็ก หมายถึง ภาชนะที่ทำขึ้นโดยมีเจตนาสำหรับใช้บรรจุนม หรือของเหลวอื่นเพื่อการบริโภคซึ่งมีทั้งแบบใช้ซ้ำ เช่น ถ้วยหัดดื่ม เป็นต้น และแบบใช้ครั้งเดียว เช่น ถูพลาสติกที่ใช้เก็บน้ำนมมารดา และถูพลาสติกบรรจุนมแบบใช้ครั้งเดียวที่ต้องใช้ร่วมกับขวดนม
- 10.3 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม
- 10.4 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 กำหนดให้
- 10.4.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี $\text{pH} \leq 4.5$ และ 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารนม (Annex III)
- 10.4.2 กำหนดสภาวะทดสอบ migration ที่ 70°C เป็นเวลา 2 hr สำหรับตัวอย่างซึ่งอาจต้องสัมผัสอาหารที่อุณหภูมิสูงสุด 70°C ในระยะเวลาสูงสุด 2 hr หรือที่อุณหภูมิสูงสุด 100°C ในระยะเวลาสูงสุด 15 นาที (Annex V Chapter 3)
- 10.4.3 กรณีตัวอย่างแบบใช้งานซ้ำ ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างนั้น ซ้ำ 3 ครั้ง และพิจารณาผลการวิเคราะห์ครั้งที่ 3 เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน อย่างไรก็ตามถ้าสามารถพิสูจน์ได้ว่าผลวิเคราะห์จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 2 และ 3 ไม่เพิ่มขึ้น และถ้าผลวิเคราะห์จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 1 ไม่เกินค่ามาตรฐาน ไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบ migration อีก (Annex V Chapter 2)



**DMSc F 1036 : การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)
ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง**
**Determination of migrated formaldehyde from rubber
products**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ formaldehyde ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ และยางสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 1 mg/dm^3

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Japan External Trade Organization. II Standards and Testing Methods for Implements, Containers and Packaging, Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents 2008, JETRO Overseas Research Department, P. 103, 117, 125-126.
- 2.2 Japan External Trade Organization. Specification and Standards for Foods, Food Additives, etc. Under the Food Sanitation Act (Abstracts) 2008, JETRO Overseas Research Department, P. 128, 131-132.
- 2.3 ISO 14184-1: 1998(E). Textiles- Determination of formaldehyde- Part 1: Free and hydrolyzed formaldehyde (water extraction method), Annex A. 1st edition 1998-12-15.

3. หลักการ (Principle)

สกัด formaldehyde จากตัวอย่างด้วย H_2O ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 hr formaldehyde ใน H_2O ทำปฏิกิริยากับ acetyl acetone ได้ dimethyl pyridine นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 413 nm วัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน



4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 อ่างน้ำร้อน (water bath) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 4.4 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.5 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.6 Volumetric flask
- 4.7 ปิเปตแบบปรับปริมาตรได้ (adjustable pipette)
- 4.8 Glass tube ชนิด ground glass stopper ขนาด 20 ml
- 4.9 Burette ที่มีความละเอียด 0.1 ml
- 4.10 Flask ชนิด ground glass stopper

5. สารเคมี (Reagents)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) หรือน้ำกลั่นที่เทียบเท่ากัน

- 5.1 Ammonium acetate
- 5.2 Acetic acid (glacial)
- 5.3 Acetylacetone reagent (Nash reagent) : ชั่ง ammonium acetate 150 g ละลาย H_2O เดิม acetic acid (5.2) 3 ml และ acetylacetone 2 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย H_2O เก็บในขวดสีชา
- 5.4 Sulfuric acid 0.01 mol/L สอบเทียบความเข้มข้นแล้ว (standardized)
- 5.5 Thymolphthaline indicator 10 g/L : ชั่ง thymolphthaline 10 g ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วย ethanol
- 5.6 Sodium sulfite 1 mol/L : ชั่ง anhydrous sodium sulfite 126 g ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วย H_2O
- 5.7 สารมาตรฐาน (Standards)
 - 5.7.1 สารละลายมาตรฐาน formaldehyde เข้มข้น (stock solution) ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg/L : ปิเปตสารละลาย formaldehyde (ความเข้มข้นร้อยละ 37-40) 0.25 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O (ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน) สอบเทียบความเข้มข้น (standardized) ของสารละลายมาตรฐาน formaldehyde ดังนี้



5.7.1.1 ปิเปตสารละลาย sodium sulfite (5.6) ปริมาตร 50 ml ลงใน flask หยด thymolphthaline indicator 2 หยด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า หยด sulfuric acid (5.4) 2-3 หยด จนกระทั่งสีฟ้าจางหายไป

5.7.1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน formaldehyde เข้มข้น (stock solution) ปริมาตร 10 ml ลงใน flask เดิมจะได้สารละลายสีฟ้ากลับมา ไตเตรทด้วย sulfuric acid จนแสดงถึงจุดยุติ (สีฟ้าจางหายไป) บันทึกปริมาตรของ sulfuric acid ที่ใช้ คำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน formaldehyde ตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้น (mg/l)} = \frac{0.6 \times A \times 1000}{B}$$

A = ปริมาตรของ sulfuric acid ที่ใช้ไตเตรท (ml)

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน formaldehyde (ml)

หมายเหตุ sulfuric acid 0.01 mol/L ปริมาตร 1 ml ทำปฏิกิริยาพอดีกับ formaldehyde 0.6 mg กรณีที่ความเข้มข้นของ sulfuric acid ต่างออกไป ต้องนำความเข้มข้นค่าจริงมาใช้คำนวณ

5.7.2 สารละลายมาตรฐาน formaldehyde 100 mg/l : ปิเปตสารละลายมาตรฐาน formaldehyde เข้มข้น (5.7.1) (ปริมาตรได้จากการคำนวณโดยอิงกับค่าความเข้มข้นที่ standardized แล้ว) ลงใน volumetric flask ขนาด 20 ml ปรับปริมาตรด้วย H₂O คำนวณปริมาตรสารละลายมาตรฐาน formaldehyde ที่ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาตร (ml)} = \frac{100 \text{ (mg/l)} \times 20 \text{ (ml)}}{C_{\text{for}} \text{ (mg/l)}}$$

C_{for} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน formaldehyde จากการ Standardized

5.7.3 working standard solution ความเข้มข้น 0.0, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50 และ 4.00 mg/l : ปิเปตสารละลายมาตรฐาน formaldehyde (5.7.2) ปริมาตร 0.0, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625, 0.750, 0.875 และ 1.000 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย H₂O



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ตัวอย่างห้วนมยาง ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้นเป็นชิ้นทดสอบ (test specimens) ตัวอย่างประเภทอื่นตัดเป็นชิ้นให้มีน้ำหนัก ประมาณ 2-5 g จำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration ล้างด้วยน้ำ กรดify ยางธรรมชาติที่มีสารเคลือบ ล้างด้วยสารละลาย detergent ตามด้วยน้ำจนสะอาด วางให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test

7.1.1 ชั่งชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ให้ละเอียดถึง 0.0001 g ลงใน flask ใส่ H_2O ตามอัตราส่วน 20 ml: 1 g ปิดฝา นำไปวางในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ $40 \pm 2^\circ C$ เป็นเวลา 24 hr คีบตัวอย่างออก สารละลายที่เหลือใน flask วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ใช้เป็น test solution

7.1.2 เตรียม blank โดยเปิด H_2O ลงใน flask ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ทดสอบตัวอย่าง แล้วปฏิบัติตาม 7.1.1 โดยไม่มีตัวอย่าง

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 เปิดสารละลายมาตรฐาน (5.7.3) 5 ml ลงใน glass tube ใส่ acetylacetone reagent (5.3) 5 ml ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน

7.2.2 แช่ในอ่างน้ำเดือด 10 นาที นำออกมาวางไว้ให้เย็น วัด absorbance (Abs) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 413 nm

7.2.3 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Abs กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน formaldehyde ค่า $R^2 \geq 0.995$

7.2.4 วิเคราะห์ blank และ test solution โดยปฏิบัติตาม 7.2.1-7.2.2 วัดปริมาณ formaldehyde เทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.2.5 กรณีที่ปริมาณ formaldehyde สูงกว่ากราฟมาตรฐานให้เจือจาง test solution ด้วย H_2O แล้วปฏิบัติตาม 7.2.1 - 7.2.2 จนสามารถวัดได้ในช่วงกราฟมาตรฐาน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณ formaldehyde (mg/L) จากสูตร

$$M = (a-b) \times F$$

เมื่อ

$$M = \text{ปริมาณ formaldehyde ใน test solution (mg/L)}$$

$$a = \text{ความเข้มข้นของ formaldehyde ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)}$$

$$b = \text{ความเข้มข้นของ formaldehyde ใน blank (mg/L)}$$

$$F = \text{dilution factor (ถ้ามี)}$$

8.2 รายงานผลวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำหน่วยเป็น mg/L หรือ mg/dm^3 ทศนิยม 1 ตำแหน่ง



9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ spiked blank เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/L อยู่ในช่วง 80-110%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม

10.2 ตามเอกสารอ้างอิง JETRO 2008 กำหนดให้ใช้น้ำเป็นสารละลายในการทดสอบ migration



DMSc F 1037: การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสีที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
Determination of migrated Zinc from rubber products

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณสังกะสี (Zinc, Zn) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ และยางสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ วิเคราะห์และวัดปริมาณโดย Atomic absorption spectrometer ชนิด Flame (Flame AAS) มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection) เท่ากับ 0.1 mg/dm^3

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 Japan External Trade Organization, II. Standards and Testing Methods for Implements, Containers and Packaging, Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents 2008, JETRO Overseas Research Department, P. 125–126.
- 2.2 Japan External Trade Organization, Specification and Standards for Foods, Food Additives, etc. Under the Food Sanitation Act (Abstracts) 2008, JETRO Overseas Research Department, P.131.

3. หลักการ (Principle)

สกัด Zn จากตัวอย่างด้วย H_2O ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 hr วิเคราะห์ด้วย flame AAS และวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 เครื่อง Flame AAS พร้อม Zn hollow cathode lamp หรือ lamp ชนิดอื่นที่เหมาะสม
- 4.2 อ่างน้ำร้อน (water bath) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $40 \pm 2^\circ\text{C}$
- 4.3 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.4 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.5 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.6 Volumetric flask



4.7 ปิเปตแบบปรับปริมาตรได้ (adjustable pipette)

4.8 Glass tube ชนิด ground glass stopper

4.9 Flask ชนิด ground glass stopper

5. สารเคมี (Reagent)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) หรือน้ำกลั่นที่เทียบเท่ากัน

5.1 Acetic acid (glacial)

5.2 Nitric acid (HNO_3) เข้มข้น, 65%

5.3 1% HNO_3 : ละลาย HNO_3 เข้มข้น ปริมาตร 1 ml ใน H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.4 สารมาตรฐาน (Standards)

5.4.1 สารละลายมาตรฐาน Zn 1,000mg/l

5.4.2 สารละลายมาตรฐาน Zn 100 mg/l ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Zn (5.4.1) ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย 1% HNO_3

5.4.3 working standard solution ความเข้มข้น 0.0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 และ 0.70 mg/L : ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Zn (5.4.2) ปริมาตร 0.0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 และ 0.70 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 1% HNO_3

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ตัวอย่างห้วนมยางใช้ตัวอย่างทั้งชิ้นเป็นชิ้นทดสอบ (test specimens) ตัวอย่างประเภทอื่นตัดให้มีน้ำหนักประมาณ 2-5 g จำนวน 3 ชิ้นเพื่อทดสอบ migration ล้างด้วยน้ำสะอาด กรณียางธรรมชาติที่มีการเคลือบสารกันติด ล้างด้วยสารละลาย detergent ตามด้วยน้ำจนสะอาด วางให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test

7.1.1 ชั่งชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 6 ให้ละเอียดถึง 0.0001 g ลงใน flask ใส่ H_2O ตามอัตราส่วน 20 ml:1g ปิดฝา นำไปวางในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ $40 \pm 2^\circ C$ เป็นเวลา 24 hr คีบตัวอย่างออก สารละลายที่เหลือใน flask ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น test solution

7.1.2 เตรียม blank โดยปิเปต H_2O ลงใน flask ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ทดสอบตัวอย่าง แล้วปฏิบัติตาม 7.1.1 โดยไม่มีตัวอย่าง



7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 วิเคราะห์และวัดปริมาณด้วย flame AAS ที่ความยาวคลื่น 213.9 nm

7.2.2 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Abs กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Zn (5.4.3) ค่า $r \geq 0.995$

7.2.3 ปิเปต test solution ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 20 ml เติม HNO_3 (5.2) ปริมาตร 0.2 ml ปรับปริมาตรเป็น 20 ml ด้วย test solution เขย่าให้เข้ากัน

7.2.4 ปิเปต blank ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 20 ml เติม HNO_3 (5.2) ปริมาตร 0.2 ml ปรับปริมาตรเป็น 20 ml ด้วย blank เขย่าให้เข้ากัน

7.2.5 วิเคราะห์ blank และ test solution ด้วยเครื่องมือตาม 7.2.1 วัดปริมาณ Zn เทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.2.6 กรณีที่ปริมาณ Zn สูงกว่ากราฟมาตรฐานให้เจือจาง test solution ด้วย H_2O ก่อนวิเคราะห์ด้วย flame AAS จนสามารถวัดได้ในช่วงกราฟมาตรฐาน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณ Zn จากสูตร

$$M = (a-b) \times F$$

เมื่อ M = ปริมาณ Zn ใน test solution (mg/L หรือ mg/dm^3)

a = ความเข้มข้นของ Zn ใน test solution ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

b = ความเข้มข้นของ Zn ใน blank ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/L)

F = dilution factor (ถ้ามี)

8.2 รายงานผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำหน่วยเป็น mg/L หรือ mg/dm^3 ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ก่อนใช้งานตรวจสอบเครื่องมือโดยทำ sensitivity check ใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตามที่กำหนดในคู่มือการใช้เครื่อง AAS

9.2 ควรตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อวัดตัวอย่างไปแล้วทุกๆ 10-12 ตัวอย่าง และหลังสิ้นสุดการวัด ค่าที่เบี่ยงเบนต้องไม่เกิน 5 %

9.3 วิเคราะห์ spiked blank เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับความเข้มข้น 2 mg/L (ค่ามาตรฐาน) ต้องอยู่ในช่วง 80-110 %



10. รายละเอียดอื่น

10.1 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม

10.2 ตามเอกสารอ้างอิง JETRO 2008 กำหนดให้ใช้น้ำเป็นสารละลายในการทดสอบ migration



DMSc F 1038 : การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากหัวนมยาง

Determination of the release of N-Nitrosamines and N-Nitrosatable substances from rubber nipples

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากหัวนมยางประเภทใช้กับขวดนมและใช้ดูดเล่นทั้งยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์ ลงสู่ น้ำลายเทียม (artificial saliva) ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ วัดปริมาณด้วย Gas chromatograph - thermal energy detector (GC-TEA) ที่ระดับ $\mu\text{g/kg}$

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

EN 12868: 1999 Child use and care articles-Methods for determining the release of N-Nitrosamines and N-Nitrosatable substances from elastomer or rubber teats and soothers

3. หลักการ (Principle)

สกัด N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances จากหัวนมยางภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 hr ด้วย nitrite- containing artificial saliva salt solution แบ่งสารละลายที่ได้เป็น solution A และ solution B แยก solution A ไปวิเคราะห์ N-Nitrosamines ส่วน solution B ทำปฏิกิริยากับกรดเพื่อเปลี่ยน N-Nitrosatable substances เป็น N-Nitrosamines สารละลายที่ได้ทำให้เข้มข้นขึ้น นำไปวิเคราะห์ N-Nitrosamines โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ซึ่งมี chemiluminescence detector (Thermal Energy Analyzer: TEA) หรือ detector อื่นที่มีความเหมาะสมและได้รับการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว (validated analytical technique) ปริมาณที่สามารถวิเคราะห์ได้ระดับ $\mu\text{g/kg}$

4. เครื่องมือ (Apparatus)

เครื่องแก้วล้างด้วยสารละลายกรด ล้างด้วย ammonia solution และ H_2O แล้วอบให้แห้ง

4.1 เครื่อง GC -TEA กรณีใช้ detector อื่น ต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ก่อนนำมาใช้ สภาวะของเครื่องมือต้องสามารถแยกสาร N-Nitrosamines



ตามที่กำหนดในมาตรฐานได้ โดยใช้ internal standard และต้องสามารถแยก N-Nitrosodiethylamine กับ N-Nitrosodiethylamine ออกจากกันได้

- 4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 40°C หรือ 60°C
- 4.4 อุปกรณ์ Kuderna-Danish (K-D) evaporator หรืออุปกรณ์อื่นสำหรับระเหยสารละลายได้เท่าเทียมกัน
- 4.5 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.6 กรวยแยก (separating funnel) ขนาด 200 ml และ 100 ml
- 4.7 ใยแก้ว (glass wool) ล้างด้วย dichloromethane ก่อนใช้
- 4.8 คอลัมน์แก้ว (glass column) จุกปิดและปรับอัตราการไหล (outlet and stopper) ทำด้วย PTFE ความยาว 300 mm, id 15 mm และชนิดความยาว 300 mm, id 26 mm
- 4.9 Sintered glass ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางพอดีกับคอลัมน์แก้ว
- 4.10 Vial สำหรับวิเคราะห์ด้วย GC หรือ ampoule พร้อมฝาปิด ชนิด PTFE-coted พร้อมอุปกรณ์ปิดผนึก
- 4.11 ขวดแก้วสี่ขาชนิด ground glass stopper
- 4.12 Flask ชนิด ground glass stopper ขนาด 25 และ 50 ml
- 4.13 Beaker
- 4.14 Glass rod
- 4.15 Measuring cylinder ชนิด ground glass stopper

5. สารเคมี (Reagent)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่นสารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) ชนิด HPLC grade หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

- 5.1 Sodium hydrogen carbonate
- 5.2 Sodium chloride
- 5.3 Potassium carbonate
- 5.4 Sodium nitrile (อายุการใช้งานประมาณ 2 ปี)
- 5.5 HCl 0.1 mol/L และ 1.0 mol/L
- 5.6 NaOH 0.1 mol/L และ 1.0 mol/L
- 5.7 Artificial saliva salt solution : ละลาย sodium hydrogen carbonate 4.2 g, sodium chloride 0.5 g, potassium carbonate 0.2 g และ sodium nitrite 30 mg ใน H_2O และเจือจางด้วย H_2O เป็น 900 ml ปรับ pH เป็น 9.0 ด้วย HCl 0.1 mol/L หรือ NaOH 0.1 mol/L ที่ละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O



- 5.8 Dichloromethane กลั่นในภาชนะแก้ว หรือที่มีคุณสมบัติเทียบเท่ากัน ตรวจสอบการปนเปื้อนของ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ก่อนใช้
- 5.9 n-hexane
- 5.10 ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์
- 5.11 Anti-bumping granules
- 5.12 Acetone
- 5.13 Anhydrous sodium sulfate ชนิดผง (granular) หรือ Whatman phase separating filter ที่เหมาะสม : ชั่ง anhydrous sodium sulfate 30 g ล้างด้วย dichloromethane 25 ml อบให้แห้ง
- 5.14 Ammonia solution 0.1 mol/L
- 5.15 Silica gel (kieselguhr) surface $1 \text{ m}^2/\text{g}$, pore size 3,000 nm – 8500 nm, particle size 150 μm – 650 μm : อบที่ 200°C เป็นเวลา 1 hr ทำให้เย็น ล้างด้วย dichloromethane อบให้แห้ง (อาจใช้สารอื่นได้ เมื่อทดสอบแล้วว่าเหมาะสม)
- 5.16 ททราย (sand, acid washed and calcined)
- 5.17 สารมาตรฐาน (standards)
- 5.17.1 สารละลายมาตรฐาน N-Nitrosamines
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน N-Nitrosamines เข้มข้นจากสารมาตรฐานบริสุทธิ์ใน n-hexane ให้มีความเข้มข้นในช่วง 100–300 ng/ml หรือใช้สารละลายมาตรฐานเตรียมสำเร็จ (certified solutions) ประกอบด้วย N-Nitrosamines ดังต่อไปนี้
- N-nitrosodimethylamine (NDMA);
 - N-nitrosodiethylamine (NDEA);
 - N-nitrosodipropylamine (NDPA);
 - N-nitrosodibutylamine (NDBA);
 - N-nitrosopiperidine (NPIP);
 - N-nitrosopyrrolidine (NPYR);
 - N-nitrosomorpholine (NMOR);
 - N-nitrosodibenzylamine (NDBzA);
 - N-nitrosodiisononylamine (NDiNA), i.e. N-nitroso 3,5,5-trimethylhexylamine;
 - N-nitroso N-methyl N - phenylamine (NMPPhA);
 - N-nitroso N-ethyl N - phenylamine (NEPhA)



อย่างไรก็ตาม ชนิดของ N-Nitrosamines ไม่ได้จำกัดเพียงแค่นี้ กรณีที่พบ N-Nitrosamines อื่น ควรนำมาวิเคราะห์และหาปริมาณด้วย

- 5.17.2 สารละลาย Internal standard N-nitrosodiisopropylamine (NDiPA) 200 ng/ml: ซึ่งสารมาตรฐานบริสุทธิ์ NDiPA ละลายใน acetone หรือตัวทำละลายอื่นที่เหมาะสม หรือใช้สารละลายมาตรฐาน certified solutions นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

หมายเหตุ N-nitrosamines ถูกทำลายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ในการวิเคราะห์ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสทั้งแสงอาทิตย์และแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างควรหุ้มด้วยแผ่นเปลวอลูมิเนียมหรือเก็บในภาชนะป้องกันแสงเก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 5°C

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ใช้เฉพาะส่วนที่ทำด้วยยางเท่านั้น นำส่วนประกอบซึ่งไม่ใช่ยางออกไป ใช้ตัวอย่างทั้งชิ้นเป็นชิ้นทดสอบ (test specimens) ซึ่งชิ้นทดสอบให้น้ำหนักประมาณ 40 g ถ้าตัวอย่างมีจำนวนไม่มาก น้ำหนักที่ใช้ต้องไม่ต่ำกว่า 10 g
- 6.2 ต้ม H₂O ใน beaker ให้เดือด ใส่ชิ้นทดสอบลงไป ต้มเป็นเวลา 10 min ใช้คีมคีบชิ้นทดสอบออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 6.3 ตัดชิ้นทดสอบแต่ละชิ้นเป็น 2 ส่วนตามแนวตั้ง วางไว้ให้แห้ง ในที่ปลอดฝุ่น

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test

- 7.1.1 ชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ (6.3) น้ำหนัก 10 g ให้ละเอียดถึง 0.1 g ลงใน flask ขนาด 50 ml ทุกตัวอย่าง เตรียม 2 ซ้ำ (duplicate) ปิเปตสารละลาย artificial saliva salt (5.7) ปริมาตร 40 ml ลงใน flask ปิดฝา เขย่าเบาๆ ให้สารละลายท่วมชิ้นทดสอบ นำไปวางในตู้อบร้อน ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 hr (ไม่เกิน 30 min) กรณีที่น้ำหนักของชิ้นทดสอบเกิน 10 g เพิ่มปริมาตรสารละลาย สารเคมี และภาชนะที่ใช้ตามอัตราส่วน

- 7.1.2 รินสารละลายออกจาก flask ลงใน measuring cylinder จนหมด ล้างชิ้นทดสอบด้วยสารละลาย artificial saliva salt ปริมาตร 4 ml และเก็บสารละลายที่ใช้ล้างรวมกันใน measuring cylinder เดิม ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย H₂O ปิดฝา ผสมให้เข้ากัน



7.1.3 บีบสารละลายที่ได้ (7.1.2) ปริมาตร 10 ml ใส่ flask ขนาด 25 ml ปิดฝา เก็บแยกไว้เป็น solution B ส่วนที่เหลือเก็บไว้เป็น solution A

7.2 การวิเคราะห์ N-Nitrosamines จาก solution A

7.2.1 การสกัด N-Nitrosamines

บีบสารละลาย internal standard (5.17.2) ปริมาตร 1 ml และ NaOH 1 mol/L (5.6) ปริมาตร 1 ml ลงใน measuring cylinder ที่เก็บ solution A

หมายเหตุ ในขั้นตอนการทำ clean-up solution A สามารถใช้ Method A หรือ Method B ก็ได้

Method A

- A.1 เตรียม silica gel คอลัมน์ : ใส่ silica gel ที่เตรียมไว้ (5.15) น้ำหนัก 25 g ลงในคอลัมน์แก้วขนาด id 26 mm (4.8) รองด้านล่างด้วยใยแก้ว (4.7) ปิดด้านบนด้วย sintered glass (4.9) หรือใส่ทราย (5.16) ลึกประมาณ 1 cm ขณะที่เติม silica gel ให้เคาะเบาๆ เพื่อให้ silica gel บรรจุลงในคอลัมน์สม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน
- A.2 นำ solution A ที่เตรียมไว้ (7.2.1) เขย่าเบาๆ ให้ผสมกันก่อนเทลงใน silica gel คอลัมน์ช้าๆ ให้สารละลายซึมลงสู่ silica gel ภายในเวลา 10–15 min จะเหลือส่วน silica gel แห้งอยู่ด้านล่างระยะประมาณ 50–70 mm
- A.3 เติม dichloromethane 60–80 ml ลงในคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ลงสู่ K-D flask หรือภาชนะที่จะใช้ระเหยในขั้นต่อไป ให้ได้ประมาณ 40 ml ภายในเวลา 15–25 min ระหว่างทำการ elute ด้วย dichloromethane ระยะขอบของ silica gel ที่แห้งอาจลดลงเหลือ 15–30 mm เนื่องจากความแตกต่างระหว่างส่วนที่เป็น H₂O กับส่วนของ dichloromethane ระวังไม่ให้ส่วนที่แห้งหายไปไม่เช่นนั้น สารละลายที่ได้ จะมี H₂O รวมอยู่ด้วย

Method B

- B.1 นำ solution A ที่เตรียมไว้ (7.2.1) มาเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน ก่อนเทใส่ในกรวยแยกขนาด 200 ml
- B.2 เติม dichloromethane 20 ml เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 1 min ทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรณีที่สารละลายแยกได้ยากให้ ใช้วิธี centrifuge ปลอยของเหลวชั้นล่างให้ไหลผ่าน anhydrous sodium sulfate ที่เตรียมไว้ (5.13) ลงสู่ K-D flask หรือภาชนะที่จะใช้ระเหยในขั้นต่อไป
- B.3 ทำซ้ำตามข้อ B.2 อีก 2 ครั้ง ล้าง anhydrous sodium sulfate ด้วย dichloromethane 25 ml และเก็บ สารละลายที่ได้ทั้งหมดรวมกันใน K-D flask ใบเดิม หรือภาชนะที่ใช้ใบเดิม



7.2.2 การทำให้เข้มข้น

7.2.2.1 ใส่ n-hexane 2 ml ลงในสารละลายที่สกัดได้ จาก Method A หรือ Method B ใส่ anti-bumping 2-3 ชิ้น ต่อกับอากาศกับ K-D flask ระเหยให้เหลือปริมาตร 4-6 ml ที่อุณหภูมิเริ่มต้น $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ แล้วค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิเป็น $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ในอัตราเร็ว $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ระวังอย่าให้สารละลายระเหยไปหมด กรณีที่ใช้เครื่องระเหยสุญญากาศต้องควบคุมความดันและอุณหภูมิ อย่าใช้สารละลายระเหยอย่างรวดเร็วหรือระเหยไปหมด เพราะจะทำให้สูญเสียสารที่ต้องการไปได้ ล้างอุปกรณ์ ที่ใช้ระเหยด้วย dichloromethane ปริมาตรประมาณ 2 ml เก็บรวมกับสารละลายที่เหลือจากการระเหย

7.2.2.2 นำสารละลายที่เหลือจากการระเหยไป เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเบาๆ (ระวังสารละลายกระฉอก และไม่ควรระเหยมากเกินไปจนเกือบหมด) ให้เหลือ 1 ml ถ่ายสารละลายใส่ vial (4.10) ทำการวิเคราะห์ภายใน 1 hr หรือภายใน 1 วัน กรณีที่ต้องเก็บไว้ ให้เก็บในที่มืดอุณหภูมิไม่เกิน 5°C

7.2.3 การวิเคราะห์และวัดปริมาณ N-nitrosamines

7.2.3.1 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-TEA สภาวะเครื่องมือที่ใช้ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ฉีด GC ต้องเท่ากัน เปรียบเทียบ retention time (RT) ของ N-nitrosamines จากสารละลายตัวอย่างกับสารมาตรฐาน ถ้าตรงกัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยคำนวณเทียบกับสารมาตรฐาน N-Nitrosamines กรณีที่ใช้ detector อื่นให้ปรับสภาวะเครื่องมือที่ใช้ให้เหมาะสมตามที่ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไว้ ตั้งสภาวะเครื่อง GC ตามสภาวะที่ 1 หรือ 2 หรือตามความเหมาะสม

สภาวะที่ 1	Packed columns
Injector temp:	200°C .
Oven temp:	200°C .
Column:	1. 2.5-3.0 m glass, external diameter 1/8" packed with: 15% Carbowax 20 W, TPA on Chromsorb WHP 100/120 mesh หรือ 10% Carbowax 20 W, 2% KOH on Chromsorb WHP 100/120 mesh



2. 4.0–5.0 m glass, external diameter 1/8” packed with 15% SP 1200, 1% H₃PO₄ on Chromsorb WAW 100/120 mesh.

Pyrolyzer temp: 480°C.
Carrier gas: Argon, helium or nitrogen at a flow rate of approximately 20 ml/min.
Coupling: direct between GC column and pyrolysis oven, or using an interface heated at 250°C.

สภาวะเครื่อง GC ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ alkyl phenyl N-nitrosamines:

Injector temp: 150°C.
Oven temp: approximately (120–130°C)
Column: 2.0 m glass, external diameter 1/4”, internal diameter 2.0 mm, pack with: 10% OV-101 on Chromsorb WHP 80/100 mesh หรือ 3% OV-225 on Chromsorb WHP 80/100 mesh
Pyrolyzer temp: 480°C.
Interface temp: 250°C.

สภาวะที่ 2 Capillary columns

Injector temp: 200°C
Oven temp: 60°C, 230°C (10°C/min).
Column: 25.0 m fused silica 0.53 mm FFAP 1 µm
Pyrolyzer temp: 480°C.
Interface temp: 250°C.
หรือ
Injector temp: 50°C 1 min, 200°C (75°C/min).
Over temp: 40°C 7 min, 60°C (1°C/min), 230°C (14°C/min).
Column: 30.0 m fused silica 0.53 mm SE-54 film 2 µm.
Pyrolyzer temp: 480°C.
Interface temp: 250°C.



7.3 การวิเคราะห์ N-nitrosatable substances จาก solution B ในรูป N-Nitrosamines

7.3.1 การสกัด N-Nitrosamines

7.3.1.1 ปิเปต HCl 1 mol/l (5.5) ปริมาตร 1 ml ลงใน solution B ที่เก็บไว้ (7.1.3) เขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน สารละลายมี pH ประมาณ 1.4 วางไว้ในที่มืด 30 min

7.3.1.2 ปิเปต NaOH 1 mol/l (5.6) ปริมาตร 2 ml ลงใน solution B เพื่อให้มีสภาพเป็นด่าง และสารละลายมาตรฐาน internal standard ปริมาตร 1 ml

หมายเหตุ ในขั้นตอนการทำ clean-up solution B สามารถใช้ Method C หรือ Method D ก็ได้

Method C

C.1 เตรียม silica gel คอลัมน์ : ใส่ silica gel ที่เตรียมไว้ (5.15) น้ำหนัก 8 g ลงในคอลัมน์ แก้วขนาด id 15 mm (4.8) รองด้านล่างด้วยใยแก้ว (4.7) ปิดด้านบนด้วย sintered glass (4.9) หรือใส่ทราย (5.16) ลึกประมาณ 1 cm ขณะที่เติม silica gel ให้เคาะเบาๆ เพื่อให้ silica gel บรรจุลงในคอลัมน์สม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน

C.2 นำ solution B ที่เติมกรด-ด่างไว้แล้ว (7.3.1.2) มาเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน ก่อนเทลงใน silica gel คอลัมน์ช้าๆ ให้สารละลายซึมลงสู่ silica gel ภายในเวลา 10-15 min จะเหลือส่วน silica gel แห้งอยู่ด้านล่างระยะประมาณ 50-70 mm

C.3 เติม dichloromethane 25-30 ml ลงในคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ ลงสู่ K-D flask หรือภาชนะที่ใช้ระเหยในขั้นตอนต่อไป ให้ได้ประมาณ 15 ml ภายในเวลา 15 - 25 min ระหว่างทำการ elute ด้วย dichloromethane ระยะขอบของ silica gel ที่แห้งอาจลดลงเหลือ 15-30 mm เนื่องจากความแตกต่างระหว่างส่วนที่เป็น H_2O กับส่วนของ dichloromethane ระวังไม่ให้ส่วนที่แห้งหายไปไม่เช่นนั้นสารละลายที่ได้จะมี H_2O รวมอยู่ด้วย

Method D

D.1 นำ solution B ที่เติมกรด-ด่างไว้แล้ว (7.3.1.2) มาเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน ก่อนเทใส่ในกรวยแยกขนาด 100 ml

D.2 เติม dichloromethane 10 ml เขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 1 min ทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรณีที่สารละลายแยกได้ยากให้ใช้วิธี centrifuge ปลอยของเหลวชั้นล่างให้ไหลผ่าน anhydrous sodium sulfate ที่เตรียมไว้ลงสู่ K-D flask หรือภาชนะที่ใช้ระเหยในขั้นตอนต่อไป

D.3 ทำซ้ำตามข้อ D.2 อีก 2 ครั้ง ล้าง anhydrous sodium sulfate ด้วย dichloromethane 10 ml และเก็บสารละลายที่ได้ทั้งหมดรวมกันใน K-D flask โบเดิมหรือภาชนะที่ใช้โบดีม



7.3.2 การทำให้เข้มข้น

ใส่ n-hexane 2 ml ลงในสารละลายที่สกัดได้ จาก Method C หรือ Method D ใส่ anti-bumping 2-3 ชิ้น ทำการระเหยสารละลายโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 7.2.2

7.3.3 การวิเคราะห์ N-nitrosatable substances ในรูป N-Nitrosamines ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ N-Nitrosamines ในข้อ 7.2.3

7.4 วิเคราะห์ blank โดยใช้สารละลาย artificial saliva salt ที่ไม่มีตัวอย่างปฏิบัติตามขั้นตอนเดียวกันกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณปริมาณ N-nitrosamine ใน solution A

$$M (\mu\text{g/kg}) = \frac{5 F \cdot A_{NA}}{4 A_{NDiPA}^R} \quad (1)$$

เมื่อ M = ปริมาณของ N-nitrosamine ที่แพร่จากตัวอย่างลงสู่สารละลาย artificial saliva salt เทียบอัตราส่วนกับปริมาณ internal standard (NDiPA) แล้ว

F = Factor จาก (2)

A_{NA} = Peak area ของสาร N-nitrosamine ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ solution A

A_{NDiPA}^R = Peak area ของ internal standard (NDiPA) ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ solution A

$$F = \frac{V \cdot C \cdot A_{NDiPA}^1 \cdot V_{NASTD}}{G \cdot A_{NASTD} \cdot V_{NDiPA}^1} \quad (2)$$

เมื่อ V = ปริมาตรของ internal standard (NDiPA) ที่เติม (ml)

C = ความเข้มข้นของ N-nitrosamine แต่ละชนิดในสารละลายมาตรฐาน ($\mu\text{g/l}$)

G = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

A_{NASTD} = Peak area ของ N-nitrosamine แต่ละชนิดในสารมาตรฐาน

A_{NDiPA}^1 = Peak area ของ internal standard (NDiPA) ที่ฉีด

V_{NASTD} = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน N-nitrosamine ที่ฉีด GC (μl)

V_{NDiPA}^1 = ปริมาตรของ internal standard (NDiPA) ที่ฉีด GC (μl)



คำนวณปริมาณ N-nitrosamines ทั้งหมดโดยการนำปริมาณ N-nitrosamine แต่ละชนิดที่ตรวจพบมารวมกัน กรณีที่เครื่องมืออ่านค่าสารได้น้อยกว่า 3 เท่าของ background noise ให้คิดเป็น “Not detected” หรือ “ND” และคิดค่าเป็น 0

8.2 การคำนวณปริมาณ N-nitrosatable substances ใน solution B ในรูป N-nitrosamine จากสูตร

$$N = \frac{5 F \cdot A_{NA}}{A_{NDiPA}^R} \quad (3)$$

เมื่อ N = ปริมาณของ N-nitrosamine ที่แพร่จากตัวอย่างลงสู่สารละลาย artificial saliva salt เทียบ อัตราส่วนกับปริมาณ internal standard (NDiPA) แล้ว ($\mu\text{g/kg}$)

F = Factor จาก (2)

A_{NA} = Peak area ของ N-nitrosamine ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ solution B

A_{NDiPA}^R = Peak area ของ internal standard (NDiPA) ที่อ่านได้จากการวิเคราะห์ solution B

คำนวณปริมาณ N-nitrosatable substances แต่ละชนิด หลังจากหักลบด้วย N-nitrosamine ที่มีอยู่เดิมจาก solution A ออกไป แล้วคำนวณปริมาณ N-nitrosatable substances ทั้งหมดโดยนำปริมาณ N-nitrosatable substances แต่ละชนิดที่ตรวจพบมารวมกัน กรณีที่เครื่องมืออ่านค่าสารได้น้อยกว่า 3 เท่าของ background noise ให้คิดเป็น “Not detected” หรือ “ND” และคิดค่าเป็น 0

8.3 การปรับค่าผลวิเคราะห์ (analytical correction) ในกรณีที่ต้องการเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานค่าที่คำนวณได้จากข้อ 8.1 และ 8.2 ต้องปรับค่าโดยลบค่า analytical correction ออกไป

Analytical correction ของ N-nitrosamines = 0.01 mg/kg

Analytical correction ของ N-nitrosatable substances = 0.1 mg/kg

หมายเหตุ จากการทดสอบ precision ในการทำ method specified เฉพาะวิธีนี้ และจากการทำ inter laboratory พบว่าจำเป็นต้องใช้ค่า analytical correction มาปรับค่าผลวิเคราะห์ด้วย

ตัวอย่างการปรับค่าผลวิเคราะห์

ผลวิเคราะห์พบ N-nitrosamines = 0.018 mg/kg

ค่า analytical correction = 0.010 mg/kg

ผลวิเคราะห์ที่ปรับค่าแล้ว = 0.018 - 0.010 = 0.008 mg/kg



8.4 การรายงาน

รายงานชนิด ปริมาณแต่ละชนิด ปริมาณรวมของ N-nitrosamines และ N-nitrosatable substances ที่พบในหน่วย mg/kg ทศนิยม 3 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 กรณีที่ปริมาณรวมของ N-nitrosamines เท่ากับหรือมากกว่าค่ากำหนดตามมาตรฐาน หรือกฎหมายที่เกี่ยวข้อง ทำการทดสอบเพื่อยืนยันความถูกต้อง โดยวิธีใดวิธีหนึ่ง ดังนี้

9.1.1 นำสารละลายที่เหลือจากการวิเคราะห์ โดยวิธี GC มาผ่าน (expose) รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm เป็นเวลา 3 hr พร้อมกับสารละลายมาตรฐานแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC peak ของ N-nitrosamine ที่เคยปรากฏจะหายไปหรือลดลง เนื่องจากการสลายตัวของสารถ้า peak ของตัวอย่างไม่ลดลงภายหลังได้รับรังสี UV แสดงว่า peak นั้นไม่ใช่ N-nitrosamine จึงไม่จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ เพื่อวัดปริมาณ ในขั้นต่อไป

9.1.2 วิเคราะห์ยืนยัน โดยใช้ GC Column ที่แตกต่างกันออกไปอย่างน้อยอีก 1 ชนิด

9.1.3 ตรวจยืนยัน โดยวิธี mass spectrometry

หลังการทดสอบยืนยัน หากพบว่ามี peak ที่ไม่ใช่ N-nitrosamine ชนิดใดชนิดหนึ่ง ต้องคำนวณปริมาณ N-nitrosamines ทั้งหมดใหม่ โดยไม่รวมค่าเดิมที่ยืนยันแล้วว่า ไม่ใช่ N-nitrosamine

9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่มี RT ตรงกับ peak ของ N-nitrosamines

9.3 วิเคราะห์ spiked artificial saliva salt เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับ ความเข้มข้น 0.01 mg/kg (ระดับค่ามาตรฐาน) อยู่ในช่วง 60-115%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิด การเคลื่อนย้าย หรือแพร่ของสาร ออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบภายใต้ สภาพะที่มีควบคุม

10.2 สถานที่ทำการวิเคราะห์ ต้องป้องกันแสง หรือรังสี UV ไม่ให้สัมผัสสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างได้และปราศจากสารระเหย N-Nitrosamines ในบรรยากาศ



DMSc F 1039 : การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในห้วนมยางสังเคราะห์
Determination of volatile compounds content in synthetic rubbers

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ สารที่ระเหยได้ (volatile compounds) ในห้วนมยางสังเคราะห์ เช่น ยาง silicone ที่ระดับมากกว่าหรือ เท่ากับ 0.01% w/w

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

EN 14350-2: 2004 Child use and care articles – Drinking equipment – Part 2: Chemical requirements and tests

3. หลักการ (Principle)

อบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 200°C เป็นเวลา 4 hr แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของสารที่ระเหยได้ ในเนื้อยาง

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ และ $200 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- 4.3 โถดูดความชื้น (desiccator) พร้อมสารดูดความชื้น calcium chloride หรือ silica gel
- 4.4 ถ้วยระเหย (dish) ทนความร้อนได้สูงกว่า 200°C
- 4.5 ถูมือผ้าหรือพลาสติก สำหรับจับตัวอย่าง
- 4.6 ภาชนะทนความร้อนใช้ต้มตัวอย่าง

5. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ใช้เฉพาะส่วนที่ทำด้วยยางสังเคราะห์เท่านั้น นำส่วนประกอบที่ไม่ใช่ยางออกไป ต้มขึ้นทดสอบ (test specimen) ในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 min โดยไม่ให้ส่วนของตัวอย่างสัมผัสกับภาชนะ เพื่อชะสารเคลือบผิวที่ใช้ในขบวนการผลิต และให้เกิดความมั่นใจว่าวัสดุที่ใช้ทำมีความคงตัวได้ในน้ำเดือดเมื่อครบเวลานำชิ้นทดสอบออกมาผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น



6. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 6.1 อบถ้วยระเหย (4.4) ในตู้อบร้อน ที่อุณหภูมิ $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 hr (อบครั้งที่ 1) ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (4.3) เป็นเวลา 1 hr ชั่งน้ำหนักและบันทึก (Wa)
- 6.2 นำชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ (5) ใส่ถ้วยระเหย (6.1) ซึ่งให้น้ำหนักของตัวอย่างประมาณ 10 g และบันทึกค่าที่ชั่งได้ (Ws) นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 hr (อบครั้งที่ 2) ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 hr ชั่งน้ำหนักและบันทึกค่า (Wb)
- 6.3 นำไปอบซ้ำ ที่อุณหภูมิ $200 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 4 hr (อบครั้งที่ 3) ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 hr ชั่งน้ำหนักและบันทึกค่า (Wc)

7. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

7.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารที่ระเหยได้ (\% w/w)} = \frac{(Wb - Wc) \times 100}{(Ws - Wa)}$$

- เมื่อ
- Wa = น้ำหนักถ้วยระเหยที่ผ่านการอบครั้งที่ 1 (g)
 - Wb = น้ำหนักถ้วยระเหยพร้อมตัวอย่างที่ผ่านการอบครั้งที่ 2 (g)
 - Wc = น้ำหนักถ้วยระเหยพร้อมตัวอย่างที่ผ่านการอบครั้งที่ 3 (g)
 - Ws = น้ำหนักถ้วยระเหยและตัวอย่าง (g)

7.2 การรายงาน

รายงานปริมาณสารที่ระเหยได้จากค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น % ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

8. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

9. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่าความแตกต่างสัมพัทธ์ (Relative percent difference; RPD) ต้องไม่เกิน 20%



**DMSc F 1040 : การวิเคราะห์ปริมาณ 2- Mercaptobenzothiazole (MBT)
ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber
Determination of migrated 2- Mercaptobenzothiazole
(MBT) from vulcanised rubber products**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ 2- Mercaptobenzothiazole (MBT) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber เช่นยางธรรมชาติ ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ วิเคราะห์และวัดปริมาณ โดย HPLC-UV มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.1 mg/L

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 EN 14350 – 2: 2004 Child use and care articles – Drinking equipment – Part 2 : Chemical requirements and tests
- 2.2 Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food

3. หลักการ (Principle)

สกัด MBT ซึ่งเป็น vulcanising agents และ metal-salts ของ MBT จากตัวอย่างภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 hr โดยมี ethanol 50% (v/v) in aqueous solution และ acetic acid 3% (w/v) in aqueous solution เป็น food simulants สกัดเพื่อแยก MBT จาก aqueous solution ด้วย dichloromethane เติร์ยมให้สะอาดและเข้มข้นขึ้น แล้ววิเคราะห์ ด้วย HPLC-UV วัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 HPLC UV detector
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 ตู้บร๊วร้อน (hot air oven) หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.4 เตาไฟฟ้า (hot plate)
- 4.5 เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator)
- 4.6 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ หรือ เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)



- 4.7 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.8 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.9 Flask ชนิด ground glass stopper
- 4.10 Volumetric flask
- 4.11 Vial สำหรับ HPLC
- 4.12 Measuring cylinder
- 4.13 Beaker
- 4.14 กรวยแยก (separating funnel)
- 4.15 เยื่อกรอง (membrane filter) pore size 0.45 μm

5. สารเคมี (Reagents)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) ชนิด HPLC grade หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

- 5.1 Acetonitrile (HPLC grade)
- 5.2 Dichloromethane (Residue analysis grade)
- 5.3 Anhydrous sodium sulfate
- 5.4 Food stimulants
 - 5.4.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B): ละลาย acetic acid (glacial) 3 g ใน H_2O 100 ml
 - 5.4.2 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1): ผสม ethanol (HPLC grade) กับ H_2O ในอัตราส่วน 1:1
- 5.5 สารมาตรฐาน 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98
 - 5.5.1 working standard solution ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 $\mu\text{g/ml}$ เตรียม working standard solution จากสารมาตรฐาน MBT (5.5) ละลายใน acetonitrile

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ใช้เฉพาะส่วนที่ทำด้วยยางเท่านั้น นำส่วนประกอบที่ไม่ใช่ยางออกไป
 - 6.1.1 ห้วนมยาง จำนวนตัวอย่าง (test specimen) เพื่อทดสอบ migration 2 ชิ้นและเพื่อคำนวณพื้นที่ผิว 2 ชิ้น คำนวณพื้นที่ผิวทั้ง 2 ด้าน (นอก-ใน) ให้ได้ประมาณ 1 dm^2 ถ้าตัวอย่างทั้งชิ้นมีพื้นที่น้อยกว่า 1 dm^2 ส่วนที่ขาดให้ตัดห้วนมยางชิ้นอื่นนำมาคำนวณพื้นที่รวมกัน วิธีคำนวณพื้นที่ ตัดชิ้นทดสอบเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม วางทาบบนตารางกระดาษ (millimetre paper) นับจำนวนตาราง และคำนวณกลับเป็นพื้นที่รวมพื้นที่ทั้ง 2 ด้าน หรืออาจใช้วิธีอื่นที่เหมาะสมและเทียบเท่า



- 6.1.2 ผลิตภัณฑ์อื่น เตรียมให้มีขนาดพื้นที่ประมาณ 1 dm^2 (รวมทั้ง 2 ด้าน) จำนวนชั้นทดสอบเพื่อทดสอบ migration 2 ชุด และเพื่อคำนวณพื้นที่ผิว 2 ชุด วิธีคำนวณพื้นที่ปฏิบัติตาม 6.1.1
- 6.2 ใส่ H_2O ใน beaker ต้มให้เดือด นำตัวอย่างที่ใช้เพื่อทดสอบ migration ใส่ลงไป ต้มเป็นเวลา 10 min ใช้คีมคีบตัวอย่างออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 6.3 ตัวอย่างห้วนมยาง ตัดแบ่งเป็น 2 ส่วนตามแนวตั้ง ตัวอย่างอื่นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อใส่ใน flask ขนาด 250 ml แล้ววางไว้ให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 Migration test ทำการทดสอบโดยใช้ food simulant ทั้ง 2 ชนิด แต่ละชนิดแยกกัน
- 7.1.1 ชั่งชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.3 ให้ละเอียดถึง 0.0001 g ลงใน flask ใส่สารละลาย food stimulants (5.4) ในอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร 1 cm^2 : 2 ml ปิดฝา นำไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $40 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 hr คีบชิ้นทดสอบออก สารละลายที่เหลือใน flask วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น test solution
- 7.1.2 นำ test solution มาเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน ก่อนเทลงในกรวยแยก ใส่ dichloromethane 50 ml เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 min ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ปล่อยของเหลวชั้นล่าง (dichloromethane) ให้ไหลผ่าน anhydrous sodium sulfate (5.3) ลงสู่ภาชนะที่ใช้ระเหย
- 7.1.3 ทำซ้ำตามข้อ 7.1.2 อีกครั้ง ล้าง anhydrous sodium sulfate ด้วย dichloromethane เก็บสารละลายที่ได้ทั้งหมดรวมกันในภาชนะที่ใช้ระเหย
- 7.1.4 ระเหยสารละลายที่ได้อย่างระมัดระวังจนเกือบแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ถ่ายใส่ volumetric flask ล้างและปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย acetonitrile กรองด้วยเยื่อกรองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ ในขั้นตอนการการสกัด และทำให้เข้มข้น อาจใช้ concentration column ที่เหมาะสมแทนการสกัดด้วย dichloromethane

- 7.1.5 เตรียม blank โดยเปิดสารละลาย food stimulants ลงใน flask ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ทดสอบตัวอย่าง แล้วปฏิบัติตาม 7.1.1-7.1.4 โดยไม่มีตัวอย่าง
- 7.2 การวิเคราะห์
- 7.2.1 สภาวะเครื่อง HPLC
- column: stainless steel 250 x 4.6 mm packed with reversed phase C_8 (e.g. Spherisorb C_8), particle size 5 μm
- mobile phase: Elute A : 1% acetonitrile ใน H_2O และ Elute B : acetonitrile



gradient programme

Time (min)	% Elute A	% Elute B
0 to 2	70	30
2 to 17 linearly to	10	90
17 to 22	10	90
22 to 25 linearly to	70	30
25 to 28 or longer	70	30

injection volume: 20 µl

flow rate: 1 ml/min

detector: UV 320, Diode array spectrum from 240–360 nm, Detector programming from time 5 min to 12 min

ปรับสภาวะเครื่องมือให้เหมาะสมกับชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณ MBT ได้ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด (detection limit) 0.1 mg/L

7.2.2 กราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมกราฟมาตรฐานโดยฉีด working standard solution ในข้อ 5.5.1 ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของ peak area กับความเข้มข้นของ MBT โดยค่า correlation coefficient (r) ต้อง ≥ 0.997

7.2.3 ฉีดสารละลายตัวอย่าง และ blank วิเคราะห์และหาปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.3 การตรวจยืนยัน

ยืนยัน MBT ที่ตรวจพบใน test solution ด้วย UV-spectrum ที่ได้จากการวัดด้วย diode array detector เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณ MBT จากสูตร

$$M = \frac{C \times V}{W}$$

- เมื่อ
- M = ปริมาณ MBT ในตัวอย่าง (µg/g)
 - C = ความเข้มข้นของ MBT ในสารละลายตัวอย่าง (µg/ml)
 - V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างสุดท้ายที่ได้ (5 ml)
 - W = น้ำหนักชิ้นทดสอบ (test specimen) (g)



8.2 รายงานผล หน่วยเป็น mg/kg ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

8.2.1 รายงานผลวิเคราะห์ปริมาณ MBT ในตัวอย่างจากการทดสอบ migration โดย food simulant ทั้ง 2 ชนิด

8.2.2 ผลการทดสอบ migration รายงานจากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 2 ซ้ำ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจสอบความเหมาะสมการทำงานของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์

9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่ retention time (RT) ตรงกับ peak ของ MBT

9.3 วิเคราะห์ spiked food simulants เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ที่ระดับความเข้มข้น 8 mg/kg (ระดับค่ามาตรฐาน) อยู่ในช่วง 80 – 110%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกมาจากตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม

10.2 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 (Annex III) กำหนดให้ 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี pH ≤ 4.5 และ 50% ethanol (V/V) in aqueous solution (food simulant D1) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารนม

10.3 ข้อมูล collaborative laboratory (n=7) แสดง repeatability และ reproducibility ตามเอกสารอ้างอิง

Average repeatability (r) = 3.0 และ CV_r = 10.4%

Average reproducibility (R) = 7.4 และ CV_R = 23.4%



DMSc F 1041 : การวิเคราะห์ปริมาณ 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) และ 2,2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber
Determination of migrated 2,6-Bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) and 2,2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethylethyl) -4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) from vulcanised rubber products

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณ Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber เช่น ยางธรรมชาติ ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ วิเคราะห์และวัดปริมาณ โดย HPLC-UV มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.1 mg/L

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 EN 14350-2: 2004 Child use and care articles-Drinking equipment-Part 2: Chemical requirements and tests
- 2.2 Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food

3. หลักการ (Principle)

สกัด Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 จากตัวอย่างภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 hr โดยมี ethanol 50% (v/v) in aqueous solution และ acetic acid 3% (w/v) in aqueous solution เป็น food simulants สกัดเพื่อแยก Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 จาก aqueous solution ด้วย dichloromethane เตรียมให้สะอาดและเข้มข้นขึ้น แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC-UV วัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน



4. เครื่องมือ (Apparatus)

- 4.1 HPLC UV detector
- 4.2 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven) หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4.4 เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator)
- 4.5 อุปกรณ์สำหรับตัดตัวอย่าง เช่น กรรไกร มีด คัตเตอร์ เป็นต้น
- 4.6 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้วรทัดหรือ vernier ที่มีความละเอียด 0.1 mm
- 4.7 Flask ชนิด ground glass stopper
- 4.8 Volumetric flask
- 4.9 Vial สำหรับ HPLC
- 4.10 Measuring cylinder
- 4.11 Beaker
- 4.12 กรวยแยก (separating funnel)
- 4.13 เยื่อกรอง (membrane filter) pore size 0.45 μm

5. สารเคมี (Reagents)

หากไม่ได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade และ H_2O ที่ใช้เป็นน้ำกรอง (deionized) ชนิด HPLC grade หรือน้ำกลั่นที่มีคุณภาพเทียบเท่ากัน

- 5.1 Acetonitrile (HPLC grade)
- 5.2 Dichloromethane (Residue analysis grade)
- 5.3 Anhydrous sodium sulphate
- 5.4 Food stimulants
 - 5.4.1 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B): ละลาย acetic acid (glacial) 3 g ใน H_2O 100 ml
 - 5.4.2 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1): ผสม ethanol (HPLC grade) กับ H_2O ในอัตราส่วน 1:1
- 5.5 สารมาตรฐาน Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98
 - 5.5.1 working standard solution Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 ความเข้มข้น 6 และ 3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ: เตรียม working standard solution จากสารมาตรฐาน Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 (5.5) ละลายใน acetonitrile



6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ใช้เฉพาะส่วนที่ทำด้วยยางเท่านั้น นำส่วนประกอบที่ไม่ใช่ยางออกไป

6.1.1 ห้วนมยาง จำนวนตัวอย่าง (test specimen) เพื่อทดสอบ migration 2 ชั้น และเพื่อคำนวณพื้นที่ผิว 2 ชั้น คำนวณพื้นที่ผิวทั้ง 2 ด้าน (นอก-ใน) ให้ได้ประมาณ 1 dm^2 ถ้าตัวอย่างทั้งชิ้นมีพื้นที่น้อยกว่า 1 dm^2 ส่วนที่ขาดให้ตัดห้วนมยางชิ้นอื่นนำมาคำนวณพื้นที่รวมกัน วิธีคำนวณพื้นที่ ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม วางทาบบนตารางกระดาษ (millimetre paper) นับจำนวนตาราง และคำนวณกลับเป็นพื้นที่รวมพื้นที่ทั้ง 2 ด้าน หรืออาจใช้วิธีอื่นที่เหมาะสมและเทียบเท่า

6.1.2 ผลิตภัณฑ์อื่น เตรียมให้มีขนาดพื้นที่ประมาณ 1 dm^2 (รวมทั้ง 2 ด้าน) จำนวนชิ้นทดสอบเพื่อทดสอบ migration 2 ชุด และเพื่อคำนวณพื้นที่ผิว 2 ชุด วิธีคำนวณพื้นที่ปฏิบัติตาม 6.1.1

6.2 ใส่ H_2O ใน beaker ต้มให้เดือด นำตัวอย่างที่ใช้เพื่อทดสอบ migration ใส่ลงไป ต้มเป็นเวลา 10 min ใช้คีมคีบตัวอย่างออกมา วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.3 ตัวอย่างห้วนมยาง ตัดแบ่งเป็น 2 ส่วนตามแนวตั้ง ตัวอย่างอื่นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อใส่ใน flask ขนาด 250 ml แล้ววางไว้ให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 Migration test ทำการทดสอบโดยใช้ food simulant ทั้ง 2 ชนิด แต่ละชนิดแยกกัน

7.1.1 ชั่งชิ้นทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 6.3 ให้ละเอียดถึง 0.0001 g ลงใน flask ใส่สารละลาย food stimulants (5.4) ในอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร $1 \text{ cm}^2: 2 \text{ ml}$ ปิดฝา นำไปวางในตู้อบร้อน หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $40 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 hr คีบชิ้นทดสอบออก สารละลายที่เหลือนใน flask วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น test solution

7.1.2 นำ test solution มาเขย่าเบาๆ ให้ผสมกันก่อนเทใส่ในกรวยแยก ใส่ dichloromethane 50 ml เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 min ทิ้งไว้ให้แยกชั้น ปล่อยของเหลวชั้นล่าง (dichloromethane) ให้ไหลผ่าน anhydrous sodium sulfate (5.3) ลงสู่ภาชนะที่ใช้ระเหย

7.1.3 ทำซ้ำตามข้อ 7.1.2 อีกครั้ง ล้าง anhydrous sodium sulfate ด้วย dichloromethane เก็บสารละลายที่ได้ทั้งหมดรวมกันในภาชนะที่ใช้ระเหย

7.1.4 ระเหยสารละลายที่ได้อย่างระมัดระวังจนเกือบแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ถ่ายใส่ volumetric flask ล้างและปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย acetonitrile กรองด้วยเยื่อกรองก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ ในขั้นตอนการการสกัด และทำให้เข้มข้น อาจใช้ concentration column ที่เหมาะสมแทนการสกัดด้วย dichloromethane



7.1.5 เตรียม blank โดยปิเปตสารละลาย food stimulant ลงใน flask ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ทดสอบตัวอย่าง และปฏิบัติตาม 7.1.1-7.1.4 โดยไม่มีตัวอย่าง

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สภาวะเครื่อง HPLC

column: stainless steel 250 x 4.6 mm packed with reversed phase C₈ (e.g. Spherisorb C₈), particle size 5 µm

mobile phase: Elute A : 1% acetonitrile in H₂O และ Elute B : acetonitrile

gradient programme

Time (min)	% Elute A	% Elute B
0 to 2	70	30
2 to 17 linearly to	10	90
17 to 22	10	90
22 to 25 linearly to	70	30
25 to 28 or longer	70	30

injection volume: 20 µl

flow rate: 1 ml/min

detector : UV 280, Diode array spectrum from 240-360 nm, Detector programming from time 12 min to time 25 min

กรณีใช้คอลัมน์ชนิดอื่น ปรับสภาวะการใช้งานให้เหมาะสมกับชนิดของคอลัมน์ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 ได้ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (detection limit) 0.1 mg/L

7.2.2 จัด working standard solution ในข้อ 5.5.1 ระดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยของ peak area

7.2.3 จัดสารละลายตัวอย่างและ blank เปรียบเทียบ retention time (RT) กับสารมาตรฐาน กรณีตรวจพบ antioxidants RT ต้องอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน เตรียมกราฟมาตรฐานโดยฉีด working standard solution ที่มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 5 ระดับ สร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่าง peak area กับ ความเข้มข้นของ antioxidant โดยค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.997 และหาปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.3 การตรวจยืนยัน

ยืนยัน antioxidants ที่ตรวจพบใน test solution ด้วย UV-spectrum จากการวัดด้วย diode array detector เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) หรือ gas liquid chromatography (GLC)



8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณ Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246 จากสูตร

$$M = \frac{2 (C \times V)}{A}$$

- เมื่อ M = ปริมาณ Antioxidant ในตัวอย่าง ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)
 C = ความเข้มข้นของ antioxidant ในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
 V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (5 ml)
 A = พื้นที่ผิวซึ่งทดสอบ (test specimens) ที่ใช้ (dm^2)

8.2 รายงานผล หน่วยเป็น mg/dm^2 ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

- 8.2.1 รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณ antioxidants จากการทดสอบ migration โดย food simulant ทั้ง 2 ชนิด
 8.2.2 ผลการทดสอบ migration รายงานจากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 2 ซ้ำ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบความเหมาะสมการทำงานของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์
 9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่ RT ตรงกับ peak ของ Antioxidant BHT และ Antioxidant 2246
 9.3 วิเคราะห์ spiked food simulant เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์เกณฑ์ % recovery Antioxidant BHT ที่ระดับความเข้มข้น $60 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ หรือ $30 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ (ระดับค่ามาตรฐาน) และ Antioxidant 2246 ที่ระดับความเข้มข้น $30 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ หรือ $15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ (ระดับค่ามาตรฐาน) อยู่ในช่วง 80 – 110%

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 การทดสอบ migration (migration test) หมายถึง การดำเนินการเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารออกจาก ตัวอย่างลงสู่สารละลายที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนอาหารที่จะใช้บรรจุ (อาหารจำลอง, food simulants) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม
 10.2 ตามเอกสารอ้างอิง Commission regulation (EU) No 10/2011 (Annex III) กำหนดให้ 3% acetic acid (w/v) in aqueous solution (food simulant B) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารที่มี $\text{pH} \leq 4.5$ และ 50% ethanol (v/v) in aqueous solution (food simulant D1) เป็นอาหารจำลองตัวแทนอาหารนม

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. นายปรีชา จิ่งสมานกุล | ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) |
| 2. นายทงพันธ์ สัจจปาละ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 3. นางลดาพรรณ แสงคล้าย | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางสาวอรุรัตน์ วุฒิกรภักดิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 6. นางอัชฌา สัจจปาละ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 7. นางลดาวัลย์ จิ่งสมานกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 8. นางสาวอรุณี ศรีพรหม | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 9. นางสาวมณฑนา พันธุ์บัวหลวง | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 10. นายสมภพ วัฒนมณี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 11. นางสาวกรรณา ตีรสมิทธิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 12. นางปิยมาศ แจ่มศรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |



นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. อาหาร หมายถึงอาหารที่คนสามารถบริโภคได้ และให้หมายความรวมถึงเครื่องดื่ม ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ
2. น้ำ หมายถึงน้ำสำหรับอุปโภคและบริโภค 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
EAPC	estimated aerobic plate count
TNTC	too numerous to count
H ₂ S	hydrogen sulphide

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 2009	อาหาร	ยีสต์และรา	I	121
DMSc F 2010	อาหาร	<i>Vibrio cholerae</i>	I	131
DMSc F 2011	อาหาร	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	I	147
DMSc F 2012	อาหาร	MPN <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	I	163
DMSc F 2013	อาหาร	จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมด	I	179
DMSc F 2014	น้ำและน้ำแข็ง	จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมด	I	187



**DMSc F 2009 : วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหาร โดยวิธี pour plate
และ spread plate**
**Analytical method of yeasts and molds in food
by pour plate and spread plate**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหาร ครอบคลุมการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001, Chapter 18
“Yeasts, Molds and Mycotoxins”. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 25 กรกฎาคม 2557]. เข้าถึงได้ที่
http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm_071435.htm.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

ยีสต์และราส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligate aerobes) เจริญได้ที่อุณหภูมิ
10 - 35°C ความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 2-9 ปริมาณน้ำอิสระ (water activity) เท่ากับ หรือน้อยกว่า
0.85 การตรวจนับจำนวนยีสต์และราทำได้โดยเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง 10
เท่าตามลำดับ (serial ten-fold dilutions) ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เหมาะสม
ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (ส่วนใหญ่จะใส่สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ
25°C 5-7 วัน นำมานับจำนวน และคำนวณจำนวนยีสต์และราต่อตัวอย่าง 1 กรัมหรือมิลลิลิตร



การตรวจปริมาณ แบบ dilution plating technique มี 2 วิธีคือ pour plate และ spread plate

4.1 วิธี pour plate

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100, ...) ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแข็ง นำไปบ่มนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ

4.2 วิธี spread plate

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100,) ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวันแห้ง นำไปบ่ม นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar

5.1.2 Dichloran 18% glycerol (DG 18) agar

5.1.3 Plate count agar (PCA) ผสม chloramphenicol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.1.4 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ 0.1% peptone water

5.2 สารเคมี

5.2.1 Chloramphenicol

5.2.2 Glycerol

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

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) 25°C

6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.7 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$



6.2 เครื่องใช้

- 6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)
- 6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.3 แท่งแก้วอ (glass spreader)
- 6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.5 ปิเปต (pipette)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 25-50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับๆ ละ 10 เท่า ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

- 7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจางลงในตัวอย่างให้ได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่น 30-60 วินาที หรือเครื่องตีผสมอาหาร 2 นาที (initial suspension หรือ primary dilution)
- 7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10 (initial suspension หรือ primary dilution)
- 7.2.3 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate: ภาคผนวก 2

- 7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 3 จานเพาะเชื้อ (triplicate)



7.3.2 เท PCA ผสม chloramphenicol หรือ DG 18 agar ประมาณ 20-25 มิลลิลิตร ลงในแต่ละจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแห้ง

7.3.3 บ่มที่ 25°C 5 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ และวางซ้อนกันไม่เกิน 3 จานเพาะเชื้อ เมื่อครบ 5 วัน ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อให้บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง

7.3.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 10-150 โคโลนี (ในกรณีที่มีปริมาณราจำนวนมาก จำนวนโคโลนีสูงสุดที่เหมาะสมในการนับอาจน้อยกว่า 150 โคโลนี)

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 3

7.4.1 เท DRBC agar หรือ DG 18 agar หรือ PCA ผสม chloramphenicol ลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้วันแห้ง แล้วทำให้ผิวหน้าวันแห้ง

7.4.2 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้า DRBC agar หรือ DG 18 agar หรือ PCA ผสม chloramphenicol ระดับความเจือจางละ 3 จานเพาะเชื้อ (triplicate) ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวันแห้ง

7.4.3 บ่มที่ 25°C 5 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ และวางซ้อนกันไม่เกิน 3 จานเพาะเชื้อ เมื่อครบ 5 วัน ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อให้บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง

7.4.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 10-150 โคโลนี (ในกรณีที่มีปริมาณราจำนวนมาก จำนวนโคโลนีสูงสุดที่เหมาะสมในการนับอาจน้อยกว่า 150 โคโลนี)

- หมายเหตุ:**
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ DG 18 agar ใช้ได้เฉพาะตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำอิสระ (water activity) น้อยกว่า 0.95
 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสม chloramphenicol ไม่เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีราชนิด spreader molds
 3. ระยะเวลาตั้งแต่สิ้นสุดการทำ initial suspension หรือ primary dilution จนกระทั่งเทวันหรือเกลี่ยตัวอย่างบนจานเพาะเชื้อ ไม่ควรนานเกิน 20 นาที (ที่เหมาะสมควรภายใน 10 นาที)
 4. ไม่เคลื่อนย้ายจานเพาะเชื้อจนกว่าจะทำการนับจำนวน



8. การคำนวณ (Calculation of results)

คำนวณจำนวนยีสต์หรือราเป็นค่าเฉลี่ยของการนับโคโลนีจาก 3 จานเพาะเชื้อ และคูณด้วยระดับความเจือจางต่ำสุด

ตัวอย่าง การตรวจโดยใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (โดยวิธี pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 1:100 นับจำนวนโคโลนีจาก 3 จานเพาะเชื้อ ได้ 18, 20 และ 22

$$\begin{aligned}\text{จำนวนยีสต์หรือรา CFU/กรัม} &= \text{ค่าเฉลี่ยโคโลนีที่นับได้} \times \text{ระดับความเจือจางต่ำสุด} \\ &= 20 \times 100 \\ &= 2,000\end{aligned}$$

ตัวอย่าง การตรวจโดยใช้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (โดยวิธี spread plate) ที่ระดับความเจือจาง 1:100 นับจำนวนโคโลนีจาก 3 จานเพาะเชื้อ ได้ 18, 20 และ 22

$$\begin{aligned}\text{จำนวนยีสต์หรือรา CFU/กรัม} &= \text{ค่าเฉลี่ยโคโลนีที่นับได้} \times \text{ระดับความเจือจางต่ำสุด} \times 10 \\ &= 20 \times 100 \times 10 \\ &= 20,000\end{aligned}$$

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

9.1 จำนวนยีสต์ CFU/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2 จำนวนรา CFU/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.3 จำนวนยีสต์และรา CFU/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.4 กรณีที่ไม่พบโคโลนียีสต์และรา

◆ ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (โดยวิธี pour plate)

รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกที่ทดสอบ

◆ ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร (โดยวิธี spread plate)

รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกที่ทดสอบ x 10

9.5 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4 แต่ถ้าตำแหน่งที่สามเป็น 5 ต้องดูตัวเลขตำแหน่งที่สอง หากตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคู่ ให้คงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม แต่ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคี่ ให้เพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับ



ตัวอย่าง :	456	รายงานเป็น	460
	454	รายงานเป็น	450
	445	รายงานเป็น	440
	455	รายงานเป็น	460

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

- 10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) ยีสต์และราในอาหาร
โดยวิธี pour plate
- 10.3 ภาคผนวก 3 : แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) ยีสต์และราในอาหาร
โดยวิธี spread plate



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar

Glucose	10	กรัม
Bacteriological peptone	5	กรัม
Potassium phosphate monobasic	1	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate	0.5	กรัม
Rose bengal (5% soln., w/v)	0.5	มิลลิลิตร
Dichloran (0.2% in ethanol, w/v)	1	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
Chloramphenicol	0.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ผ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 5.6

2. Dichloran 18% glycerol (DG 18) agar

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potassium phosphate monobasic	1	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate	0.5	กรัม
Dichloran (0.2% in ethanol, w/v)	1	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
Chloramphenicol	0.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เติม glycerol 220 กรัม ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ผ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 5.6



3. Plate count agar (PCA) ผสม chloramphenicol

3.1 Base medium

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร

3.2 Stock antibiotic solution

Chloramphenicol	0.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	40	มิลลิลิตร

ละลาย Chloramphenicol ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 40 มิลลิลิตร

การใช้งาน

เติม Stock antibiotic solution (ข้อ 3.2) 40 มิลลิลิตร ลงใน Base medium (ข้อ 3.1) 960 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

4. 0.1 % Peptone water

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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



ภาคผนวก 2

ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100,)



1 มิลลิลิตร (triplicate)

เท DG 18 หรือ PCA ผสม chloramphenicol 20-25 มิลลิลิตร



25°C 5 - 7 วัน

นับจำนวนโคโลนี (10-150 โคโลนี)



คำนวณ



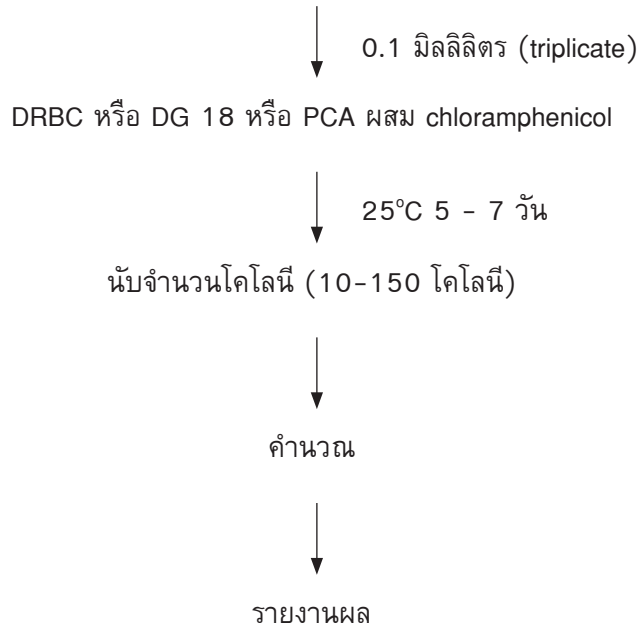
รายงานผล

แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) ยีสต์และราในอาหาร
โดยวิธี pour plate



ภาคผนวก 3

ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100,



แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) ยีสต์และราในอาหาร
โดยวิธี spread plate



DMSc F 2010 : วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในอาหาร
Analytical method of *Vibrio cholerae* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

ISO/TS 21872-1:2007/Cor.1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.–Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

V. cholerae = *Vibrio cholerae*

4. หลักการ (Principle)

V. cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ที่ปลายเซลล์ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์ oxidase สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดโดย ไม่สร้างก๊าซ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 0-2% เชื้อนี้พบได้ปริมาณน้อยและมักพบร่วมกับ *Vibrionaceae* family หรือ family อื่นๆ ที่มีปริมาณมาก ดังนั้นการตรวจหา *V. cholerae* จึงจำเป็นต้องทำขั้นตอน selective enrichment ต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง

การตรวจหา *V. cholerae* มีขั้นตอนสำคัญ 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (first selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยง เชื้อจำเพาะชนิดเหลว ระยะเวลาการบ่มสัณ เพื่อให้ *V. cholerae* ที่มีจำนวนน้อยหรือบาดเจ็บ ได้ฟื้นตัวขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง

4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (secondary selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหาร เลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว บ่มข้ามคืน เพื่อให้ *V. cholerae* ที่ฟื้นตัวสามารถเจริญเพิ่ม จำนวนขึ้นขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง



- 4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง
- 4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันเบื้องต้น ตรวจยืนยันทางชีวเคมี และนำเชื้อไปเลี้ยงวิทยา

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Alkaline saline peptone water (ASPW)
- 5.1.2 Saline medium for detection of arginine dihydrolase (ADH)
- 5.1.3 Saline medium for detection of indole (tryptone-tryptophan saline medium)
- 5.1.4 Saline medium for detection of lysine decarboxylase (LDC)
- 5.1.5 Saline medium for detection of ornithine decarboxylase (ODC)
- 5.1.6 Saline nutrient agar (SNA)
- 5.1.7 0%, 2%, 6%, 8% และ 10% saline peptone waters
- 5.1.8 Saline triple sugar iron (TSI) agar
- 5.1.9 Thiosulfate citrate bile and sucrose (TCBS) agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด เช่น Soya peptone triphenyl tetrazolium choride agar (TSAT), Sodium dodecyl sulfate polymyxin sucrose agar (SDSPS) หรืออื่นๆ

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 β -galactosidase reagent
- 5.2.2 Gram stain reagents
- 5.2.3 Kovacs' reagent
- 5.2.4 Oxidase reagent
- 5.2.5 Polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum
- 5.2.6 Polyvalent *V. cholerae* O139 antiserum
- 5.2.7 Sterile mineral oil
- 5.2.8 Toluene
- 5.2.9 *V. cholerae* Inaba antiserum
- 5.2.10 *V. cholerae* Ogawa antiserum
- 5.2.11 น้ำเกลือ 0.85% และ 1%



6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) หรืออ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $44 - 50^{\circ}\text{C}$

6.2 เครื่องใช้

- 6.2.1 แผ่นกระจกทาบหน้า (coverslip)
- 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)
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures): ภาคผนวก 2

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ



7.1.3 กรณีที่ต้องการลดปริมาณงานสำหรับตัวอย่างรุ่นเดียวกัน (same batch) สามารถนำตัวอย่างทดสอบมารวมกัน เช่น การตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่างให้สุ่มตัวอย่างละ 25 กรัม รวมเป็น 250 กรัม

7.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (first selective enrichment)

เติม ASPW ปริมาตร 9 เท่าของปริมาณตัวอย่าง เช่น เติม ASPW 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 25 กรัม เขย่าให้เข้ากัน (initial suspension) บ่มที่ 37°C 6 ± 1 ชั่วโมง สำหรับอาหารแช่เยือกแข็ง อาหารแห้ง หรืออาหารดองเกลือ ส่วนอาหารสด บ่มที่ 41.5°C 6 ± 1 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถบ่มให้ครบ 6 ± 1 ชั่วโมง ภายในวันเดียวกัน ให้เก็บ initial suspension ที่ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ แล้วเริ่มบ่มในวันรุ่งขึ้น

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (second selective enrichment)

ปิเปต 1 มิลลิลิตร บริเวณผิวหน้า จากข้อ 7.2 ใส่ใน ASPW 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 41.5°C 18 ± 1 ชั่วโมง

7.4 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.4.1 นำ 1 loop จากบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 7.2 และ 7.3 ขีดบน TCBS agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.4.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต) ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Vibrio cholerae*

- ◆ TCBS agar โคโลนีผิวเรียบสีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร
- ◆ อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นเป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.4.3 เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 5 โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด กรณีน้อยกว่า 5 โคโลนีให้เลือกทั้งหมด ขีดบน SNA plate หรือ SNA slant บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

7.5 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

7.5.1 การตรวจยืนยันเบื้องต้น

นำเชื้อจาก SNA plate หรือ SNA slant (ข้อ 7.4.3) ทดสอบดังนี้

- ◆ oxidase test

นำเชื้อขีดบนกระดาษกรองที่หยด oxidase reagent (ไม่ใช่ห่วงนิเกิล-โครเมียม หรือลวดโลหะ)



ผลบวก : กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน ม่วง หรือม่วงเข้ม ภายใน
10 วินาที

ผลลบ : กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

V. cholerae ให้ผลบวก

◆ microscopic examination

- การย้อมสีแกรม

V. cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (สีแดง) รูปท่อนตรง หรือท่อนโค้ง
ไม่สร้างสปอร์

- motility test

นำเชื้อ 1 loop ใส่ใน ASPW บ่มที่ 37°C 1-6 ชั่วโมง หยด ASPW ลงบน
แผ่นกระจก ปิดทับด้วยแผ่นกระจกทึบหน้า ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อภายใต้
กล้องจุลทรรศน์

ผลบวก : เชื้อเคลื่อนที่ได้

ผลลบ : เชื้อไม่เคลื่อนที่

V. cholerae ให้ผลบวก

7.5.2 การตรวจยืนยันทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

เชี่ยเชื้อจาก SNA slant หรือ SNA plate ในข้อ 7.4.3 ที่ให้ผลตรวจยืนยันเบื้องต้น
ที่สงสัยว่าเป็น *V. cholerae* นำไปทดสอบ ดังนี้

7.5.2.1 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี: ภาคผนวก 3

◆ การทดสอบด้วย Saline TSI agar

ขีดเชิบบนผิวหน้า slant และ stab ในส่วนของ butt บ่มที่ 37°C
24 ± 3 ชั่วโมง

butt

- สีเหลือง (ใช้น้ำตาล glucose)
- สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้น้ำตาล glucose)
- สีดำ (สร้าง H₂S)
- มีฟองอากาศหรือรอยแตกของวุ้น (สร้างก๊าซจากน้ำตาล glucose)



slant

- สีเหลือง (ใช้น้ำตาล lactose และ/หรือ sucrose)
- สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาล lactose และ sucrose)

V. cholerae ให้ผล slant สีเหลือง butt สีเหลือง ไม่สร้าง H_2S และก๊าซ

หมายเหตุ : ระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมง เพราะ slant ที่ให้ผล
สีเหลืองอาจเปลี่ยนเป็นสีแดงหลังจาก 24 ชั่วโมง

◆ การตรวจหา ornithine decarboxylase

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ODC บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย
sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ $37^{\circ}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. cholerae ให้ผลบวก

◆ การตรวจหา L-lysine decarboxylase

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LDC บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย
sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ $37^{\circ}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. cholerae ให้ผลบวก

◆ การตรวจหา arginine dihydrolase

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ADH บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย
sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ $37^{\circ}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. cholerae ให้ผลลบ

◆ การตรวจหา β -galactosidase

เขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือ 1% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยด toluene 1 หยด
เขย่าหลอด วางหลอดในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ 5 นาที
เติม β -galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร เขย่าหลอด บ่มต่อ
 24 ± 3 ชั่วโมง



ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี

V. cholerae ให้ผลบวก

กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

◆ การตรวจหา indole

เชยเชื้อลงใน tryptone-tryptophan saline medium บ่มที่ 37°C
24 ± 3 ชั่วโมง เติม kovacs' reagent 1 มิลลิลิตร

ผลบวก : เกิดวงแหวนสีแดง

ผลลบ : เกิดวงแหวนสีเหลือง

V. cholerae ให้ผลบวก

◆ การทดสอบ halotolerance

เตรียม suspension ของเชื้อ และใส่ 1 loop ลงใน saline peptone water
ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0%, 2%, 6%, 8% และ 10% บ่มที่ 37°C
24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (มีการเจริญของเชื้อ)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)

V. cholerae ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ
เกลือ (NaCl) ที่ 0% และ 2%

7.5.2.2 การยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

7.5.2.2.1 เชยเชื้อที่ให้ผลการตรวจยืนยันทางชีวเคมีแล้วตะบนแผ่นกระจก
ที่สะอาด หยดน้ำเกลือ 0.85% 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากัน
สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอนแสดง
ว่าเป็น auto - agglutination

7.5.2.2.2 ถ้าไม่เกิด auto-agglutination ให้ทดสอบต่อโดยเชยเชื้อตะบน
แผ่นกระจกที่สะอาด หยด polyvalent *V. cholerae* O1
antiserum 1 หยด ผสมให้เข้ากัน เอียงแผ่นกระจกไปมา 30-60
วินาที สังเกตการจับกันเป็นตะกอน และทำเช่นเดียวกับ
polyvalent *V. cholerae* O139 antiserum ถ้ามีการจับกันเป็น
ตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก



กรณีการทดสอบ polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum ให้
ผลบวก อาจทดสอบเชื่อกับ *V. cholerae* Inaba antiserum
และ *V. cholerae* Ogawa antiserum

7.6 การแปลผล

โคโลนีที่เกิด auto-agglutination หรือโคโลนีที่ทดสอบทางชีวเคมี และ/หรือทางน้ำเหลืองวิทยา
แล้วให้ผลว่าเป็น หรือสงสัยว่าเป็น *V. cholerae* ให้ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์
สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้
โดยเก็บเชื้อบนผิวหน้าของ SNA slant เพื่อส่งตรวจ

8. รายงานผลการทดสอบ (Test report)

V. cholerae/น้ำหนักร หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. cholerae* ในอาหาร

9.3 ภาคผนวก 3 : ตารางแสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *V. cholerae*



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Alkaline saline peptone water (ASPW)

Peptone	20 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 8.6 ± 0.2

2. Saline medium for detection of arginine dihydrolase (ADH)

Arginine monohydrochloride	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Glucose	1 กรัม
Bromocresol purple	0.015 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

3. Saline medium for detection of indole (tryptone-tryptophan saline medium)

Enzymatic digest of casein	10 กรัม
DL-Tryptophan	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

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



4. Saline medium for detection of lysine decarboxylase (LDC)

L-Lysine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อ
ที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

5. Saline medium for detection of ornithine decarboxylase (ODC)

L-Ornithine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อ
ที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

6. Saline nutrient agar (SNA)

Meat extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนส่วนผสมละลาย แบ่งใส่ขวด
หรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 เติงหลอด
และปล่อยให้เย็นแข็ง

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)



7. Saline peptone waters (0%, 2%, 6%, 8% และ 10%)

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	0, 20, 60, 80 หรือ 100	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาณที่ต้องการ
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

8. Saline triple sugar iron (TSI) agar

Peptone	20	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Glucose	1	กรัม
Iron (III) citrate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย แบ่งใส่หลอด
10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2 เย็นหลอด และปล่อยให้วุ้นแข็ง โดย
ให้ส่วนของ butt สูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร

9. Thiosulfate citrate bile and sucrose (TCBS) agar

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	10	กรัม
Iron (III) citrate	1	กรัม

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)



Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Dried bovine bile	8	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจนวุ้นละลาย pH 8.6 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β -galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	6.9	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH), 10 mol/l solution	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

(ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)

ละลาย NaH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 ONPG solution

2-ortho-Nitrophenyl	0.08	กรัม
β -D-galactopyranoside (ONPG)		
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C

การใช้งาน

Buffer solution (ข้อ 1.1) 5 มิลลิลิตร กับ ONPG solution (ข้อ 1.2) 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)



2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. Kovacs' reagent

4-Dimethylaminobenzaldehyde	5 กรัม
Hydrochloric acid	25 มิลลิลิตร
2-Methylbutan-2-ol	75 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน

4. Sterile mineral oil ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. Oxidase reagent

<i>N, N, N', N'</i> - tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)	1 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

6. น้ำเกลือ 0.85% และ 1%

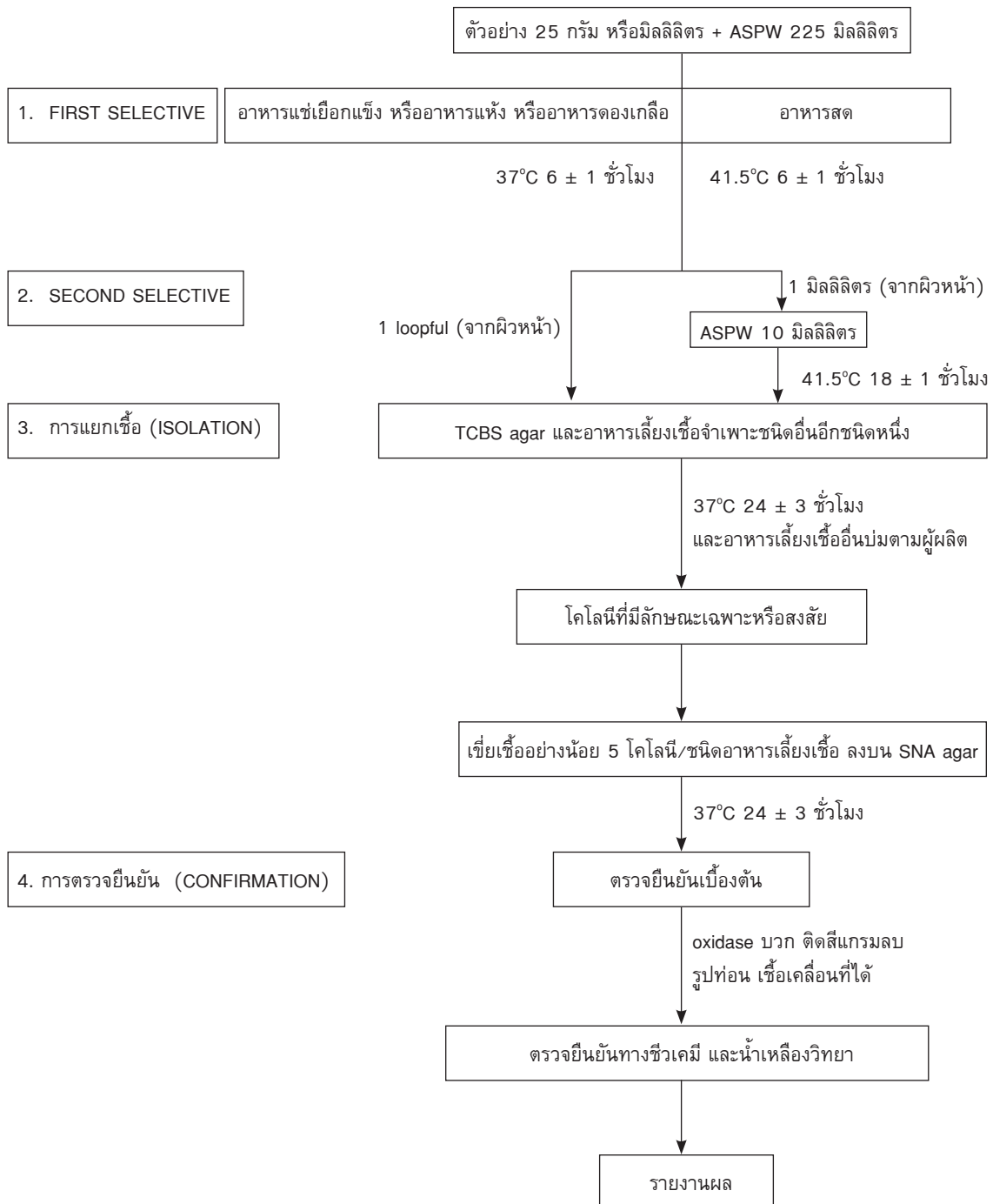
Sodium chloride (NaCl)	8.5 หรือ 10 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

7. *V. cholerae* anti-sera ใช้ชนิดสำเร็จรูป



ภาคผนวก 2



แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. cholerae* ในอาหาร



ภาคผนวก 3

ตารางแสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *V. cholerae*

การทดสอบ (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1% NaCl)	<i>V. cholerae</i> ^a
Oxidase	+
Production of gas (glucose)	-
Lactose	-
Sucrose	+
ODC	+
LDC	+
ADH	-
ONPG hydrolysis	+
Production of indole	+
Growth in peptone water with	
0% NaCl	+
2% NaCl	+
6% NaCl	-
8% NaCl	-
10% NaCl	-
^a เครื่องหมาย + หมายถึงให้ผลบวก 76% ถึง 89%	



DMSc F 2011 : วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร
Analytical method of *Vibrio parahaemolyticus* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

ISO/TS 21872-1:2007/Cor.1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.-Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

V. parahaemolyticus = *Vibrio parahaemolyticus*

4. หลักการ (Principle)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์ oxidase สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดโดยไม่สร้างก๊าซ เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 2-8% เชื้อนี้พบได้ปริมาณน้อย และมักพบร่วมกับ Vibrionaceae family หรือ family อื่นๆ ที่มีปริมาณมาก ดังนั้นการตรวจหา *V. parahaemolyticus* จึงจำเป็นต้องทำขั้นตอน selective enrichment ต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง

การตรวจหา *V. parahaemolyticus* มีขั้นตอนสำคัญ 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (first selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว ระยะเวลาการบ่มสัณ เพื่อให้ *V. parahaemolyticus* ที่มีจำนวนน้อยหรือบาดเจ็บได้ฟื้นตัวขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง



- 4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (secondary selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว บ่มข้ามคืน ทำให้ *V. parahaemolyticus* ที่พื้นตัวสามารถเจริญเพิ่มจำนวนขณะที่เชื้ออื่นถูกยับยั้ง
- 4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง
- 4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันเบื้องต้น และตรวจยืนยันทางชีวเคมี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Alkaline saline peptone water (ASPW)
- 5.1.2 Saline medium for detection of arginine dihydrolase (ADH)
- 5.1.3 Saline medium for detection of indole (tryptone-tryptophan saline medium)
- 5.1.4 Saline medium for detection of lysine decarboxylase (LDC)
- 5.1.5 Saline medium for detection of ornithine decarboxylase (ODC)
- 5.1.6 Saline nutrient agar (SNA)
- 5.1.7 0%, 2%, 6%, 8% และ 10% saline peptone waters
- 5.1.8 Saline triple sugar iron (TSI) agar
- 5.1.9 Thiosulfate citrate bile and sucrose (TCBS) agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกชนิดหนึ่ง เช่น Soya peptone triphenyl tetrazolium choride agar (TSAT), Sodium dodecyl sulfate polymyxin sucrose agar (SDSPS) หรืออื่นๆ (ไม่แนะนำให้ใช้ mCPC, CPC และ CC agar)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 β -galactosidase reagent
- 5.2.2 Gram stain reagents
- 5.2.3 Kovacs' reagent
- 5.2.4 Oxidase reagent
- 5.2.5 Sterile mineral oil
- 5.2.6 Toluene
- 5.2.7 น้ำเกลือ 1%



6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) หรืออ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $44 - 50^{\circ}\text{C}$

6.2 เครื่องใช้

- 6.2.1 แผ่นกระจกทึบหน้า (coverslip)
- 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)
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures): ภาคผนวก 2

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.3 กรณีที่ต้องการลดปริมาณงานสำหรับตัวอย่างรุ่นเดียวกัน (same batch) สามารถนำตัวอย่างทดสอบมารวมกัน เช่น การตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่างให้สุ่มตัวอย่างละ 25 กรัม รวมเป็น 250 กรัม



7.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (first selective enrichment)

เติม ASPW ปริมาตร 9 เท่าของปริมาณตัวอย่าง เช่น เติม ASPW 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 25 กรัม เขย่าให้เข้ากัน (initial suspension) บ่มที่ 37°C 6 ± 1 ชั่วโมง สำหรับอาหารแช่เยือกแข็ง อาหารแห้ง หรืออาหารดองเกลือ ส่วนอาหารสด บ่มที่ 41.5°C 6 ± 1 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถบ่มให้ครบ 6 ± 1 ชั่วโมง ภายในวันเดียวกัน ให้เก็บ initial suspension ที่ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ แล้วเริ่มบ่มในวันรุ่งขึ้น

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นที่สอง (second selective enrichment)

ปิเปต 1 มิลลิลิตร บริเวณผิวหน้า จากข้อ 7.2 ใส่ใน ASPW 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 41.5°C 18 ± 1 ชั่วโมง

7.4 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.4.1 นำ 1 loop จากบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 7.2 และ 7.3 ขีดบน TCBS agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.4.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต)
ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Vibrio parahaemolyticus*

- ◆ TCBS agar โคโลนีผิวเรียบสีเขียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร
- ◆ อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นเป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.4.3 เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 5 โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด กรณีน้อยกว่า 5 โคโลนีให้เลือกทั้งหมด ขีดบน SNA plate หรือ SNA slant บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง



7.5 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

7.5.1 การตรวจยืนยันเบื้องต้น

นำเชื้อจาก SNA plate หรือ SNA slant (ข้อ 7.4.3) ทดสอบดังนี้

◆ oxidase test

นำเชื้อขีดบนกระดาษกรองที่หยด oxidase reagent (ไม่ใช่หัววงนิเกิล-โครเมียม หรือลวดโลหะ)

ผลบวก : กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน ม่วง หรือม่วงเข้ม ภายใน 10 วินาที

ผลลบ : กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก

◆ microscopic examination

- การย้อมสีแกรม

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (สีแดง) รูปท่อนตรง หรือ ท่อนโค้ง ไม่สร้างสปอร์

- motility test

นำเชื้อ 1 loop ใส่ใน ASPW บ่มที่ 37°C 1-6 ชั่วโมง หยด ASPW ลงบน แผ่นกระจก ปิดทับด้วยแผ่นกระจกทับหน้า ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อภายใต้ กล้องจุลทรรศน์

ผลบวก : เชื้อเคลื่อนที่ได้

ผลลบ : เชื้อไม่เคลื่อนที่

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก



7.5.2 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี: ภาคผนวก 3

เชี่ยเชื้อจาก SNA slant หรือ SNA plate ในข้อ 7.4.3 ที่ให้ผลตรวจยืนยันเบื้องต้น
ที่สงสัยว่าเป็น *V. parahaemolyticus* นำไปทดสอบ ดังนี้

◆ การทดสอบด้วย Saline TSI agar

ขีดเชี่ยนบนผิวหน้า slant และ stab ในส่วนของ butt ป่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง
butt

- สีเหลือง (ใช้น้ำตาล glucose)
- สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้น้ำตาล glucose)
- สีดำ (สร้าง H₂S)
- มีฟองอากาศหรือรอยแตกของวุ้น (สร้างก๊าซจากน้ำตาล glucose)

slant

- สีเหลือง (ใช้น้ำตาล lactose และ/หรือ sucrose)
- สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาล lactose และ sucrose)

V. parahaemolyticus ให้ผล slant สีแดง และ butt สีเหลือง ไม่สร้าง H₂S
และก๊าซ

◆ การตรวจหา ornithine decarboxylase

เชี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ODC บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย sterile
mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร ป่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุนสีม่วง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก

◆ การตรวจหา L-lysine decarboxylase

เชี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LDC บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทาบหน้าด้วย sterile
mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร ป่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุนสีม่วง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก



◆ การตรวจหา arginine dihydrolase

เชี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ADH บริเวณใต้ผิวหน้า แล้วทับหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นสีม่วง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. parahaemolyticus ให้ผลลบ

◆ การตรวจหา β -galactosidase

เชี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือ 1% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอด วางหลอดในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 37°C 5 นาที เติม

β -galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร เขย่าหลอด บ่มต่อ 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus ให้ผลลบ

กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

◆ การตรวจหา indole

เชี่ยเชื้อลงใน tryptone-tryptophan saline medium บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง เติม kovacs' reagent 1 มิลลิลิตร

ผลบวก : เกิดวงแหวนสีแดง

ผลลบ : เกิดวงแหวนสีเหลือง

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก

◆ การทดสอบ halotolerance

เตรียม suspension ของเชื้อ และใส่ 1 loop ลงใน saline peptone water ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0%, 2%, 6%, 8% และ 10% บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้น (มีการเจริญของเชื้อ)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขึ้น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)

V. parahaemolyticus ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 2%, 6% และ 8%



7.6 การแปลผล

โคโลนีที่ทดสอบทางชีวเคมีแล้วสงสัยว่าเป็น *V. parahaemolyticus* ให้ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้ โดยให้เก็บเชื้อบนผิวหน้าของ SNA slant เพื่อส่งตรวจ

8. รายงานผลการทดสอบ (Test report)

V. parahaemolyticus/น้ำหนักร หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

9.3 ภาคผนวก 3: ตารางแสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Alkaline saline peptone water (ASPW)

Peptone	20 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาณที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 8.6 ± 0.2

2. Saline medium for detection of arginine dihydrolase (ADH)

Arginine monohydrochloride	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Glucose	1 กรัม
Bromocresol purple	0.015 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

3. Saline medium for detection of indole (tryptone-tryptophan saline medium)

Enzymatic digest of casein	10 กรัม
DL-Tryptophan	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

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



4. Saline medium for detection of lysine decarboxylase (LDC)

L-Lysine monohydrochloride	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Glucose	1 กรัม
Bromocresol purple	0.015 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

5. Saline medium for detection of ornithine decarboxylase (ODC)

L-Ornithine monohydrochloride	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Glucose	1 กรัม
Bromocresol purple	0.015 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

6. Saline nutrient agar (SNA)

Meat extract	5 กรัม
Peptone	3 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
Agar	8-18* กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 เอียงหลอด และปล่อยให้วุ้นแข็ง

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)



7. Saline peptone waters (0%, 2%, 6%, 8% และ 10%)

Peptone	10 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	0, 20, 60, 80 หรือ 100 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาณที่ต้องการ
ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

8. Saline triple sugar iron (TSI) agar

Peptone	20 กรัม
Meat extract	3 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
Lactose	10 กรัม
Sucrose	10 กรัม
Glucose	1 กรัม
Iron (III) citrate	0.3 กรัม
Phenol red	0.024 กรัม
Agar	8-18* กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย แบ่งใส่หลอด
10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2 เอียงหลอด และปล่อยให้เย็นแข็ง โดยให้
ส่วนของ butt สูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร

9. Thiosulfate citrate bile and sucrose (TCBS) agar

Peptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Sodium citrate	10 กรัม
Sodium thiosulfate	10 กรัม
Iron (III) citrate	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)



Dried bovine bile	8 กรัม
Sucrose	20 กรัม
Bromothymol blue	0.04 กรัม
Thymol blue	0.04 กรัม
Agar	8-18* กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจนวุ้นละลาย pH 8.6 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β -galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	6.9 กรัม
Sodium hydroxide (NaOH), 10 mol/l solution	3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

(ปริมาณเพียงพอเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย)

ละลาย NaH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 ONPG solution

2-ortho-Nitrophenyl	0.08 กรัม
β -D-galactopyranoside (ONPG)	
น้ำกลั่น	15 มิลลิลิตร

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C

การใช้งาน

Buffer solution (ข้อ 1.1) 5 มิลลิลิตร กับ ONPG solution (ข้อ 1.2) 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)



3. Kovacs' reagent

4-Dimethylaminobenzaldehyde	5 กรัม
Hydrochloric acid	25 มิลลิลิตร
2-Methylbutan-2-ol	75 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน

4. Sterile mineral oil ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. Oxidase reagent

<i>N, N, N', N'</i> - tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	1 กรัม
Dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)	
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

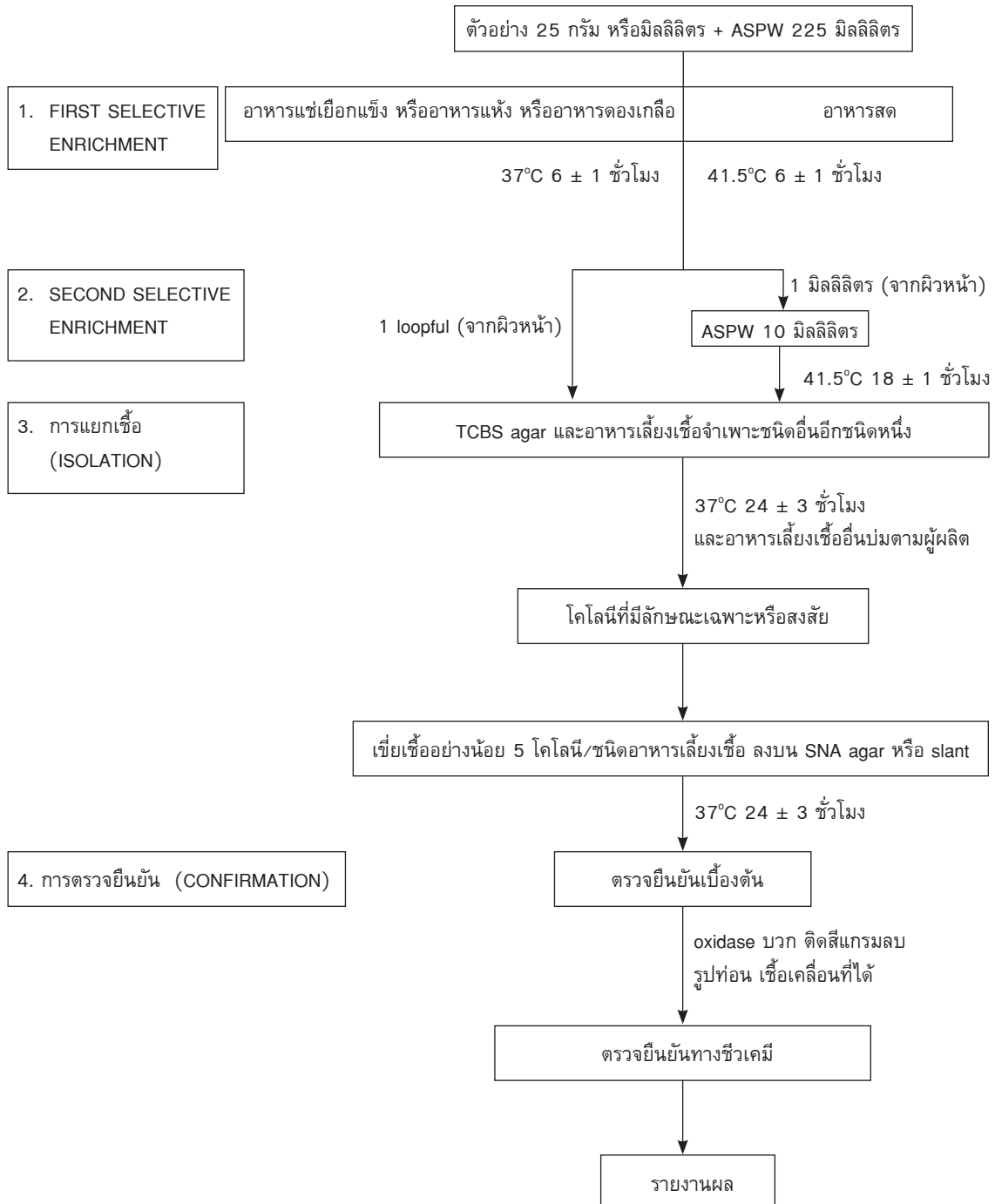
6. น้ำเกลือ 1%

Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2



ภาคผนวก 2



แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. parahaemolyticus* ในอาหาร



ภาคผนวก 3

ตารางแสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *V. parahaemolyticus*

การทดสอบ (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1% NaCl)	<i>V. parahaemolyticus</i> ^a
Oxidase	+
Production of gas (glucose)	-
Lactose	-
Sucrose	-
ODC	+
LDC	+
ADH	-
ONPG hydrolysis	-
Production of indole	+
Growth in peptone water with	
0% NaCl	-
2% NaCl	+
6% NaCl	+
8% NaCl	+
10% NaCl	-
^a เครื่องหมาย + หมายถึงให้ผลบวก 76% ถึง 89%	



**DMSc F 2012: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus*
ในอาหาร โดยวิธี MPN**
**Analytical method of *Vibrio parahaemolyticus*
in food by MPN Technique**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

- 2.1 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2004, Chapter 9 “*Vibrio*”. [ออนไลน์]. 2004; [สืบค้น 25 กรกฎาคม 2557]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm_070830.htm.
- 2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2010, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. [ออนไลน์]. 2010; [สืบค้น 25 กรกฎาคม 2557]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm_109656.htm.

3. นิยามศัพท์ (Term and abbreviation)

V. parahaemolyticus = *Vibrio parahaemolyticus*

4. หลักการ (Principle)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์ oxidase สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดโดยไม่สร้างก๊าซ เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria)

การตรวจหาปริมาณ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี MPN แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว ใช้ตัวอย่างที่เจอจากตามความเหมาะสมอย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ระดับละ 3 หลอด
- 4.2 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง
- 4.3 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี



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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Alkaline peptone water single strength (APW) และ double strength (2 x APW)
- 5.1.2 Arginine glucose slant (AGS)
- 5.1.3 Carbohydrate utilization broth (cellobiose และ lactose)
- 5.1.4 Christensen's urea agar
- 5.1.5 Motility test medium
- 5.1.6 Phosphate buffered saline (PBS)
- 5.1.7 Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar
- 5.1.8 Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)
- 5.1.9 Trypticase (tryptic) soy broth (TSB)
- 5.1.10 1% Tryptone broth ไม่เติมเกลือ (0% NaCl) และเติมเกลือ 3%, 6%, 8% และ 10% (T_1N_0 , T_1N_3 , T_1N_6 , T_1N_8 and T_1N_{10})
- 5.1.11 API 20E diagnostic strips and reagents (BioMerieux)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 β -galactosidase reagent
- 5.2.2 Gram stain reagents
- 5.2.3 Oxidase reagent
- 5.2.4 Toluene
- 5.2.5 น้ำเกลือ 0.85% และ 2%

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^\circ\text{C}$
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender)
- 6.1.4 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)
- 6.1.5 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $35 \pm 2^\circ\text{C}$
- 6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)



6.2 เครื่องใช้

- 6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.3 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.5 ปิเปต (pipette)
- 6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure): ภาคผนวก 2

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นอาหารทะเล โดยทั่วไปสุ่มตัวอย่าง 12 ตัว สุ่มส่วนเหงือก ลำไส้ และส่วนเนื้อเยื่อบริเวณผิวของลำตัว สำหรับอาหารทะเลที่มีเปลือก (shellfish) เช่น กุ้ง ก้ามปู ถ้าเป็นไปได้ให้ใช้ทั้งหมด แต่ถ้ามีขนาดใหญ่ให้เลือกบริเวณตรงกลาง รวมทั้งส่วนเหงือก และลำไส้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นนาน 90 วินาที สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นหอย (molluscan shellfish) สุ่มตัวอย่าง 12 ตัว ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ เทสารละลายสำหรับเจือจาง PBS ปริมาตรเท่ากับน้ำหนักตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นนาน 90 วินาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:2
- 7.1.3 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น แฮแข็ง การทำแห้ง หรือผ่านความร้อน สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับๆ ละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

- 7.2.1 กรณี 7.1.1 และ 7.1.3 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องบดปั่น 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10



7.2.2 กรณี 7.1.2 ซึ่งตัวอย่างเชื้อจาง 1:2 จำนวน 20 กรัม (ไม่ใช่ปิเปต เนื่องจากมีฟองอากาศในตัวอย่างที่เชื้อจาง 1:2 อาจทำให้ได้ปริมาตรที่ไม่ถูกต้อง) ใส่ในสารละลายสำหรับเชื้อจาง 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างที่เชื้อจาง 1:10

7.2.3 เชื้อจางตัวอย่าง (ข้อ 7.2.1 และ 7.2.2) ตามลำดับๆ ละ 10 เท่า (เช่น ปิเปตตัวอย่างที่เชื้อจาง 1:10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเชื้อจาง 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเชื้อจาง 1:100) ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนได้ตัวอย่างที่เชื้อจางตามต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration)

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเชื้อจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม อย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ระดับความเชื้อจางละ 3 หลอด โดยที่ระดับความเชื้อจาง 1:10 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร (1 กรัม) ลงใน 2xAPW 10 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่ระดับความเชื้อจาง 1:10, 1:100 และ 1:1000 ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน APW 10 มิลลิลิตร

7.3.2 บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

7.3.3 เลือกหลอดขุนที่ 3 ระดับการเชื้อจางสูงสุด ถ่ายเชื้อโดยใช้หัวเข็มเชื้อจุ่มลงต่ำกว่าผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร แล้วขีดบน TCBS agar

7.3.4 บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

- ◆ โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ กลม ทึบแสง สีเขียว หรือน้ำเงิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร

7.3.5 เชียโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 2 โคโลนี ลงใน TSB และ TSA slant (2% NaCl)

7.3.6 บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นำไปตรวจยืนยันต่อไป

7.4 การตรวจยืนยัน *V. parahaemolyticus*

7.4.1 การตรวจยืนยันเบื้องต้น

นำเชื้อจากข้อ 7.3.6 ทดสอบทางชีวเคมีกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 2% หรือ 3% ดังต่อไปนี้ (อาจใช้ API 20E เป็นวิธีทางเลือกโดยเตรียม cell suspension ของเชื้อในน้ำเกลือ 2%)



◆ Arginine glucose slant (AGS)

นำเชื้อจาก TCBS agar ขีดบนผิวหน้า slant และ stab ในส่วน butt ปิดฝาให้หลวม บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

V. parahaemolyticus ให้ผล slant เป็นต่าง (สีม่วง) และ butt เป็นกรด (สีเหลือง) แสดงว่าไม่สร้างเอนไซม์ arginine dihydrolase และไม่เกิดก๊าซหรือ H_2S

◆ การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ

เชี่ยเชื้อจาก TSB ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_0 และ T_1N_3 บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (มีการเจริญของเชื้อ)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)

V. parahaemolyticus เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_3 แต่ไม่เจริญใน T_1N_0

◆ การย้อมสีแกรม

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (สีแดง) รูปท่อนตรง หรือท่อนโค้ง ไม่สร้างสปอร์

◆ Motility test medium

เชี่ยเชื้อจาก TSB แล้ว stab ให้ลึกประมาณ 5 เซนติเมตร บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

ผลบวก : เชื้อเจริญออกนอกแนว stab

ผลลบ : เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก

◆ Oxidase test

นำเชื้อจาก TSB ขีดบนกระดาษกรองที่หยด oxidase reagent (ไม่ใช่ห่วงนิเกิล-โครเมียม หรือลวดโลหะ)

ผลบวก : กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

ผลลบ : กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก



7.4.2 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี

นำเชื้อจากข้อ 7.3.6 ทดสอบทางชีวเคมีกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 2% หรือ 3% ดังต่อไปนี้ (อาจใช้ API 20E เป็นวิธีทางเลือก)

◆ การทดสอบ ONPG

เชยเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอด นำไปบ่มที่ 37°C 5 นาที แล้วเติม β -galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร เขย่าหลอด บ่มต่อที่ 35 - 37°C ตรวจสอบเป็นระยะๆ ภายใน 24 ชั่วโมง

ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus ให้ผลลบ

กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

◆ การทดสอบ Salt-tolerance

เชยเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_0 , T_1N_3 , T_1N_6 , T_1N_8 และ T_1N_{10} บ่มข้ามคืนที่ $35 \pm 2^\circ\text{C}$

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (มีการเจริญของเชื้อ)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)

V. parahaemolyticus เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่ 3%, 6% และ 8%

◆ การทดสอบการใช้ cellobiose และ lactose

เชยเชื้อลงใน carbohydrate utilization broth (cellobiose และ lactose) บ่มที่ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 24-48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่อจนครบ 5 วัน

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus ให้ผล cellobiose เป็นบวกหรือลบ (variable results) และให้ผล lactose ลบ

◆ การทดสอบ Urease

นำเชื้อแตะบนผิวหน้าของ urea agar plate หรือ slant บ่มที่ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 18-24 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus ให้ผลเป็นบวกหรือลบ (variable results)



8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก 3) จะได้ค่า MPN/กรัม และขีดความเชื่อมั่นที่ระดับ 95% (95% confidence intervals)

8.2 กรณีจำนวนหลอด APW ให้ผลบวกไม่เป็นไปตามตาราง MPN ให้ใช้สูตรคำนวณ (Thomas, 1942) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{MPN/กรัม} &= (\sum g_j) / (\sum t_j m_j \sum (t_j - g_j) m_j)^{(1/2)} \\ \sum g_j &= \text{จำนวนหลอดทั้งหมดที่ให้ผลบวก} \\ \sum (t_j - g_j) m_j &= \text{น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดที่ให้ผลลบ} \\ \sum t_j m_j &= \text{น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดทั้งหมด} \end{aligned}$$

ให้เลือกระดับความเจือจางสำหรับการคำนวณ โดยเลือกระดับความเจือจางต่ำสุดที่ให้ผลบวกไม่ครบทุกหลอด แล้วเลือกระดับความเจือจางสูงสุดที่มีผลบวกอย่างน้อย 1 หลอด จากนั้นเลือกทุกระดับความเจือจางที่อยู่ระหว่างสองระดับที่เลือกไว้แล้ว ดังตัวอย่างข้างล่าง

ตัวอย่างที่ 1 ระดับความเจือจาง 1:1 1:10 1:100 1:1000 1:10000
จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 5/5 10/10 4/10 2/10 0/5
ในที่นี้ เลือกระดับความเจือจางที่ 1:100 และ 1:1000 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

$$\begin{aligned} \text{MPN/กรัม} &= 6 / \sqrt{(0.068)(0.11)} \\ &= 6 / 0.086 \\ &= 70 \end{aligned}$$



8.3 กรณีไม่มีผลบวกในตาราง MPN ให้ใช้สูตรคำนวณ

ตัวอย่างที่ 2 ระดับความเจือจาง 1:10 1:100 1:1000

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 2/3 0/3 3/3

ในที่นี้ เลือกทั้งสามระดับความเจือจาง จะได้

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

แทนค่าในสูตร

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

8.4 ในตาราง MPN (ภาคผนวก 3) ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็น 0.1, 0.01, 0.001 กรัม แต่ถ้าปริมาณตัวอย่างที่ใช้ทดสอบไม่ตรงกับตาราง ให้คูณค่า MPN และขีดความเชื่อมั่นด้วย ตัวคูณที่ทำให้ค่า MPN สอดคล้องกับค่าในตาราง เช่น ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็น 0.01, 0.001, 0.0001 กรัม ให้คำนวณค่า MPN โดยคูณด้วย 10

ตัวอย่าง ถ้าผลที่ได้จากในตารางเท่ากับ 43 ให้คูณด้วย 10 จะได้ค่า

$$\text{MPN/กรัม} = 43 \times 10 = 430$$

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

V. parahaemolyticus MPN/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจปริมาณ (enumeration) *V. parahaemolyticus* ในอาหาร โดยวิธี MPN

10.3 ภาคผนวก 3: ตาราง MPN 3-3-3



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Alkaline peptone water single strength (APW) และ double strength (2xAPW)

Peptone	10 หรือ (2 x 10) กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 หรือ (2 x 10) กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร สำหรับความเข้มข้นสองเท่า ซึ่งส่วนประกอบแต่ละชนิดเป็นสองเท่า ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10 นาที pH 8.5 ± 0.2

2. Arginine glucose slant (AGS)

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Tryptone	10 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	20 กรัม
Glucose	1 กรัม
L-Arginine (hydrochloride)	5 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5 กรัม
Sodium thiosulfate	0.3 กรัม
Bromocresol purple	0.02 กรัม
Agar	13.5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย แบ่งใส่หลอดขนาด 13x100 มิลลิเมตร 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10-12 นาที pH 6.8-7.0 เย็นหลอดและปล่อยให้วันแข็ง



3. Carbohydrate utilization broth (cellobiose และ lactose)

3.1 Base

Proteose peptone	10 กรัม
Meat extract	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5* กรัม
Bromcresol purple	0.02 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

3.2 Carbohydrate solutions (cellobiose และ lactose)

Carbohydrate solutions (cellobiose หรือ lactose)	5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100 มิลลิลิตร

ละลายน้ำตาลแต่ละชนิดในน้ำ ฆ่าเชื้อโดยการกรอง

การใช้งาน

นำน้ำตาลแต่ละชนิด (cellobiose หรือ lactose) ผสมลงใน base ในอัตราส่วน 1:9

4. Motility test medium

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุณหภูมิละลาย แบ่งใส่หลอด
ฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร 8 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

*เติมเกลือ (NaCl) โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสุดท้าย 2-3%



5. Phosphate buffered saline

Sodium chloride (NaCl)	7.65 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄), anhydrous	0.724 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.21 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อ
ที่ 121°C 15 นาที ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 N NaOH

6. Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar

Yeast extract	5 กรัม
Peptone	10 กรัม
Sucrose	20 กรัม
Sodium thiosulfate.5H ₂ O	10 กรัม
Sodium citrate.2H ₂ O	10 กรัม
Sodium cholate	3 กรัม
Oxgall	5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10 กรัม
Ferric citrate	1 กรัม
Bromthymol blue	0.04 กรัม
Thymol blue	0.04 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจนวุ้นละลาย pH 8.6 ± 0.2



7. Trypticase (tryptic) soy agar

Trypticase peptone	15 กรัม
Phytone peptone	5 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5* กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2 เย็นหลอด และปล่อยให้เย็นแข็ง

8. Trypticase (tryptic) soy broth

Trypticase peptone	17 กรัม
Phytone peptone	3 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5* กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	2.5 กรัม
Glucose	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

9. Tryptone broth and tryptone salt broths (T₁N₀, T₁N₁, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀)

Trypticase หรือ Tryptone	10 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	0, 10, 30, 60, 80, 100 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตรสำหรับ T₁N₀ ไม่ต้องเติม NaCl ส่วน T₁N₁, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈ และ T₁N₁₀ เติม NaCl 10, 30, 60, 80 และ 100 กรัม ตามลำดับ แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

*เติมเกลือ (NaCl) โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสุดท้าย 2-3%



10. Christensen's urea agar

10.1 Base medium

Peptone	1 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5* กรัม
Dextrose	1 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2 กรัม
Phenol red (6 ml of 1:500 solution)	0.012 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	900 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 900 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

10.2 Urea concentrate

Urea	20 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100 มิลลิลิตร

ละลาย Urea ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองการใช้งาน

เติม Urea concentrate 100 มิลลิลิตร ใน Base medium 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ aseptic technique pH 6.8 ± 0.1 แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ เอียงหลอดและปล่อยให้เย็นแข็ง โดยให้ส่วน butt มีความสูง 2 เซนติเมตร และส่วน slant มีความยาว 3 เซนติเมตร

*สำหรับ halophilic *Vibrio* spp. ซึ่งรวมถึง *V. parahaemolyticus* ให้เติมเกลือ (NaCl) เพิ่มอีก 15 กรัม เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีเกลือความเข้มข้นสุดท้าย 2%



สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β -galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	6.9	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH), 10 mol/l solution	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ละลาย NaH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

1.2 ONPG solution

o-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	15	มิลลิลิตร

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C

การใช้งาน

Buffer solution (ข้อ 1.1) 5 มิลลิลิตร กับ ONPG solution (ข้อ 1.2) 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. Oxidase reagent

<i>N, N, N', N'</i> - tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	1	กรัม
Dihydrochloride ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$)		
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

4. น้ำเกลือ 0.85% และ 2%

Sodium chloride (NaCl)	8.5 หรือ 20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0



ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) *V. parahaemolyticus* ในอาหารโดยวิธี MPN



ภาคผนวก 3

ตาราง MPN 3-3-3

Pos. tubes .10 .01 .001			MPN/g	Conf. Lim.		Pos. tubes .10 .01 .001			MPN/g	Conf. Lim.	
				Low	High					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	--



**DMSc F 2013: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมด
ในอาหาร โดยวิธี pour plate**
**Analytical method of aerobic plate count in food
by pour plate**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร ครอบคลุมการตรวจ
ปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001, Chapter 3
“Aerobic Plate Count”. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 25 กรกฎาคม 2557]. เข้าถึงได้ที่
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมด(mesophilic aerobes) ที่ยังมีชีวิตอยู่ในตัวอย่าง
ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างให้อยู่ในช่วงที่สามารถนับจำนวนของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์จะปรากฏ
เป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเรียกว่า “colony forming unit (CFU)” นับจำนวนโคโลนี แล้ว
คำนวณเป็นจำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง (aerobic plate count) และรายงาน
ผลเป็น CFU ต่อหน่วยของตัวอย่าง อาจใช้คำว่า total plate count, standard plate count, viable
plate count หรือ heterotrophic plate count แทน “aerobic plate count” ซึ่งสามารถตรวจสอบ
ด้วยวิธี conventional plate count method โดยนำตัวอย่างเริ่มต้น หรือที่เจือจางตามความเหมาะสม
(1:10 หรือ 1:100, ...) ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็ง
ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแข็ง นำไปบ่ม และนับจำนวน



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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Plate count agar (PCA)

5.1.2 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Butterfield's phosphate buffered - dilution water (BPB)

5.2 สารเคมี

-

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

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 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$

6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.7 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.4 ปิเปต (pipette)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)



7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับๆ ละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นหรือเครื่องตีผสมอาหาร 1-2 นาที (initial suspension หรือ primary dilution)

7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10 (initial suspension หรือ primary dilution)

7.2.3 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี conventional plate count method: ภาคผนวก 2

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate)

7.3.2 เท PCA ประมาณ 12-15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแข็ง แล้วพลิกจานเพาะเชื้ออีกด้านหนึ่งขึ้น (invert plates)

หมายเหตุ : ระยะเวลาตั้งแต่สิ้นสุดการทำ initial suspension หรือ primary dilution จนกระทั่งเทวุ้น ภายใน 15 นาที

7.3.3 บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างนม บ่มที่ 32°C 48 ± 2 ชั่วโมง

7.3.4 นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี ในจานเพาะเชื้อของ 2 ระดับการเจือจางที่ติดกัน



8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 นับจานเพาะเชื้อที่มี 25-250 โคโลนี โดยใช้เครื่องนับโคโลนี แล้วนำผลมาคำนวณตามสูตร

$$N = \frac{\Sigma C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times (d)}$$

เมื่อ N = จำนวนโคโลนีต่อกรัม หรือต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง
 ΣC = ผลรวมของจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้จากทุกจานเพาะเชื้อ
 n_1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางแรก
 n_2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางถัดไป
 d = ระดับการเจือจางแรกของการนับจำนวนโคโลนี

ตัวอย่าง โคโลนี

	1:100	1:1000
	232, 244	33, 28
N	$= \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}}$ $= 537/0.022$ $= 24,409$ $\approx 24,000$	

หมายเหตุ: การทำ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) ต่อระดับการเจือจาง ถ้าพบว่ามีจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง และไม่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี ให้เลือกเฉพาะจานที่อยู่ในช่วงมาใช้ในการคำนวณ

8.2 ถ้าทุกระดับการเจือจางมีจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อน้อยกว่า 25 โคโลนี ให้บันทึกผลเป็นค่าที่อ่านได้จริง แต่รายงานว่า น้อยกว่า 25 คูณด้วย $1/d$ เมื่อ d =dilution factor ของระดับการเจือจางแรกที่นับได้ และบันทึกผลเป็นค่าประมาณ (estimated aerobic plate count, EAPC)

ตัวอย่าง	โคโลนี	
	1:100	1:1000
	18	2
	0	0
		EAPC/ml (g)
		<2,500
		<2,500

8.3 ถ้าไม่มีจานเพาะเชื้อใดมีโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนี และแต่ละจานเพาะเชื้อมีน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนใกล้เคียง 250 มากที่สุด แล้วคูณด้วยระดับการเจือจาง และบันทึกผลเป็นค่าประมาณ (estimated aerobic plate count, EAPC)



ตัวอย่าง	โคโลนี	
1:100	1:1000	EAPC/ml (g)
TNTC	640	640,000

TNTC, too numerous to count

8.4 การนับโคโลนีที่แผ่กระจาย

โคโลนีที่แผ่กระจายแบ่งออกเป็น 3 ประเภทดังนี้

8.4.1 สายโคโลนีที่เรียงต่อเนื่องกัน ซึ่งเกิดจากกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่ไม่แยกจากกัน ขณะที่เทอาหารวันผสมกับตัวอย่าง

8.4.2 โคโลนีที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์ม (film) อยู่ระหว่างวัน และกันจานเพาะเชื้อ

8.4.3 โคโลนีที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มอยู่บริเวณขอบจานเพาะเชื้อ หรือบนผิวหน้าวัน การพิจารณาว่ามีการเจริญของโคโลนีที่แผ่กระจายขึ้นในจานเพาะเชื้อมากเกินไป และให้รายงานผลวิเคราะห์ว่า spreader (SPR) มีหลักเกณฑ์ดังนี้

ก. ถูกปกคลุมด้วยโคโลนีที่แผ่กระจาย รวมทั้งพื้นที่ทั้งหมดที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มีมากกว่า 50% ของพื้นที่จานเพาะเชื้อ

ข. พื้นที่ที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มีมากกว่า 25% ของพื้นที่จานเพาะเชื้อ

กรณีที่จานเพาะเชื้อมีโคโลนีที่แผ่กระจายขึ้น (นอกเหนือจาก ข้อ ก และ ข) และมีความจำเป็นต้องนับจำนวนให้นับว่า แต่ละโคโลนีที่แผ่กระจายเกิดจากแหล่งต้นกำเนิด 1 แหล่งดังนี้ มีโคโลนีที่แผ่กระจายแบบข้อ 8.4.1 จำนวน 1 สาย นับเป็น 1 โคโลนี ถ้ามีมากกว่า 1 สายและมีต้นกำเนิดจากแหล่งที่แยกจากกัน ให้นับแต่ละแหล่งเป็น 1 โคโลนี ไม่นับการเจริญแต่ละโคโลนีในสายเดียวกันเป็น 1 โคโลนี

สำหรับโคโลนีที่แผ่กระจายแบบข้อ 8.4.2 และ 8.4.3 มักขึ้นแยกให้เห็นเป็นโคโลนีที่ชัดเจน นับจำนวนโคโลนีของโคโลนีที่แผ่กระจาย และโคโลนีปกติรวมกัน เพื่อนำมาคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์



8.5 ถ้าหากงานเพาะเชื้อมีค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีมากกว่า 100 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้รายงานผลว่า มากกว่า 100 คุณด้วยระดับการเจือจางสูงสุดและคุณพื้นที่ของงานเพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบ บันทึกผลเป็นค่าประมาณ (estimated aerobic plate count, EAPC)

ตัวอย่าง	โคโลนี	
1:100	1:1000	EAPC/ml (g)
TNTC	7,150 ^(a)	>6,500,000
TNTC	6,490 ^(b)	>5,900,000

ตัวอย่างอ่านค่าเฉลี่ยของการนับได้ 110 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร

(a) พื้นที่ของงานเพาะเชื้อ 65 ตารางเซนติเมตร

(b) พื้นที่ของงานเพาะเชื้อ 59 ตารางเซนติเมตร

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

9.1 จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมด CFU/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4 แต่ถ้าตำแหน่งที่สามเป็น 5 ต้องดูตัวเลขตำแหน่งที่สอง หากตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคู่ ให้คงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม แต่ถ้าตัวเลขตำแหน่งที่สองเป็นเลขคี่ ให้เพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับ

ตัวอย่าง :	12,700	รายงานเป็น	13,000
	12,400	รายงานเป็น	12,000
	15,500	รายงานเป็น	16,000
	14,500	รายงานเป็น	14,000

10. รายละเอียดอื่น ๆ (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Plate count agar (PCA)

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

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

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

2.1 Stock solution

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH (NaOH 40 กรัม ละลายน้ำและเติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

2.2 Diluent

ปิเปต stock solution (ข้อ 2.1) 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่หลอด หรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที



ภาคผนวก 2

ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100,

↓
1 มิลลิลิตร (duplicate)

เท PCA 12-15 มิลลิลิตร

↓ 35 C 48 ± 2 ชั่วโมง
°

นับจำนวนโคโลนี (25-250 โคโลนี)

↓
คำนวณ

↓
รายงานผล

แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร



**DMSc F 2014: วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมด
ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate**
**Analytical method of Heterotrophic plate count in water
and ice by pour plate and spread plate**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ และน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington, D.C.; 2012. 9215 A-C, p. 9-49-9-56.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด หมายถึง จำนวน “live culturable heterotrophic bacteria”

4. หลักการ (Principle)

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในตัวอย่าง ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างให้อยู่ในช่วงที่สามารถนับจำนวนของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์ในตัวอย่างจะเจริญเป็นโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า “colony forming unit (CFU)” จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้นำไปคำนวณเป็นจำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง (heterotrophic plate count) และรายงานผลเป็น CFU ต่อหน่วยของตัวอย่าง อาจใช้คำว่า aerobic plate count, standard plate count, viable plate count หรือ total plate count แทน “heterotrophic plate count” ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยวิธี pour plate และ spread plate



4.1 วิธี pour plate

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็ง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แข็ง นำไปป่ม และนับจำนวนโคโลนี

4.2 วิธี spread plate

นำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง นำไปป่ม และนับจำนวนโคโลนี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Plate count agar (PCA) หรือ

5.1.2 R2A agar หรือ

5.1.3 NWRI agar (HPCA)

5.1.4 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ buffered water หรือ 0.1% peptone water

5.2 สารเคมี

-

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) 35°C และ $20^{\circ}\text{C} - 28^{\circ}\text{C}$

6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.6 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $44^{\circ}\text{C} - 46^{\circ}\text{C}$



6.2 เครื่องใช้

- 6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.2 แท่งแก้วอ (glass spreader)
- 6.2.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.4 ปิเปต (pipette)
- 6.2.5 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.6 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อให้ได้ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง เทตัวอย่างจากแต่ละหน่วยภาชนะบรรจุใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำให้ตัวอย่างละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

7.2.1 วิธี pour plate

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 100 เท่า (serial 100-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง (ภาคผนวก 2) ดังนี้

7.2.1.1 ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100

7.2.1.2 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10,000 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.2.2 วิธี spread plate

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 10 เท่า (serial 10-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจางตามความเหมาะสม เช่น ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ



7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate: ภาคผนวก 3

- 7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate)
- 7.3.2 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้ต่อไปที่ระดับเจือจางอื่น
- 7.3.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 10-12 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแข็ง แล้วพลิกจานเพาะเชื้ออีกด้านหนึ่งขึ้น (invert plates)
- หมายเหตุ:** ขั้นตอนตั้งแต่เจือจางตัวอย่างจนถึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อสุดท้ายไม่เกิน 20 นาที
- 7.3.4 บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง หรือที่ 20°C - 28°C 5-7 วัน
- 7.3.5 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อทุกโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ถ้าไม่สามารถนับโคโลนีหลังการบ่ม สามารถเลื่อนการนับได้ โดยเก็บจานเพาะเชื้อที่ 5°C - 10°C ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 4

- 7.4.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ หมุนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้วันแข็ง แล้วทำให้ผิวหน้าวันแข็ง
- 7.4.2 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจางอื่นๆ ตามต้องการ 0.1 ถึง 0.5 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) ใช้แท่งแก้วอเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวันแข็ง
- 7.4.3 บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง หรือที่ 20°C - 28°C 5-7 วัน
- หมายเหตุ:** ถ้าใช้ R2A agar จะให้ผลดีที่สุดเมื่อบ่ม 28°C 5-7 วัน หรือถ้าใช้ NWRI agar บ่มที่ 20°C 7 วัน
- 7.4.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อทุกโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ถ้าไม่สามารถนับโคโลนีหลังการบ่มได้ สามารถเลื่อนการนับได้ โดยเก็บจานเพาะเชื้อที่ 5°C - 10°C นานไม่เกิน 24 ชั่วโมง



8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 นับจานเพาะเชื้อที่มี 30-300 โคโลนี โดยใช้เครื่องนับโคโลนีแล้วนำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{CFU/มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างในจานเพาะเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

8.2 ถ้าไม่มีจานเพาะเชื้อใดมีโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี แต่มี 1 จานเพาะเชื้อ หรือมากกว่า มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนใกล้เคียง 300 มากที่สุด แล้วคำนวณตามสูตรในข้อ 8.1

8.3 ถ้าทุกจานเพาะเชื้อจากทุกระดับเจือจางไม่มีโคโลนีขึ้นเลย ให้รายงานเป็น น้อยกว่า 1 หน่วยด้วยปริมาตรตัวอย่างสูงสุดที่ใช้วิเคราะห์ เช่น ถ้าไม่มีโคโลนีขึ้นเลยจากตัวอย่างปริมาตรสูงสุด 0.01 มิลลิลิตรให้รายงานเป็น น้อยกว่า 100 CFU/มิลลิลิตร

8.4 ถ้าทุกจานเพาะเชื้อมีมากกว่า 300 โคโลนีให้นับจำนวนโคโลนีดังนี้

8.4.1 ถ้ามีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร (1 ช่องของเครื่องนับโคโลนี = 1 ตารางเซนติเมตร)

- สำหรับจานเพาะเชื้อแก้ว ขนาด 65 ตารางเซนติเมตร (100 × 15 มิลลิเมตร) ให้นับจำนวนโคโลนีรวมทั้งหมด 13 ช่อง โดยนับในแนวนอน 7 ช่อง แนวตั้ง 6 ช่อง และให้ช่องที่นับต่อเนื่องกัน ระวังอย่าอ่านช่องซ้ำ นำค่าที่ได้ทั้งหมดบวกกัน แล้วคูณด้วย 5
- สำหรับจานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาด 57 ตารางเซนติเมตร (90 × 15 มิลลิเมตร) ให้สุ่มนับโคโลนีรวมทั้งหมด 19 ช่อง นำค่าที่ได้ทั้งหมดบวกกันแล้วคูณด้วย 3

8.4.2 ถ้าจำนวนโคโลนีมีมากกว่า 100 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร สำหรับจานเพาะเชื้อแก้ว ให้รายงานมากกว่า 6,500 หน่วยด้วยปริมาตรตัวอย่างที่น้อยที่สุดในจานเพาะเชื้อที่ใช้วิเคราะห์ และสำหรับจานเพาะเชื้อพลาสติกให้รายงานมากกว่า 5,700 หน่วยด้วยปริมาตรตัวอย่างที่น้อยที่สุด



- 8.5 ถ้าจานเพาะเชื้อที่เลือกพบโคโลนีที่แผ่กระจายในจานเพาะเชื้อ (spreading colony) ให้นับเฉพาะโคโลนีที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวในบริเวณที่ไม่มีการแผ่กระจาย และบริเวณที่โคโลนีแผ่กระจายต้องครอบคลุมพื้นที่ไม่เกินครึ่งจานเพาะเชื้อ ถ้ามากเกินไปให้รายงานผลเป็น Spreaders (Spr.)
- 8.6 การนับโคโลนีที่แผ่กระจาย (spreader) ให้นับแต่ละลักษณะต่อไปนี้เป็น 1 โคโลนี
- 8.6.1 สายโคโลนีที่เรียงต่อเนื่องกัน ซึ่งเกิดจากกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่ไม่แยกจากกันขณะที่เทอาหารวันผสมกับตัวอย่าง
- 8.6.2 โคโลนีที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์ม (film) อยู่ระหว่างวัน และกันจานเพาะเชื้อ
- 8.6.3 โคโลนีที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มอยู่บริเวณขอบจานเพาะเชื้อ หรือบนผิวหน้าวัน
- 8.7 นับแยกโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกันและอยู่ใกล้กันมากแต่ไม่ติดกัน โดยมีระยะห่างกันอย่างน้อยเท่ากับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เล็กที่สุดที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ
- 8.8 นับแยกโคโลนีที่อยู่ติดกันแต่มีลักษณะโคโลนีหรือสีที่แตกต่างกัน

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

- 9.1 จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมด CFU/มิลลิลิตร
- 9.2 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ และเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 5, 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4

ตัวอย่าง :	35	รายงานเป็น	35
	789	รายงานเป็น	790
	142	รายงานเป็น	140

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

- 10.1 ภาควง 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 10.2 ภาควง 2: รูปการเจือจางตัวอย่างสำหรับวิธี pour plate
- 10.3 ภาควง 3: แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ และน้ำแข็งโดยวิธี pour plate
- 10.4 ภาควง 4: แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ และน้ำแข็งโดยวิธี spread plate



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Plate count agar (PCA)

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

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

2. R2A agar

Yeast extract	0.5 กรัม
Proteose peptone No. 3	0.5 กรัม
หรือ polypeptone	
Casamino acids	0.5 กรัม
Glucose	0.5 กรัม
Soluble starch	0.5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.3 กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05 กรัม
Sodium pyruvate	0.3 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ยกเว้นวัน ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย K_2HPO_4 หรือ KH_2HPO_4 เติมน้ำและให้ความร้อนจนวันละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 (ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปไม่ควรปรับ pH หลังฆ่าเชื้อ)



3. NWRI agar (HPCA)

Peptone	3 กรัม
Soluble casein	0.5 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.2 กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.05 กรัม
Ferric chloride ($FeCl_3$)	0.001 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอุ่นละลาย ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

4. Buffered water

4.1 Stock phosphate buffer solution

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	34 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

ละลาย KH_2PO_4 ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับเป็น pH 7.2 ด้วย 1 N NaOH (NaOH 40 กรัม ละลายน้ำ และเติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที แล้วเก็บแช่เย็น

4.2 Magnesium chloride stock solution

Magnesium chloride ($MgCl_2$)	38 กรัม
หรือ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	81.1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลาย $MgCl_2$ หรือ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที แล้วเก็บแช่เย็น

การใช้งาน

ปิเปต Stock phosphate buffer solution (ข้อ 4.1) 1.25 มิลลิลิตร และ Magnesium chloride stock solution (ข้อ 4.2) 5 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 7.2 ± 0.1

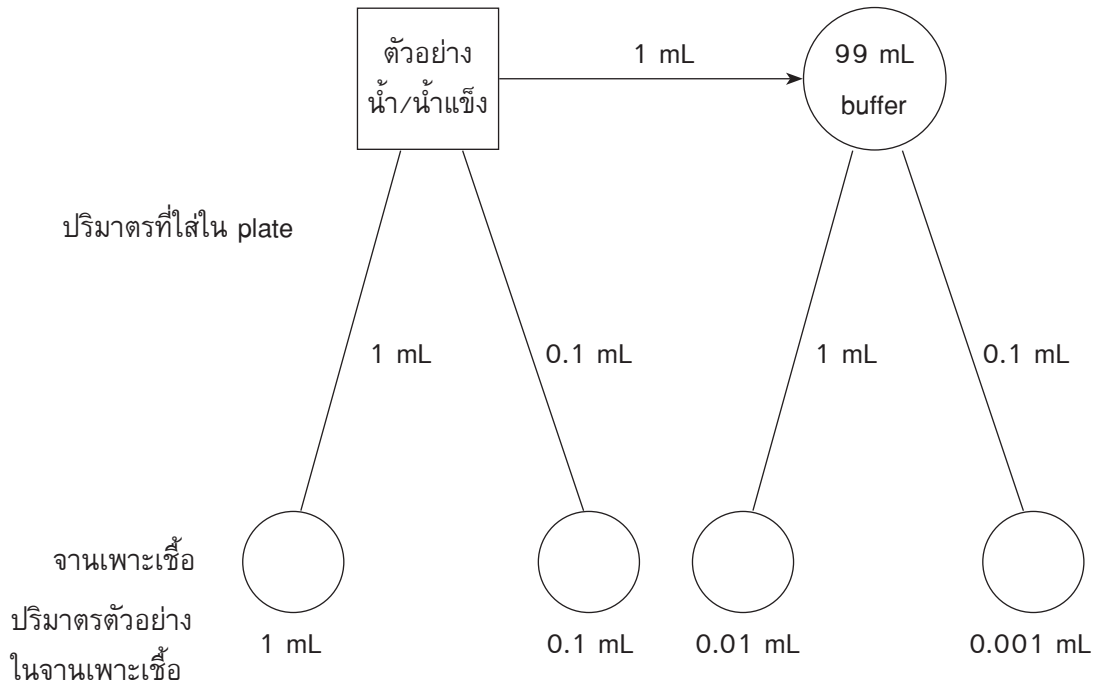
5. 0.1% Peptone water

Peptone	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 7.0 ± 0.2



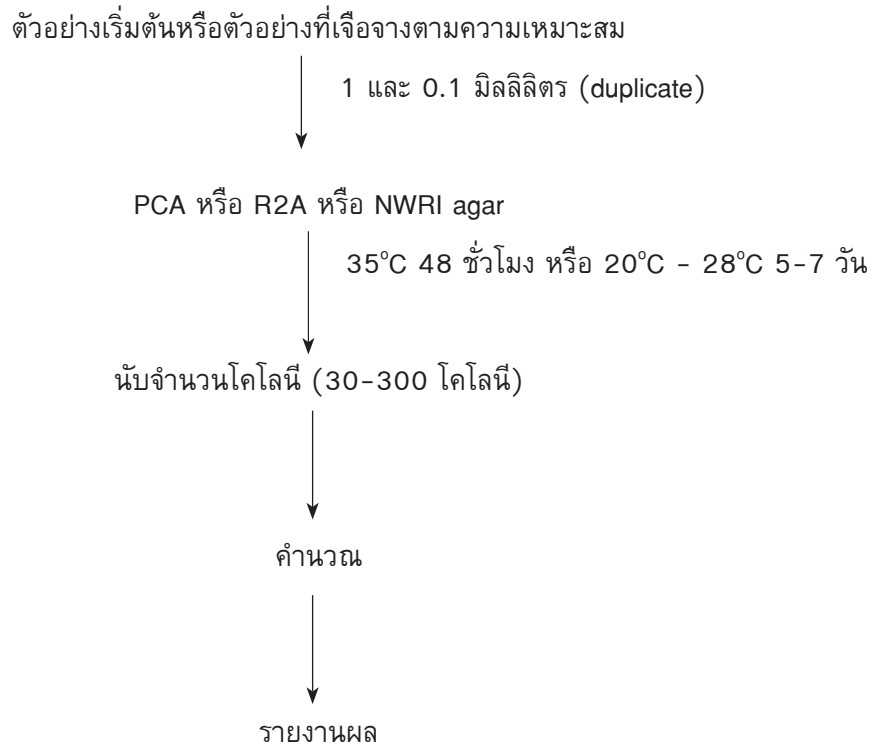
ภาคผนวก 2



รูปการเจือจางตัวอย่างสำหรับวิธี pour plate



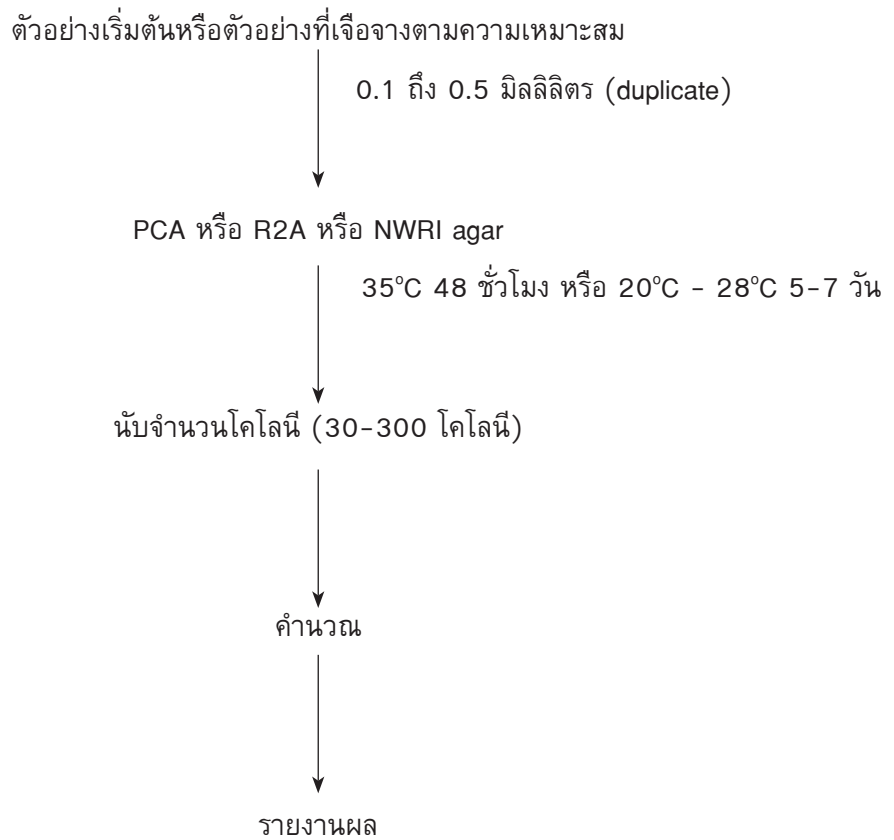
ภาคผนวก 3



แผนภูมิที่ 1 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ
และน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate



ภาคผนวก 4



แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ และน้ำแข็ง โดยวิธี spread plate

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1. นายทงพันธ์ สัจจปาละ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นายก่อเกียรติ ศาสตรินทร์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 3. นางสาวชั้นทอง เพ็ชรนอก | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 4. นายสมภพ วัฒนมณี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 5. นางปิยมาศ แจ่มศรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |



วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method type	หน้า
DMSc F 3001	ผักกระป๋อง	น้ำหนักสุทธิและน้ำหนักเนื้อ	I	203
DMSc F 3002	ผักกระป๋อง	ปริมาณน้ำอิสระ	I	205



DMSc F 3001: การวิเคราะห์น้ำหนักสุทธิและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง
Determination of net weight and drained weight
in canned vegetables

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักสุทธิและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

AOAC Official Method 968.30: Canned Vegetables Drained Weight

3. หลักการ (Principle)

ชั่งน้ำหนักอาหารที่ไม่รวมภาชนะบรรจุและชั่งน้ำหนักเนื้ออาหารโดยแยกส่วนที่เป็นของเหลวออก

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.01 กรัม
- 4.2 ตะแกรง (sieve)
- 4.3 ที่ปิดกระป๋อง

5. สารเคมี (Reagent)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

-

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ชั่งน้ำหนักของตัวอย่างพร้อมภาชนะบรรจุ บันทึกค่าที่อ่านได้
- 7.2 ชั่งน้ำหนักตะแกรง บันทึกค่าที่อ่านได้ โดยเลือกใช้ตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดบรรจุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.36 กิโลกรัม หรือ



ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดบรรจุมากกว่า 1.36 กิโลกรัม
มะเขือเทศกระป๋องใช้ตะแกรงเบอร์ 8 และเบอร์ 14 สำหรับมะเขือเทศสด

- 7.3 เปิดฝาภาชนะบรรจุ เทตัวอย่างลงบนตะแกรง เอียงตะแกรงทำมุม 17-20° เพื่อให้ของเหลวไหลออกได้สะดวก โดยไม่เคลื่อนตัวอย่าง ทั้งไว้ 2 นาที
- 7.4 เมื่อครบเวลา ชั่งน้ำหนักตะแกรงพร้อมตัวอย่าง บันทึกค่าที่อ่านได้
- 7.5 นำฝาและภาชนะเปล่าที่เทตัวอย่างออกในข้อ 7.3 ล้างทำความสะอาด นำไปผึ่งให้แห้ง
- 7.6 ชั่งน้ำหนักฝาและภาชนะเปล่าที่แห้ง บันทึกค่าที่อ่านได้

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

8.1.1 น้ำหนักสุทธิ = น้ำหนักของตัวอย่างพร้อมภาชนะ - น้ำหนักฝาและภาชนะเปล่าที่แห้ง

8.1.2 น้ำหนักเนื้ออาหาร = น้ำหนักตะแกรงพร้อมเนื้อตัวอย่าง - น้ำหนักตะแกรง

8.1.3 ร้อยละของน้ำหนักเนื้ออาหาร = $\frac{\text{น้ำหนักเนื้ออาหาร}}{\text{น้ำหนักสุทธิ}} \times 100$

8.2 การรายงานผล

8.2.1 รายงานน้ำหนักสุทธิ หน่วยเป็นกรัม หรือกิโลกรัม

8.2.2 รายงานน้ำหนักเนื้ออาหาร หน่วยเป็นกรัม หรือกิโลกรัม

9. การควบคุมผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ใช้หมายเลขตะแกรงตรงตามวิธีวิเคราะห์ และมีใบรับรองคุณภาพ (certificate of examination)

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

-



DMSc F 3002: การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง
Determination of water activity in canned vegetables

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง

2. เอกสารอ้างอิง (Normative references)

2.1 AOAC Official Method 978.18: Water activity of Canned Vegetables

2.2 American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington DC.: 2001. Chapter 64, p. 649–654.

3. หลักการ (Principle)

ค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เป็นอัตราส่วนของแรงดันไอของน้ำในผลิตภัณฑ์กับแรงดันไอของน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิเดียวกัน มีค่าเท่ากับ $1/100$ ของค่าความชื้นสัมพัทธ์ (Relative Humidity, RH) ของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในระบบปิด (closed system) ค่า RH สามารถคำนวณจากการวัดแรงดันไอโดยตรง หรือจากการวัดทางอ้อมโดยใช้หัววัดซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพ หรือทางไฟฟ้าที่สามารถแสดงค่า RH จากตัวอย่างอาหาร และต้องสอบเทียบเครื่องวัดโดยใช้เกลือมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องวัด water activity, a_w ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก คือ กล้องวัดตัวอย่างที่มีฉนวนหุ้ม เพื่อทำอุณหภูมิให้คงที่ และส่วนที่แสดงค่าอุณหภูมิ ค่า RH

4.2 ตลับใส่ตัวอย่าง

4.3 คีมคีบ

4.4 ขั้วนำไฟฟ้าตัวอย่าง

4.5 เครื่องปั่นผสมอาหาร



5. สารเคมี (Reagent)

เกลือมาตรฐาน (salt standards) ที่ใช้ในการสอบเทียบ เช่น

Salt	a_w
$MgCl_2$	0.328
K_2CO_3	0.432
$Mg(NO_3)_2$	0.529
NaBr	0.576
$CoCl_2$	0.649
$SrCl_2$	0.709
$NaNO_3$	0.743
NaCl	0.753
KBr	0.809
$(NH_4)_2SO_4$	0.810
KCl	0.843
$Sr(NO_3)_2$	0.851
$BaCl_2$	0.902
KNO_3	0.936
K_2SO_4	0.973

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 เปิดกระป๋องแล้วดำเนินการต่อทันที
- 6.2 ทำตัวอย่างผักให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยปั่นเป็นระยะเวลาสั้นๆ เพื่อไม่ให้เกิดความร้อนสูงเกินไปจะทำให้ค่า a_w ของตัวอย่างคลาดเคลื่อน
- 6.3 ใช้ช้อนตักตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันใส่ลงในตลับใส่ตัวอย่างทันทีโดยให้มีปริมาณเหมาะสม แต่ต้องไม่มากจนเกินไปจนรบกวนระบบการทำงานของเครื่อง



7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสอบเทียบเครื่องวัด a_w และการทวนสอบ

7.1.1 เปิดเครื่องทิ้งไว้เพื่อให้อุณหภูมิของเครื่องอ่านที่ 25°C

7.1.2 สอบเทียบเครื่องด้วยเกลือมาตรฐาน 2 ค่าที่ครอบคลุม และใกล้เคียงกับค่า a_w ของตัวอย่าง

7.1.3 ทำการทวนสอบด้วยเกลือมาตรฐานที่รู้ค่า a_w แต่ต่างรุ่นการผลิต

7.2 ขั้นตอนการวัดค่า a_w ในตัวอย่างอาหาร

7.2.1 นำตลับใส่ตัวอย่างมาใส่ในกล่องวัดตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง

7.2.2 รอจนเครื่องอ่านค่า a_w แสดงค่าคงที่ หรือค่าที่แตกต่างกันน้อยกว่า 0.01 ซึ่งระยะเวลาถึงจุดสมดุลจะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับชนิด และส่วนประกอบของตัวอย่างนั้น เช่น ถ้าเป็นตัวอย่างที่มีส่วนผสมของน้ำมันต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงกว่าจะถึงจุดสมดุล

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

ค่าปริมาณน้ำอิสระ = (ค่าปริมาณน้ำอิสระครั้งที่ 1 + ค่าปริมาณน้ำอิสระครั้งที่ 2)/2

8.2 การรายงานผล

รายงานค่า a_w ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 สอบเทียบ และทวนสอบเครื่องวัด a_w ทุกครั้งก่อนการใช้งาน

9.2 ตรวจตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicate)

9.3 การสุ่มตัวอย่างจะต้องทำอย่างรวดเร็วเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของตัวอย่างน้อยที่สุด

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 เกณฑ์ยอมรับของผลการทำซ้ำ 2 ครั้ง (Repeatability) ต้องมีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.01

10.2 เกณฑ์ยอมรับของการทวนสอบ ต้องมีดังนี้

- ค่าความแม่นยำ (accuracy) โดยคำนวณเป็นค่า % recovery ต้องอยู่ระหว่าง 97 - 103%
- ค่าความเที่ยง (precision หรือ RSD) ไม่เกิน 0.01



คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ที่ ๓๖๕ /๒๕๕๗

เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์อาหาร

.....

ตามที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้จัดทำโครงการกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์อาหาร เพื่อใช้ในการคัดเลือกและรับรองวิธีการวิเคราะห์อาหาร รวมทั้งจัดทำเอกสารวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยอาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหาร (Food Contact material) นั้น

เพื่อให้การดำเนินงานบรรลุผลตามเป้าหมายและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อประเทศ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงเห็นสมควรยกเลิก คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๒๒๔ /๒๕๕๔ ลง วันที่ ๗ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๕๔ และให้แต่งตั้งคณะทำงานกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์อาหาร รวม ๓ คณะ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

คณะที่ ๑ คณะทำงานวิชาการกำหนดหลักเกณฑ์และเงื่อนไขในการคัดเลือกวิธีวิเคราะห์อาหาร โดยประกอบด้วยบุคคลดังต่อไปนี้

- | | |
|---|-----------------------------|
| ๑. ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร | ประธานคณะทำงาน |
| ๒. ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหาร
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) | คณะทำงาน |
| ๓. ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) | คณะทำงาน |
| ๔. ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) | คณะทำงาน |
| ๕. ประธานคณะทำงาน คณะที่ ๒ | คณะทำงาน |
| ๖. ประธานคณะทำงาน คณะที่ ๓ | คณะทำงาน |
| ๗. เลขานุการคณะทำงาน คณะที่ ๒ | คณะทำงาน |
| ๘. เลขานุการคณะทำงาน คณะที่ ๓ | คณะทำงาน |
| ๙. นางนิตยา พันธุ์บัว | คณะทำงานและเลขานุการ |
| ๑๐. นางปวีณา พาณิชกุล | คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ |
| ๑๑. นางกรรณิการ์ นิ่มเล็ก | คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ |



ให้คณะทำงานคณะที่ ๑ มีอำนาจหน้าที่ดังนี้

๑. วางแผนและกำหนดหลักเกณฑ์การพิจารณาข้อมูลวิชาการเกี่ยวกับวิธีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยอาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหาร
๒. เสนอแนะหลักเกณฑ์และแนวทางการคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหาร ด้านเคมีและด้านจุลชีววิทยา GMOs และกายภาพ
๓. พิจารณาวិธีวิเคราะห์ที่จัดทำโดยคณะทำงาน ฯ ด้านเคมีและด้านจุลชีววิทยา GMOs และกายภาพ เพื่อนำไปใช้เป็นมาตรฐานของประเทศ
๔. กำหนดรูปแบบเอกสารวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร
๕. รวบรวม เรียบเรียง และจัดทำเอกสารวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร (ด้านบรรณาธิการ)
๖. ประสานงานกับโรงพิมพ์ในการจัดพิมพ์เอกสาร
๗. ปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย

คณะที่ ๒ คณะทำงานคัดเลือกวิธีการวิเคราะห์อาหารและจัดทำคู่มือวิธีการวิเคราะห์อาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหาร ด้านเคมี โดยประกอบด้วยบุคคลดังต่อไปนี้

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| ๑. นางกนกพร อธิสุข | ที่ปรึกษาคณะทำงาน |
| ๒. นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย | ที่ปรึกษาคณะทำงาน |
| ๓. นางนิภาภรณ์ ลักษณะสมยา | ประธานคณะทำงาน |
| ๔. นางสาวสุวรรณี ชีรภาพธรรมกุล | คณะทำงาน |
| ๕. นางกัญญา พุกสัน | คณะทำงาน |
| ๖. นางสาวปฐยา แสงวิรุฬห์ | คณะทำงาน |
| ๗. นางสาวสุธาทิพย์ วิทยชัยวุฒิวงศ์ | คณะทำงาน |
| ๘. นางสาวมยุรี อูรารุ่งโรจน์ | คณะทำงาน |
| ๙. นางสาวอรุณี ดนุศล | คณะทำงาน |
| ๑๐. นางสาวกรรณิกา จิตติยศรา | คณะทำงาน |
| ๑๑. นางจินตนา กิจเจริญวงศ์ | คณะทำงาน |
| ๑๒. นางสาวศศิธร หอมดำรงวงศ์ | คณะทำงาน |
| ๑๓. นางสาวพนาวลัย กลี้งกลางดอน | คณะทำงาน |
| ๑๔. นางสาวกิตติมา โสนะมิตร | คณะทำงาน |
| ๑๕. นางอุมา บริบูรณ์ | คณะทำงานและเลขานุการ |
| ๑๖. นางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ | คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ |



ให้คณะกรรมการคณะที่ ๒ มีอำนาจหน้าที่ดังต่อไปนี้

๑. รวบรวมและคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหารด้านเคมี ตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขที่กำหนดโดยคณะกรรมการคณะที่ ๑
๒. ปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย

คณะที่ ๓ คณะทำงานคัดเลือกวิธีวิเคราะห์และจัดทำคู่มือวิธีวิเคราะห์อาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหาร ด้านจุลชีววิทยา GMOs และกายภาพ โดยประกอบด้วยบุคคลดังต่อไปนี้

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| ๑. นายปรีชา จิ่งสมานกุล | ที่ปรึกษาคณะกรรมการ |
| ๒. นายทงนพพันธ์ สัจจपालะ | ประธานคณะกรรมการ |
| ๓. นางลดาพรรณ แสงคล้าย | คณะกรรมการ |
| ๔. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร | คณะกรรมการ |
| ๕. นางสาวอุรารัตน์ วุฒิกรภักดิ์ | คณะกรรมการ |
| ๖. นางอัชฌา สัจจपालะ | คณะกรรมการ |
| ๗. นางนิตยา พันธุ์บัว | คณะกรรมการ |
| ๘. นางลดาวัลย์ จิ่งสมานกุล | คณะกรรมการ |
| ๙. นางสาวมณฑนา พันธุ์บัวหลวง | คณะกรรมการ |
| ๑๐. นางปวีณา พานิชกุล | คณะกรรมการ |
| ๑๑. นางปิยมาศ แจ่มศรี | คณะกรรมการและเลขานุการ |
| ๑๒. นายสมภพ วัฒนมณี | คณะกรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ |
| ๑๓. นางสาวกรรณา ตีรสมิทธิ์ | คณะกรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ |

ให้คณะกรรมการคณะที่ ๓ มีอำนาจหน้าที่ดังต่อไปนี้

๑. รวบรวมและเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร น้ำ เครื่องดื่ม วัสดุสัมผัสอาหารด้านจุลชีววิทยา GMOs และกายภาพตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขที่กำหนดโดยคณะกรรมการคณะที่ ๑
๒. ปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๒๕ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๕๗

(นางจุรีภรณ์ บุณยวงศ์โรจน์)
รองอธิบดี ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

