

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 7

Standard Methods for Food Analysis

Volume VII



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 7

Standard Methods for Food Analysis

Volume VII



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 7

Standard Methods for Food Analysis, Volume VII

พิมพ์ครั้งที่ 1: สิงหาคม 2562

จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN: 978-616-11-4037-3

สงวนลิขสิทธิ์

ที่ปรึกษา

นายอรรถ หนันขัติ

ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร

นางอุมมา บริบูรณ์

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี

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

โทรศัพท์/ โทรสาร 0 2951 1021

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

พิมพ์ที่

บริษัท เอ็นซี คอนเซ็ปต์ จำกัด

ที่อยู่ 15 ซอยจรัญสนิทวงศ์ 78 แขวงบางอ้อ

เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700

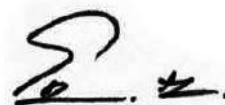
โทรศัพท์ 02-8800191

โทรสาร 02-8800191

คำปรารภ

ภายใต้แผนกลยุทธ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปี พ.ศ. 2562-2565 ซึ่งเชื่อมโยงกับแผนยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี และเป้าหมายของกระทรวงสาธารณสุข เพื่อให้เกิดผลสัมฤทธิ์นั้น หนึ่งในเป้าหมายสำคัญคือ ประชาชนได้รับบริการ การตรวจวิเคราะห์และรายงานผลที่ตอบสนองสถานการณ์ต่างๆ อย่างทันเหตุการณ์ ด้วยระบบห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐาน เพื่อสนับสนุนการพัฒนาที่มั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืนของประเทศ ซึ่งการพัฒนางานองค์ความรู้ในการตรวจวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเสริมสร้างมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศ และจัดทำเป็นหนังสือเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้ให้กับห้องปฏิบัติการอื่นๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ ลดข้อโต้แย้งด้านความปลอดภัยอาหาร หรือใช้กำกับดูแล ควบคุมคุณภาพอาหาร ให้ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดของกฎหมาย วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารซึ่งได้จัดทำมาต่อเนื่องเป็นเล่มที่ 7 โดยเล่มนี้ประกอบด้วยวิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมี จุลชีววิทยา กายภาพ และชีวโมเลกุล รวมทั้งสิ้นจำนวน 18 วิธี วิธีวิเคราะห์เหล่านี้ได้ผ่านการคัดเลือกตามหลักเกณฑ์ทางคุณภาพและประสิทธิภาพมาแล้ว จึงหวังว่าหน่วยงานและห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับงานตรวจวิเคราะห์อาหารของประเทศได้นำไปใช้ประโยชน์ ทั้งในการแก้ปัญหาสาธารณสุข เสริมสร้างสุขภาพที่ดีแก่ประชาชน และส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศได้ต่อไป



(นายแพทย์โอภาส การย์กวินพงศ์)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

10 กรกฎาคม 2562

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	7
นิยามและคำย่อ	9
รหัสวิธี	12
DMSc F 1091: การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหลายชนิดในน้ำโดย ICP-OES	13
DMSc F 1092: การวิเคราะห์ไขมันอิ่มตัวในอาหาร	19
DMSc F 1093: การตรวจเอกลักษณ์สีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำในอาหารโดย paper chromatography	29
DMSc F 1094: การวิเคราะห์ปริมาณสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำในอาหารโดย HPLC	35
DMSc F 1095: การวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในนมและผลิตภัณฑ์โดย LC-MS/MS	45
DMSc F 1096: การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมที่สกัดได้จาก ภาชนะเซรามิกโดย FAAS	53
DMSc F 1097: การวิเคราะห์ปริมาณ caprolactam ที่แพร่จากวัสดุสัมผัสอาหาร ชนิดไนลอน	59
DMSc F 1098: การวิเคราะห์ปริมาณ 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine ที่แพร่จากภาชนะบรรจุอาหารลงสู่อาหารจำลอง	67
DMSc F 1099: การวิเคราะห์สาร antimicrobial ในเนื้อสัตว์โดย LC-MS/MS	73
วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	99
นิยามและคำย่อ	100
รหัสวิธี	100
DMSc F 2038: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium</i> spp. ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	101
DMSc F 2039: วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Campylobacter</i> spp. ในห้วงโซ่อาหาร	109
วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	129
รหัสวิธี	130
DMSc F 3006: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบ้าในชา	131
DMSc F 3007: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอม ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทดอง	137
DMSc F 3008: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบ้าในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้งสาลี	143

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสวิธี	149 150
DMSc F 4021: Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MIR162 (SYN-IR162-4)	151
DMSc F 4022: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MON88017-3	157
DMSc F 4023: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of soy event DP305423-1	163
DMSc F 4024: Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for detection of soy event MON89788-1	169
ภาคผนวก	
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1	175
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2	177
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3	179
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4	182
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5	184
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 6	186

วิธีมาตรฐานทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางอุมมา บริบูรณ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางสาวสุรชาติพิย์ วิทย์ชัยวุฒิวงศ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 3. นางสาวกรรณิกา จิตติยศรา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางสาวปุษยา แสงวิรุฬห์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 6. นางสาวอรุณี ดนุศล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 7. นางสาวศศิธร หอมดำรงคั้งส์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 8. นางสาวพนาวลัย กลิ่งกลางคอน | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 9. นางสาวจันทร์เพ็ญ โดวียานนท์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 10. นางสาวนฤมล อีฐรัตน์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. กรด และ ด่าง หมายถึง กรด และ ด่าง ที่มีความเข้มข้นดังในตาราง ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ

	ความเข้มข้น
Sulfuric acid	95.0-98.0% H_2SO_4
Hydrochloric acid	36.5-38.0% HCl
Nitric acid	69.0-71.0% HNO_3
Acetic acid	$\geq 99.7\%$ CH_3COOH
Ammonium hydroxide	28-30% NH_3
Phosphoric acid	$\geq 85\%$ H_3PO_4

2. คำย่อที่ใช้ และ คำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
$^{\circ}C$	Degree Celsius
cm	Centimeter
DAD	Diode array detector
dm	Decimeter
diam., $\varnothing$	Diameter
ESI	Electrospray ionization
eV	Electron volt
FAAS	Flame atomic absorption spectrophotometer
g	Gram
GC	Gas Chromatography
GLC	Gas - Liquid Chromatography
GC-FID	Gas Chromatography – Flame Ionization Detector
HPLC	High performance liquid chromatography
h	Hour
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometer
id	Inner diameter or dimension

Abbreviation	Word/คำเต็ม
kg	Kilogram
L	Liter
LC	Liquid chromatograph
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
m	Meter, milli – as prefix
M	Molar
MeOH	Methanol, CH ₃ OH
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Mass spectrometer
MW	Molecular weight
MRM	Multiple reaction monitoring
MΩ	Megaohm
N	Normal
ng	Nanogram
od	Outer diameter or dimension
ppm	Part per million
ppb	Part per billion
psig	Pounds per square inch gauge
rpm	Round per minute
s	Second
SD	Standard deviation
% RSD	Percent relative standard deviation

Abbreviation	Word/คำเต็ม
V	Volt
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
wt	Weight
μg	Microgram (10^{-6} g)
μL	Microliter (10^{-6} L)
μm	Micron, micrometer (10^{-6} m)
/	Per
%	Percent
>	more than
<	less than
$\geq$	equal to and more than
$\leq$	equal to and less than

วิทยาลัยการแพทย์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1091	น้ำ	การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหลายชนิดในน้ำโดย ICP-OES	III	13
DMSc F 1092	อาหาร	การวิเคราะห์ไขมันอิ่มตัวในอาหาร	II	19
DMSc F 1093	อาหาร	การตรวจเอกลักษณ์สีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำในอาหารโดย paper chromatography	III	29
DMSc F 1094	อาหาร	การวิเคราะห์ปริมาณสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำในอาหารโดย HPLC	III	35
DMSc F 1095	นมและผลิตภัณฑ์	การวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในนมและผลิตภัณฑ์โดย LC-MS/MS	III	45
DMSc F 1096	ภาชนะบรรจุอาหาร	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมที่สกัดได้จากภาชนะเซรามิกโดย FAAS	I	53
DMSc F 1097	ภาชนะบรรจุอาหาร	การวิเคราะห์ปริมาณ caprolactam ที่แพร่จากวัสดุสัมผัสอาหารชนิดไนลอน	I	59
DMSc F 1098	ภาชนะบรรจุอาหาร	การวิเคราะห์ปริมาณ 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine ที่แพร่จากภาชนะบรรจุอาหารลงสู่อาหารจำลอง	I	67
DMSc F 1099	เนื้อสัตว์	การวิเคราะห์สาร antimicrobial ในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS	III	73

DMSc F 1091: การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหลายชนิดในน้ำโดย ICP-OES

Determination of metals in water by ICP-OES

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโลหะ 14 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม (Cd) โครเมียม (Cr) ทองแดง (Cu) เหล็ก (Fe) ตะกั่ว (Pb) แมงกานีส (Mn) เงิน (Ag) สังกะสี (Zn) อะลูมิเนียม (Al) นิกเกิล (Ni) ซีลีเนียม (Se) แบเรียม (Ba) สารหนู (As) และพลวง (Sb) ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำประปา และน้ำจากแหล่งอื่น ๆ ยกเว้นน้ำเสีย ในระดับ mg/l โดยเทคนิค ICP-OES

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D., Clesceri L.S., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition, American Public Health Association, Washington DC, 3120 B, Inductively Coupled Plasma Method; 2017. P. 3: 42-48.
- 2.2 คู่มือการใช้งานเครื่อง ICP-OES และ คู่มือ PerkinElmer Syngistix™ Software (Optima 8300) บริษัท เพอร์กินเอลเมอร์ จำกัด

3. หลักการ (Principle)

ย่อยตัวอย่างด้วย HNO_3 ภายใต้ความร้อน จนกระทั่งเข้มข้น และปรับปริมาตรด้วย H_2O วัดปริมาณโลหะด้วย ICP-OES ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยความร้อนจากพลาสมา (plasma) ที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 6,000-10,000 K (เคลวิน) ตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไอ (aerosol) โดย nebulizer และถูกพลาสมาเหนี่ยวนำเกิดเป็นอะตอมอิสระเปลี่ยนจากสถานะพื้นเป็นสถานะถูกกระตุ้น อะตอมจะปลดปล่อยพลังงานในรูปแสง (photo energy) ที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกันตามชนิดของธาตุ และมีความเข้มแสง (intensity) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของธาตุชนิดนั้น ๆ ในสารละลายตัวอย่าง

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 ICP-OES system

4.1.2 Hot plate

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Beaker ขนาด 250 ml

4.2.2 Volumetric flask ขนาด 25, 100, 1,000 ml

4.2.3 Volumetric pipette ขนาด 100 ml

4.2.4 Graduate pipette ขนาด 10 ml

4.2.4 Micropipette ขนาด 0.5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l พร้อม tip

4.2.5 หลอดขนาด 10, 50 ml

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 HNO_3 , 65% (w/w)

5.2 สารละลายกรด HNO_3 : เติม HNO_3 (ข้อ 5.1) 10 ml ใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml ที่มี H_2O อยู่และปรับปริมาตรด้วย H_2O จนครบ

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

5.3.1 Stock standard solution Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ag, Zn, Al, Ni, Se, Ba, As, Sb (1,000 mg/l) ที่สามารถสอบกลับได้ (traceable to SI unit หรือ CRM)

5.3.2 Intermediate standard solution Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ag, Zn, Al, Ni, Se, Ba, As, Sb (100 mg/l): เจือจาง Stock standard solution (ข้อ 5.3.1) 10 เท่า ด้วยสารละลายกรด HNO_3 (ข้อ 5.2)

5.3.3 Working standard solution Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ag, Zn, Al, Ni, Se, Ba, As, และ Sb ความเข้มข้นดังตารางที่ 1 เตรียมใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรด HNO_3 (ข้อ 5.2) และเทใส่หลอดขนาด 50 ml นำไปวิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ Working standard solution

โลหะ	Working standard solution (mg/l)				
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
Cd	0.004	0.008	0.02	0.04	0.08
Sb	0.004	0.008	0.02	0.04	0.08
Ni	0.004	0.01	0.02	0.04	0.08
Se	0.01	0.02	0.04	0.08	0.12
As	0.008	0.02	0.04	0.08	0.12
Pb	0.01	0.02	0.04	0.08	0.10
Cr	0.008	0.02	0.04	0.08	0.12
Mn	0.008	0.02	0.05	0.10	0.20
Ag	0.008	0.02	0.04	0.08	0.12
Al	0.02	0.05	0.10	0.20	0.30
Zn	0.04	0.10	0.20	0.40	0.80
Fe	0.02	0.05	0.20	0.40	0.80
Cu	0.01	0.05	0.20	0.40	0.80
Ba	0.008	0.05	0.20	0.40	0.80

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างน้ำ: สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง: สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 pipette ตัวอย่าง 100 ml ลงใน beaker ขนาด 250 ml

7.2 เติม HNO_3 65% (w/w) 0.5 ml

7.3 Digest บน hot plate ในตู้ดูดควัน (ระวังอย่าให้เดือด) จนปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 10 ml (ปล่อยให้เย็น)

7.4 เทใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml และปรับปริมาตรจนครบด้วย H_2O

7.5 วิเคราะห์ปริมาณโลหะด้วยเครื่อง ICP-OES มี instrument parameter ตารางที่ 2

7.6 วิเคราะห์ method blank และ spiked blank ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 instrument parameter

รายการ	ชนิด/การใช้งาน
Nebulizer	Concentric glass
Spray chamber	Cyclonic spray chamber
Torch	Quartz torch (demountable)
Injector	2.0 mm I.D. alumina injector
Mode	Simultaneous
Plasma condition	Aqueous
Purge gas flow (Nitrogen 99.999%)	Normal
RF Power	1500 Watts
Pump flow rate	1.50 ml/min
Gas flow	Argon (99.995%)
- Plasma flow	- Plasma flow 10 l/min
- Auxiliary flow	- Auxiliary flow 0.2 l/min
- Nebulizer flow	- Nebulizer flow 0.60 l/min
ระบบแก๊ส	
- Argon (99.995%)	ความดัน 80-120 psi
- Nitrogen (99.999%)	ความดัน 40-120 psi
- Air	ความดัน 80-120 psi

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

คำนวณปริมาณโลหะแต่ละชนิดจากสูตร

$$C = (C_0 - C_B) * F$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของโลหะแต่ละชนิดในตัวอย่าง (mg/l)

C_0 = ความเข้มข้นของโลหะแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่าง (mg/l)

C_B = ความเข้มข้นของโลหะแต่ละชนิดในสารละลาย method blank (mg/l)

F = dilution factor หรือ concentration factor

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ก่อนเริ่มทำการฟลักซ์มาตรฐานต้องทำ Hg realign เพื่อตรวจสอบการ drift ของเครื่อง และทำ align view ทั้ง axial และ radial
- 9.2 ตรวจสอบการ drift ของเครื่องโดยการวัด working standard solution 1 จุด (check standard) หลังการวัดตัวอย่างทุก 10 -12 ตัวอย่าง
- 9.3 วิเคราะห์ method blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง
- 9.4 วิเคราะห์ spiked blank และ duplicate sample เพื่อประเมิน % recovery และ % RPD ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
- 9.5 เกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 3 เกณฑ์การยอมรับ ผลวิเคราะห์ QC ชนิดต่างๆ

QC ชนิดต่าง ๆ	เกณฑ์การยอมรับ
Check standard	90 – 110%
Method blank	น้อยกว่า LOD
Spiked blank	ใช้ recovery control chart ในการควบคุมคุณภาพ
Duplicate analysis	% RPD $\leq$ 28

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 การเก็บรักษาตัวอย่าง ใช้ HNO_3 ทำให้ตัวอย่างมี $\text{pH} < 2$

10.2 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ Cd, Cr, Cu, Fe, และ Pb

คุณสมบัติ	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb
Linearity range (mg/L)	0.004-0.08	0.008-0.12	0.01-0.80	0.02-0.80	0.004-0.10
LOD (mg/L)	0.0002	0.0005	0.002	0.002	0.001
LOQ (mg/L)	0.001	0.002	0.003	0.005	0.002
%Recovery	90-102	91-100	87-106	96-109	91-108
%RSD _r	0.4-1.9	0.4-2.1	0.7-8.3	1.2-6.9	2.3-8.4

ตารางที่ 5 คุณสมบัติเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ Mn, Ag, Zn, Al, และ Ni

คุณสมบัติ	Mn	Ag	Zn	Al	Ni
Linearity range (mg/L)	0.008-0.20	0.008-0.12	0.04-0.80	0.02-0.30	0.004-0.08
LOD (mg/L)	0.0005	0.0001	0.006	0.004	0.0005
LOQ (mg/L)	0.002	0.002	0.01	0.005	0.001
%Recovery	89-101	85-106	94-101	99-107	95-101
%RSD _r	0.7-1.8	0.6-8.1	0.9-4.9	2.5-15.4	0.6-8.0

ตารางที่ 6 คุณสมบัติเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ Se, Ba, As, และ Sb

คุณสมบัติ	Se	Ba	As	Sb
Linearity range (mg/L)	0.01-0.12	0.008-0.80	0.008-0.12	0.004-0.08
LOD (mg/L)	0.001	0.001	0.001	0.0005
LOQ (mg/L)	0.003	0.002	0.002	0.001
%Recovery	85-99	90-103	81-110	87-102
%RSD _r	2.3-9.7	0.6-2.2	3.1-15.3	3.0-18.4

DMSc F 1092: การวิเคราะห์ไขมันอิ่มตัวในอาหาร

Determination of saturated fat in foods

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันอิ่มตัวในน้ำมันและไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหาร และ ผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิค gas chromatography มีขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) 0.1 g/ 100 g

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 996.06 Fat (Total, Saturated and Unsaturated) in Foods.

3. หลักการ (Principle)

ไขมันและกรดไขมันถูกสกัดออกจากอาหารด้วยการย่อย อาหารและผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่ถูกย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) อาหารที่เป็นนม ผลิตภัณฑ์ของนม (dairy products) ใช้การย่อยด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) และอาหารประเภทเนยแข็ง (cheese) จะถูกทำการย่อยด้วยทั้งกรดและด่าง น้ำมันและไขมันที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลาย ether จะผ่านการทำปฏิกิริยา saponification และเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ในรูปของ methyl ester เพื่อความคงตัวและง่ายต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GLC กรดไขมันอิ่มตัวแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้จะถูกนำไปคำนวณหาปริมาณไขมันอิ่มตัวที่มีอยู่ในอาหาร

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 GC-FID

4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.3 Blender

4.1.4 Water bath แบบควบคุมอุณหภูมิ

4.1.5 Shaker

4.1.6 Vortex mixer

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 ชุด condenser

4.2.2 Separatory funnel ขนาด 250 ml

4.2.3 Flat bottom flask ขนาด 50 ml

4.2.4 Measuring cylinder ขนาด 10, 50 และ 100 ml

4.2.5 Volumetric flask ขนาด 10, 20, 100, 250, 500 และ 1,000 ml

4.2.6 Beaker ขนาด 25, 50, 100, 500 และ 1,000 ml

4.2.7 Glass tube ขนาดประมาณ 1 x 12 cm และ 2 x 19 cm

4.2.8 Sample vial พร้อมฝาปิด

4.2.9 Auto pipette ขนาด 5 ml

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) เป็นน้ำกลั่น 3 ครั้งหรือน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 Diethyl ether

5.2 Petroleum ether, 40-60 °C

5.3 n-Heptane

5.4 Ethanol, absolute

5.5 Hydrochloric acid (HCL), ($\sim 37\%$, 12 M)

5.6 Pyrogalllic acids

5.7 Anhydrous sodium sulfate

5.8 Phenolphthalein

5.9 Ammonium hydroxide (NH_4OH); (58% w/w) หรือใช้ 25% w/w ในปริมาณ 2 เท่า

5.10 Sodium hydroxide

5.11 BF_3 14% in methanol (reagent สำเร็จรูป)

5.12 Ethanol (95% v/v) : ตวงน้ำ 5 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml
ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol

- 5.13 Phenolphthalein (1% w/v) : ละลาย phenolphthalein 1 g ด้วย ethanol 95% v/v แล้วปรับปริมาตรครบ 100 ml เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 5.14 Hydrochloric acid 8.3 M : ตวง hydrochloric acid (~37%, 12 M) ปริมาตร 250 ml ลงในน้ำปริมาตร 110 ml ผสมให้เข้ากัน
- 5.15 Sodium hydroxide 0.5 M in methanol : ละลาย sodium hydroxide 1 g ด้วย methanol แล้วปรับปริมาตรครบ 50 ml (หากเกิดตะกอนขาวของ sodium carbonate ในขณะเก็บรักษาให้ทิ้งไปและเตรียมใหม่)
- 5.16 ตัวทำละลายผสม (diethyl ether : petroleum ether 1:1 v/v)
- 5.17 Saturated sodium chloride : ละลาย sodium chloride ในน้ำจนอิ่มตัวและเหลือ sodium chloride อยู่ในสารละลาย
- 5.18 สารมาตรฐาน (Standards)
- 5.18.1 Triglyceride internal standard solution (C 11: 0, triundecanoin 5.00 mg/ml in n- heptane) C 11: 0, triundecanoin (purity > 99%) ถูกเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งก่อนนำมาใช้ ชั่งน้ำหนักสารเมื่อถึงอุณหภูมิห้องในช่วง 0.1000 ถึง 0.1005 g ละลายด้วย n-heptane และปรับปริมาตรครบ 20 ml ผสมให้เข้ากัน สามารถเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ได้นานประมาณ 1 เดือน
- 5.18.2 Mixed fatty acid methyl esters (FAMES) standard solution ชั่ง standard (GLC Reference Standard 674, Nu-Chek Prep, Inc.) น้ำหนักประมาณ 0.10 g ละลายด้วย n-heptane ปรับปริมาตรครบ 10 ml ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานประมาณ 10 mg/ml สารละลายนี้ถ่ายใส่ vial แบ่งเก็บเป็น portion ซึ่งแต่ละ portion เก็บได้นานประมาณ 3 เดือน หลังจากเริ่มใช้ และพ่น N_2 ก่อนปิดสนิท เก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง หลังนำไปฉีดอาจต้องคอยเปลี่ยนฝาปิดเพื่อให้ปิดสนิท และคอยตรวจสอบ fatty acids profile ที่ได้

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างอาหารที่สุ่มมาทั้งหมดประมาณ 300 - 500 g ผสมคลุกให้เข้ากันแล้วบดปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน หากตัวอย่างมีความเหนียวหรือตัวอย่างที่บดปั่นแล้วเกิดการแยกตัวของน้ำมันหรือจับตัวกันเป็นก้อน ควรใช้วิธีหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การย่อย (hydrolysis)

7.1.1 อาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร (acid hydrolysis)

7.1.1.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนในช่วงน้ำหนัก 0.2 - 3 g
(มีไขมัน 0.1 - 0.2 g) อาหารประเภทเครื่องดื่มอาจชั่งน้ำหนักมากขึ้น
ในช่วง 5 - 10 g ลงในหลอดแก้วขนาด 2 x 19 cm

7.1.1.2 เติม pyrogalllic acids 0.1 g

7.1.1.3 บีบ triglyceride internal standard solution 2 ml ลงในหลอด

7.1.1.4 ใส่ glass bead 2 - 3 เม็ด และเติม ethanol (ข้อ 5.12) 2 ml
ผสมให้เข้ากัน

7.1.1.5 เติม HCl 8.3 M 10 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

7.1.1.6 วางหลอดลงใน rack ที่อยู่ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 70 - 80 °C
เป็นเวลา 40 min โดยนำออกเขย่าด้วย vortex mixer ทุกๆ 10 min
เพื่อป้องกันการจับตัวที่ข้างหลอด เมื่อครบเวลานำออกวางไว้ที่
อุณหภูมิห้อง

7.1.1.7 เติม ethanol (ข้อ 5.12) มากเพียงพอ 10 - 15 ml เขย่าผสมเบาๆ
ให้เข้ากันแล้วจึงนำไปสู่ขั้นตอนของการสกัด

7.1.2 นมและผลิตภัณฑ์นม (dairy products) (alkaline hydrolysis)

7.1.2.1 ดำเนินขั้นตอนตามข้อ 7.1.1.1 ถึง 7.1.1.4

7.1.2.2 เติมน้ำ 4 ml ผสมให้เข้ากัน

7.1.2.3 เติม NH_4OH (ข้อ 5.9) 2 ml เขย่าผสมให้เข้ากัน

7.1.2.4 วางหลอดลงใน rack ที่อยู่ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 70 - 80 °C
เป็นเวลา 10 min โดยนำออกเขย่าด้วย vortex mixer ทุกๆ 5 min
เพื่อป้องกันการจับตัวที่ข้างหลอด

7.1.2.5 นำหลอดออกจาก water bath หยด phenolphthalein (ข้อ 5.13)

2 - 3 หยด หากไม่พบสีชมพู ให้เติม NH_4OH (ข้อ 5.9) จนสารละลาย
มีสีชมพู

7.1.2.6 เติม ethanol (ข้อ 5.12) มากเพียงพอ 10 - 15 ml เขย่าผสมเบาๆ ให้เข้ากันแล้วจึงนำไปสู่ขั้นตอนของการสกัด

7.1.3 เนยแข็ง (cheese) (alkaline และ acid hydrolysis)

7.1.3.1 ดำเนินขั้นตอนตามข้อ 7.1.2.1 ถึง 7.1.2.3

7.1.3.2 วางหลอดลงใน rack ที่อยู่ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 70 - 80 °C เป็นเวลา 20 min โดยนำออกเขย่าด้วย vortex mixer ทุกๆ 10 min เพื่อป้องกันการจับตัวที่ข้างหลอด

7.1.3.3 นำหลอดออกจาก water bath สักพักค่อยๆ เติม HCl 12 M 10 ml ผสมเบาๆ ให้เข้ากันแล้วนำกลับไปวางใน water bath อุณหภูมิประมาณ 70 - 80 °C เป็นเวลา 20 min โดยนำออกเขย่าด้วย vortex mixer ทุกๆ 10 min เพื่อป้องกันการจับตัวที่ข้างหลอด เมื่อครบเวลานำออกวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7.1.3.4 เติม ethanol (ข้อ 5.12) มากเพียงพอ 10 - 15 ml เขย่าผสมเบาๆ ให้เข้ากันแล้วจึงนำไปสู่ขั้นตอนของการสกัด

7.2 การสกัด (extraction)

7.2.1 ถ่ายสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วลงในกรวยแยก ล้างหลอดด้วยตัวทำละลายผสม (ข้อ 5.16) ตามลงไป

7.2.2 เติม diethyl ether 25 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 min จากนั้นเติม petroleum ether 25 ml เขย่าต่ออีกเป็นเวลา 5 min ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างชัดเจน ไขสารละลายชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่างทิ้งไป

7.2.3 เทสารละลายชั้นบนผ่านกรวยแก้วที่มี anhydrous sodium sulfate ลงใน flask (ข้อ 4.2.3) กว้างกรวยแยกด้วยตัวทำละลายผสม แล้วจึงเทตามลงไป

7.2.4 นำ flask ไประเหยตัวทำละลายออกโดยวางใน water bath อุณหภูมิประมาณ 40 - 50 °C พร้อมใช้ N₂ พ่นช่วยในการระเหย ไขมันที่ได้ (extracted fat) นำไปเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ในรูปของ methyl esters

7.3 การเตรียมสารอนุพันธ์ในรูปของ methyl esters

7.3.1 นำ flask (ข้อ 7.2.4) เติม glass bead 3 - 5 เม็ด

- 7.3.2 เติม NaOH 0.5 M in methanol 4 ml แก้วเบาๆ ให้ผสมกัน นำไปต่อเข้ากับชุด condenser ซึ่งให้ความร้อนด้วย water bath อุณหภูมิประมาณ 70 - 80 °C เริ่มจับเวลาประมาณ 8 min หลังจากตัวทำละลายเดือดแล้วควมแน่นกลับลงมาและแกว่ง flask เป็นระยะๆ
- 7.3.3 เติม BF₃ 14% in methanol 5 ml ผ่าน condenser ลงไป เริ่มจับเวลาประมาณ 2 min หลังจากตัวทำละลายเดือดแล้วควมแน่นกลับลงมา และแกว่ง flask เป็นระยะๆ
- 7.3.4 เติม n-heptane 5 ml ผ่าน condenser ลงไป เริ่มจับเวลาต่ออีกประมาณ 1 min ถอด flask ออกจาก condenser เติม saturated sodium chloride ลงไปประมาณ 15 ml ปิดจุกแน่นเขย่าอย่างแรงประมาณ 15 s เติมต่อจนชั้นของ n-heptane อยู่ที่บริเวณคอของ flask
- 7.3.5 คูดชั้นของ n-heptane ประมาณ 2 - 3 ml ลงในหลอดแก้วขนาด 1 x 12 cm ที่มี anh. sodium sulfate ประมาณ 1 - 2 g แล้วเขย่าให้เข้ากัน
- 7.3.6 หากสารละลายที่ได้ไม่ใสให้นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบประมาณ 2500 rpm แล้วจึงถ่ายสารละลายใสลงใน sample vial (ข้อ 4.2.8)
- 7.4 สภาวะของเครื่องมือ

Detector	Flame Ionization Detector (FID)
Column	SP 2560 fused silica capillary column 100 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.20 µm film thickness หรือเทียบเท่า
Stationary phase	non-bonded; poly (biscyanopropyl siloxane) phase
Temperature program	140°C (5 min) ถึง 240°C (10 min) ด้วย 2°C/min
Carrier gas	Helium (20 cm/sec)
Injection system	Split type
Injector temp	260°C
Detector temp	260°C
Injection volume	1, 2 µl
Runtime	65 min

7.4.1 นีดสารละลายมาตรฐาน (ข้อ 5.18.2) และสารละลายตัวอย่าง 1 หรือ 2 μL เข้าเครื่อง gas chromatograph ตามลำดับ

7.4.2 นำ chromatogram ของทั้งสารมาตรฐานและตัวอย่างที่ได้ไปใช้ในการคำนวณ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

8.1.1 คำนวณ response factor (R_i) ของกรดไขมันอิ่มตัวแต่ละชนิดจากการนึ่ง mixed fatty acid methyl esters standard solution

$$R_i = \frac{A_{Si} \times W_{SIS}}{A_{SIS} \times W_{Si}}$$

R_i = response factor ของกรดไขมันอิ่มตัว i

A_{Si} = พื้นที่พีค (peak area) ของกรดไขมันอิ่มตัว i

A_{SIS} = พื้นที่พีคของกรดไขมัน (C 11:0) ที่เป็น internal standard

W_{SIS} = ปริมาณของกรดไขมันที่เป็น internal standard

W_{Si} = ปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัว i

8.1.2 คำนวณปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวแต่ละชนิดในรูป methyl esters ในตัวอย่าง

$$W_{FAMEi} = \frac{A_i \times W_{IS} \times 1.0067}{A_{IS} \times R_i}$$

A_i = พื้นที่พีคของกรดไขมันอิ่มตัว i

A_{IS} = พื้นที่พีคของกรดไขมันที่เป็น internal standard

W_{IS} = ปริมาณของกรดไขมันที่เป็น internal standard (0.010 g)

R_i = response factor ของกรดไขมันอิ่มตัว i

1.0067 = ค่าคงที่สำหรับ internal standard เปลี่ยนจาก triglyceride เป็น fatty acid methyl ester

8.1.3 คำนวณปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวแต่ละชนิดจาก fatty acid methyl ester เป็น fatty acid โดยใช้ conversion factor ในตาราง

$$W_i = W_{\text{FAME}i} \times F_{\text{FA}i}$$

$W_{\text{FAME}i}$ = ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว i ในรูป methyl ester

$F_{\text{FA}i}$ = conversion factor สำหรับการเปลี่ยน fatty acid methyl ester เป็น fatty acid

8.1.4 คำนวณปริมาณไขมันอิ่มตัวคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักตัวอย่าง

$$\% \text{ ไขมันอิ่มตัว} = \frac{\sum W_i}{W} \times 100$$

$\sum W_i$ = ผลรวมของปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวแต่ละชนิด (g)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

8.2 การรายงานผล

รายงานผลไขมันอิ่มตัวในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก (g/ 100 g) ทศนิยม 1 ตำแหน่ง หากปริมาณไขมันอิ่มตัวปัดค่าตัวเลขแล้วน้อยกว่าร้อยละ 0.1 ให้รายงานค่าไม่พบ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ QC sample ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกครั้ง ค่าที่วิเคราะห์ได้ต้องอยู่ในช่วง $\text{Mean} \pm 2\text{SD}$
- 9.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ (duplicate) กำหนดให้มีความแตกต่างระหว่าง 2 ค่าด้วย $\% \text{RPD} \leq 10$

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

- 10.1 ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification) ในอาหารต่างๆ เช่น นมผง ไอศกรีม เครื่องดื่มธัญพืช และปลากระป๋อง มีค่าคำนวณของ pooled $\% \text{RSD}_r$ 2.68 และ HORRAT (Horwitz ratio) มีค่าระหว่าง 0.72 - 1.52 (เกณฑ์การยอมรับ < 2)
- 10.2 ภาคผนวก 1: ตารางแสดง conversion factor ของ $F_{\text{FA}i}$ และ F_{Tgi}

ภาคผนวก 1

ตารางแสดง conversion factor ของ F_{FAi} และ F_{Tgi}

Fatty acid	F_{FAi}^a	F_{Tgi}^b
4 : 0 Butyric	0.8627	0.9868
6 : 0 Caproic	0.8923	0.9897
8 : 0 Caprylic	0.9114	0.9915
10 : 0 Capric	0.9247	0.9928
11 : 0 Undecanoic	0.9300	0.9933
12 : 0 Lauric	0.9346	0.9937
13 : 0 Tridecanoic	0.9386	0.9941
14 : 0 Myristic	0.9421	0.9945
14 : 1 Tetradecenenoic	0.9417	0.9944
15 : 0 Pentadecanoic	0.9453	0.9948
15 : 1 Pentadecenoic	0.9449	0.9947
16 : 0 Palmitic	0.9481	0.9950
16 : 1 Hexadecenoic	0.9477	0.9950
17 : 0 Margaric	0.9507	0.9953
17 : 1 Margaroleic	0.9503	0.9952
18 : 0 Stearic	0.9530	0.9955
18 : 1 Octadecenoic	0.9527	0.9955
18 : 2 Octadecadienoic	0.9524	0.9954
18 : 3 Linolenic	0.9520	0.9954
18 : 4 Octadecatetraenoic	0.9517	0.9954
20 : 0 Arachidic	0.9570	0.9959
20 : 1 Eicosenoic	0.9568	0.9959
20 : 2 Eicosadienoic	0.9565	0.9958
20 : 3 Eicosatrienoic	0.9562	0.9958
20 : 4 Arachidonic	0.9560	0.9958
20 : 5 Eicosapentaenoic	0.9557	0.9958
21 : 0 Heneicosanoic	0.9588	0.9961
22 : 0 Behenic	0.9604	0.9962
22 : 1 Docosaenoic	0.9602	0.9962
22 : 2 Docosadienoic	0.9600	0.9962
22 : 3 Docosatrienoic	0.9598	0.9961
22 : 4 Docosatetraenoic	0.9595	0.9961
22 : 5 Docosapentaenoic	0.9593	0.9961
22 : 6 Docosahexaenoic	0.9590	0.9961
23 : 0 Tricosanoic	0.9620	0.9964
24 : 0 Lignoceric	0.9963	0.9965
24 : 1 Nervonic	0.9632	0.9965

**DMSc F1093: การตรวจเอกลักษณ์สีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำในอาหารโดย
paper chromatography
Identification of synthetic organic water – soluble colors in foods
by paper chromatography**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ตรวจเอกลักษณ์ของสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำ เช่น sunset yellow FCF, allura red, acid red 52, tartrazine, azorubine, ponceau 4R, brilliant blue FCF, patent blue V และสีอื่นๆ ในอาหารโดย paper chromatography

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Compendium of Methods for Food Analysis. 1st Ed. 2003. DMSc.& ACFS (Thailand)
- 2.2 FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 14/7 “Manuals of food quality control 7. Food analysis : general techniques, additives, contaminants and composition ; 1986 ; content 6 FOOD ADDITIVE METHODS, section 6.3 colors : p. 91-92.

3. หลักการ (Principle)

สีอินทรีย์สังเคราะห์จะละลายออกมาอยู่ในสารละลาย ปรับสภาพสารละลายให้เป็นกรด ดูดซับสีด้วย wool แล้วชะสีออกมาโดยปรับสภาพสารละลายให้เบสต่าง นำไปตรวจเอกลักษณ์ของสีด้วยเทคนิค paper chromatography

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 Water bath
- 4.1.2 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.001 g
- 4.1.3 Blender
- 4.1.4 Dryer

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Developing tank
- 4.2.2 Litmus paper
- 4.2.3 Wool (ไหมพรมขนสัตว์) สีขาว หรือ สีธรรมชาติ (ไม่ย้อมสี)
- 4.2.4 สำลี
- 4.2.5 Evaporating dish
- 4.2.6 Silica gel plates
- 4.2.7 Chromatography paper (1CHR : Whatman)
- 4.2.8 Beaker
- 4.2.9 Volumetric flask ขนาด 100 ml
- 4.2.10 Mortar
- 4.2.11 Soxhlet extractor
- 4.2.12 Forcep
- 4.2.13 Aluminium foil
- 4.2.14 Micro capillary tube

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และนำความต้านทาน $\geq 15 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ สำหรับห้องปฏิบัติการหรือเทียบเท่า

- 5.1 Ethanol 95%
- 5.2 Ammonia solution $\geq 25\%$
- 5.3 Glacial acetic acid (GAA)
- 5.4 n-Butanol
- 5.5 2-Propanol
- 5.6 Petroleum ether

5.7 Paper chromatography developing solvents (เตรียมไว้ให้อิ่มตัวใน tank อย่างน้อย 24 ชั่วโมง)

- Developing solvent 1: n-butanol : ethanol : ammonia solution : H_2O
(50 : 25 : 10 : 25)

- Developing solvent 2: 25% ethanol : 5% ammonia solution (1 : 1)

5.8 สารละลายมาตรฐานสีอินทรีย์สังเคราะห์ sunset yellow FCF, allura red, acid red 52, tartrazine, azorubine, ponceau 4R, brilliant blue FCF, patent blue V และสีอินทรีย์สังเคราะห์อื่นๆ : ชั่งสีชนิดละ 0.1000 g ละลายด้วยน้ำลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำแยกแต่ละสี

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 100 – 200 g หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดด้วย motar หรือ blender ถ้าเป็นของเหลวให้ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียม wool

7.1.1 ตัดเส้น wool ออกเป็นชิ้น ยาวประมาณ 1 - 2 inches

7.1.2 นำ wool จาก ข้อ 7.1.1 ใส่ใน soxhlet extractor เติม petroleum ether จนท่วม ทำการสกัดนาน 2-3 h หรือนำ wool ใส่ใน beaker ขนาดเหมาะสม เติม petroleum ether จนท่วม ปิดปาก beaker ด้วย aluminium foil แช่ไว้ประมาณ 1 คืน

7.1.3 ใช้ forcep คีบ wool ออกจาก soxhlet extractor หรือ beaker ที่แช่ wool

7.1.4 นำ wool ใส่ใน beaker ที่มี 5 % ammonia solution ให้ท่วม wool แล้วนำไปวางบน water bath นาน 1 h เพื่อไล่ petroleum ether ล้าง ammonia ออกจาก wool โดยล้างผ่านน้ำประปา 4-5 ครั้ง (ควรใส่ถุงมือ ขณะล้าง) และล้างสุดท้ายด้วยน้ำ

7.1.5 นำ wool ที่ได้ไปผึ่งให้แห้ง เก็บในขวดปากกว้างที่มีฝาปิด

7.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้ว ประมาณ 10 g (หรือตามความเหมาะสม) ลงใน beaker เติม 50 % ethanol ประมาณ 150 ml นำไปตั้งบน water bath จนกระทั่งสีในตัวอย่างละลายออกมา หากมีชิ้นตัวอย่างให้กรองผ่านสำลี ใ้ wool ประมาณ 5-6 เส้น ปรับให้เป็นกรดด้วย GAA ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่ง wool ดูดซับสี จากนั้นนำไปล้างด้วย น้ำสะอาด (น้ำประปา) และล้างซ้ำด้วยน้ำ 2-3 ซ้ำ นำไปใส่ใน evaporating dish เติมน้ำจนท่วม wool เติม ammonia solution 2-3 หยด นำ dish ไปวางบน water bath จนกระทั่งสีที่ wool ละลายออกมา ล้าง wool ด้วยน้ำลงไปรวมใน evaporating dish แล้วระเหยแห้งบน water bath

7.3 การตรวจเอกลักษณ์ของสีด้วยวิธี paper chromatography

7.3.1 เตรียมแผ่น chromatography paper โดยตัดให้มีขนาดที่เหมาะสมกับ developing tank ใช้ดินสอดขีดเส้นตรงที่วัดจากปลายกระดาษขึ้นมา ประมาณ 2.5 cm ทั้งสองด้านของกระดาษ แล้วใช้ดินสอดจุดที่เส้นที่ขีดไว้ให้ห่างกัน ประมาณ 1.5 cm

7.3.2 นำ evaporating dish จาก ข้อ 7.2 มาเติม 50 % ethanol 1 ml แก้ว เบาๆ ให้สีละลายออกมา ใช้ micro capillary tube จุ่มสารละลายสีหยดบนจุดที่ทำไว้บนแผ่น chromatography paper ใช้ dryer เป่าให้แห้งทำซ้ำจนสารละลายหมด หากตัวอย่างมีสีที่เข้ม ให้หยดในปริมาณที่เหมาะสม

7.3.3 ใช้ micro capillary tube จุ่มสารมาตรฐานของแต่ละสี หยดลงในแผ่น chromatography paper เดียวกันกับตัวอย่าง เพื่อทำการเปรียบเทียบค่า R_f และชนิดสี

7.3.4 นำแผ่น chromatography paper ไปจุ่มใน developing tank รอจน developing solvent ขึ้นมาถึงขอบบน จึงนำแผ่น chromatography paper ออกมาผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน

7.3.5 เปรียบเทียบค่า R_f ของสีในตัวอย่างกับสารมาตรฐานสีสังเคราะห์ โดยวัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่โดย เริ่มวัดจากแนวที่ขีดไว้ในกระดาษไปจนถึงจุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง และวัดระยะทางที่สีเคลื่อนที่ไปเช่นเดียวกัน หน่วยเป็นเซนติเมตร และเปรียบเทียบสีที่พบกับสารมาตรฐานสีสังเคราะห์

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สีเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

8. การรายงานผล (Expression of results)

รายงานชนิดของสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่พบ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 หากไม่สามารถสรุปชนิดของสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่พบกับค่า R_f ได้ ให้ตรวจยืนยันโดยวิเคราะห์ตัวอย่างตามข้อ 7.2 แต่นำแผ่น chromatography paper ไปจุ่มใน developing solvent 2 หรือ
- 9.2 ใช้แผ่น silica gel plates แทนแผ่น chromatography paper โดยใช้ developing solvent : 2-propanol : ammonia (85:15) หรือ (4:1)

DMSc F 1094: การวิเคราะห์ปริมาณสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำในอาหารโดย HPLC
Determination of synthetic organic water – soluble colors in foods
by HPLC

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสีอินทรีย์สังเคราะห์ที่ละลายน้ำได้แก่ sunset yellow FCF, allura red, acid red 52, tartrazine, azorubine, ponceau 4R, brilliant blue FCF และ patent blue V ในอาหารโดยเทคนิค HPLC

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Lawrence JF , Lancaster FE , Conacher HB. Separation and detection food colors by Ion-pair high performance liquid chromatography. Journal of Chromatograph 1981; 210: 168-173.
- 2.2 Chulamorakot T, Chuensupong K. Determination of synthetic dyes in coloring flour sauces by HPLC. Bull. Dept. Med. Sci. 1994; 37 (1): 65-71.
- 2.3 Compendium of Methods for Food Analysis. 1st Ed. 2003. DMSc. & ACFS (Thailand)
- 2.4 FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 14/7 “Manuals of food quality control 7. Food analysis : general techniques , additives , contaminants and composition ; 1986 ; content 6 FOOD ADDITIVE METHODS, section 6.3 colors : p. 76-79.

3. หลักการ (Principle)

สีอินทรีย์สังเคราะห์จะละลายออกมาอยู่ในสารละลาย ปรับสภาพสารละลายให้เป็นกรด ดูดซับสีด้วย polyamide แล้วจะสีออกมาโดยปรับสภาพสารละลายให้เป็นด่าง นำไปหาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 HPLC พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด UV หรือ UV/VIS หรือ photodiode array

4.1.2 Spectrophotometer

4.1.3 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.001 g และ 0.0001 g

4.1.4 Ultrasonic bath

4.1.5 Water bath

4.1.6 Blender

4.1.7 pH meter

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 คอลัมน์แก้ว ขนาด $\varnothing$ 1.0 x 25 cm โดยประมาณ

4.2.2 ชุดกรองสารละลาย (solvent clarification kit)

4.2.3 ชุดกรองตัวอย่าง (sample clarification kit)

4.2.4 Membrane filter (nylon และ HA : 0.45 μ m, dia. 47 mm)

4.2.5 Membrane filter หรือ syringe filter (HA หรือ CA : 0.45 μ m, dia. 13 mm)

4.2.6 Litmus paper

4.2.7 สำลี

4.2.8 Volumetric flask ขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1,000 ml

4.2.9 Pipette ขนาด 1 , 2 , 5 และ 10 ml

4.2.10 Beaker ขนาด 50 , 100 , 250 และ 2,000 ml

4.2.11 Motar

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega$ -cm เพื่อใช้กับวิเคราะห์ด้วย HPLC และ น้ำ (resistivity $\geq 15 M\Omega$ -cm) สำหรับห้องปฏิบัติการหรือเทียบเท่า

5.1 Ethanol 95%

5.2 Petroleum ether

5.3 Ammonia solution $\geq 25\%$

5.4 Diethyl ether

- 5.5 Glacial acetic acid (GAA)
- 5.6 Acetone
- 5.7 Acetonitrile, HPLC grade
- 5.8 Methanol, HPLC grade
- 5.9 Polyamide
- 5.10 Sand (acid wash)
- 5.11 iso-Propanol, HPLC grade
- 5.12 Tetrabutyl ammonium hydroxide 30 hydrate (TBAH) purity $\geq 98.0\%$
- 5.13 Eluting solution: methanol : H_2O : ammonia solution (90 : 5 : 5)
- 5.14 TBAH 0.1 M : ชั่ง TBAH 8.00 g ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย iso-propanol
- 5.15 TBAH 0.01 M (pH 5.0) : ละลายสารละลายข้อ 5.14 ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย GAA
- 5.16 Ethanol-ammonia solution (95: 5)
- 5.17 สารมาตรฐาน (Standards)
 - 5.17.1 การหาความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานโดยใช้ spectrophotometer (ยกเว้นสี acid red 52 ใช้สารมาตรฐานที่มีใบ certificate ระบุความบริสุทธิ์) สารมาตรฐานสีอินทรีย์สังเคราะห์ sunset yellow FCF, allura red, acid red 52, tartrazine, azorubine, brilliant blue FCF และ patent blue V ควรมีความบริสุทธิ์ของสีไม่น้อยกว่า 85% ส่วน ponceau 4R ความบริสุทธิ์ของสีไม่น้อยกว่า 80%
 - 5.17.1.1 ชั่งสารมาตรฐานชนิดละ 0.1000 g ละลายด้วย H_2O ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O (แยกแต่ละสี)
 - 5.17.1.2 เจือจางปริมาณสีที่เหมาะสม (ตารางที่ 1) โดยค่า absorbance ที่ได้จากการวัดควรอยู่ในช่วง 0.200 – 0.800
 - 5.17.1.3 นำสารละลายข้อ 5.17.1.2 ไปวัดค่า absorbance
 - 5.17.1.4 หาความบริสุทธิ์ของสี ทุก 3 เดือน โดยความบริสุทธิ์ของสีต้องเป็นไปตาม ข้อ 5.17.1 หากไม่เป็นไปตามนั้นให้เตรียมใหม่

ตารางที่ 1 ชนิดของสีอินทรีย์สังเคราะห์ maximum wavelength และ ค่า $E_{1\text{cm}}^{1\%}$

สีอินทรีย์สังเคราะห์	λ_{max} (nm)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	ปริมาตรของ 5.17.1.1 (ml)	ปริมาตรที่ปรับ (ml)
Sunset yellow FCF	485	555	1	200
Allura red	504	540	1	100
Tartrazine	426	530	1	200
Azorubine	516	510	1	200
Ponceau 4R	505	430	1	100
Brilliant blue FCF	630	1630	1	200
Patent blue V	638	2000	1	200

5.17.1.5 กำหนดหาความบริสุทธิ์ ได้ดังนี้

$$\% \text{ ความบริสุทธิ์} = \frac{\text{abs} \times D}{a \times b}$$

เมื่อ abs = absorbance ของสารละลายสี
 a = ค่าคงที่ของสีตามตารางที่ 1 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)
 b = น้ำหนัก (g)
 D = dilution factor

5.17.1.6 นำค่าความบริสุทธิ์ที่ได้มา กำหนดความเข้มข้นที่แท้จริงของ
 สารละลายมาตรฐานสีแต่ละสีตามข้อ 5.17.1.1 จากสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายสี } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\% \text{ ความบริสุทธิ์} \times b \times 1000 \times 1000}{\text{ปริมาตรที่ปรับ (ml)}}$$

5.17.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

5.17.2.1 Stock standard solution : สารมาตรฐานสีจากข้อ 5.17.1.1

5.17.2.2 Intermediate mix standard solution (50 µg/ml)

ชุดที่ 1 สี Sunset yellow FCF, Allura red, Acid red 52,

Tartrazine, Azorubine และ Ponceau 4R

: ปิเปตสารมาตรฐานสีข้อ 5.17.2.1 ทั้ง 6 สี โดยคำนวณ
ปริมาตรที่จะปิเปตจากค่าความเข้มข้นที่ได้ลงใน volumetric
flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H₂O

ชุดที่ 2 สี Brilliant blue FCF และ Patent blue V

: ปิเปตสารมาตรฐานสีข้อ 5.17.2.1 ทั้ง 2 สี โดยคำนวณ
ปริมาตรที่จะปิเปตจากค่าความเข้มข้นที่ได้ลงใน volumetric
flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H₂O

5.17.2.3 Working mix standard solution (0.1, 1, 10 และ 20 µg/ml)

ชุดที่ 1 สี Sunset yellow FCF, Allura red, Acid red 52,

Tartrazine, Azorubine และ Ponceau 4R

: ปิเปต Intermediate mix standard solution ชุดที่ 1
0.02, 0.2, 2 และ 4 ml ตามลำดับ แยกใส่ขวดปริมาตรขนาด
10 ml ปรับปริมาตรด้วย H₂O

ชุดที่ 2 สี Brilliant blue FCF และ Patent blue V

: ปิเปต Intermediate mix standard solution ชุดที่ 2
0.02, 0.2, 2 และ 4 ml ตามลำดับ แยกใส่ขวดปริมาตรขนาด
10 ml ปรับปริมาตรด้วย H₂O

(เก็บรักษาสารละลายมาตรฐานสีอินทรีย์สังเคราะห์ทุกความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 2 – 8° C)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 100 – 200 g หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดด้วย mortar หรือ บดด้วย blender ถ้าเป็นของเหลวให้ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัดตัวอย่าง

- 7.1.1 ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ (เช่น ลูกอม ลูกกวาด เยลลี่ น้ามะนาว น้ำผึ้ง เครื่องดื่ม): ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g (หรือตามความเหมาะสม) (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงใน beaker เติมน้ำ 50 ml นำไปตั้งบน water bath กวนตัวอย่างจนละลายและปรับให้เป็นกรดด้วย GAA สารละลายที่ได้นำไปผ่านคอลัมน์
- 7.1.2 ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ (เช่น ผลไม้แปรรูป แยม) หรือ ตัวอย่าง ประเภทแป้ง: ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g (หรือตามความเหมาะสม) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงใน beaker เติม ethanol-ammonia solution (95 : 5) และทิ้งไว้ 1 คืน เทตัวอย่างผ่านสำลี และทำการสกัดตัวอย่างอีก ประมาณ 3 ครั้ง หรือจนกว่าสีจากตัวอย่างจะออกหมด นำสารละลายที่สกัดได้ มาระเหยบน water bath เพื่อไล่ ammonia และใช้ litmus paper ทดสอบ หากยังเป็นด่างให้เติม GAA แล้วเติมน้ำร้อน 50 ml ปรับให้เป็นกรดด้วย GAA สารละลายที่ได้นำไปผ่านคอลัมน์
- 7.1.3 ตัวอย่างที่มีไขมันสูง (เช่น เนื้อสัตว์) : ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g (หรือตามความเหมาะสม) (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงใน beaker สกัดไขมันออกด้วย petroleum ether : diethyl ether (1:1) 2-3 ครั้ง ระเหยทิ้งส่วนของ petroleum ether : diethyl ether ส่วนตัวอย่างให้เติม ethanol-ammonia solution (95 : 5) และทิ้งไว้ 1 คืน เทตัวอย่างผ่านสำลี สกัดตัวอย่างอีกประมาณ 3 ครั้ง หรือ จนกว่าสีจากตัวอย่างจะออกหมด นำสารละลายที่สกัดได้ มาระเหยบน water bath เพื่อไล่ ammonia และใช้ litmus paper ทดสอบ หากยังเป็นด่างให้เติม GAA แล้วเติมน้ำร้อน 50 ml ปรับให้เป็นกรดด้วย GAA นำสารละลายที่ได้ไปผ่านคอลัมน์

7.2 การผ่านคอลัมน์ และหาปริมาณ

- 7.2.1 เตรียมคอลัมน์แก้ว โดยใช้สำลีใส่ไว้ด้านล่างของคอลัมน์ เติม polyamide สูงประมาณ 1-2 cm ลงในคอลัมน์ เติม sand ประมาณ 0.5 cm แล้วล้างคอลัมน์ด้วย acetone
- 7.2.2 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ เทผ่านคอลัมน์
- 7.2.3 ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิ $\geq 50^{\circ}\text{C}$) 10 ml 6 ครั้ง
- 7.2.4 ล้างคอลัมน์ด้วย acetone 5 ml 3 ครั้ง หรือ จนกว่าสารละลายที่ผ่านลงมาใสไม่มีสี
- 7.2.5 ชะลือออกจาก polyamide ด้วย eluting solution (ข้อ 5.13) จนกว่าจะไม่มีสีติดที่ผง polyamide
- 7.2.6 นำส่วนที่จะได้ระเหยบน water bath เพื่อไล่ ammonia และทดสอบด้วย litmus paper
- 7.2.7 ละลายส่วนที่เหลือด้วย H_2O แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml หรือตามความเหมาะสม กรองด้วย membrane filter (HA หรือ CA $0.45\ \mu\text{m}$) นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

7.3 สภาวะของเครื่อง HPLC

- Column: Hypersil BDS C18 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6 \times 250\ \text{mm}$) หรือเทียบเท่า
- Injection volume: $20\ \mu\text{l}$
- Flow rate: $0.50 - 1.25\ \text{ml/min}$
- $\lambda\ 254\ \text{nm}$ สำหรับสี sunset yellow FCF, allura red, acid red 52, tartrazine, azorubine และ ponceau 4R
- $\lambda\ 630\ \text{nm}$ สำหรับสี brilliant blue FCF และ patent blue V
- Mobile phase:
 - a $0.01\ \text{M TBAH} : \text{acetonitrile}$, 66:34 สำหรับสี sunset yellow FCF, allura red, acid red 52, tartrazine, azorubine, และ ponceau 4R
 - b $0.01\ \text{M TBAH} : \text{acetonitrile}$, 50:50 สำหรับสี brilliant blue FCF และ patent blue V

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

$$8.1 \text{ ปริมาณสีอินทรีย์สังเคราะห์ (mg/kg) } = \frac{C \times V \times D}{W}$$

โดย C = ความเข้มข้นของสีอินทรีย์สังเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)

V = ปริมาตรที่ปรับ (ml)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

D = dilution factor

8.2 รายงานปริมาณสีอินทรีย์สังเคราะห์ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

โดยมีเลขนัยสำคัญ 3 ตัว

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้ง จีดสารมาตรฐาน 1 ระดับความเข้มข้น จำนวน 5 ซ้ำ

คำนวณ % RSD ของ retention time (RT) และ peak area เกณฑ์ยอมรับ ≤ 1
และ ≤ 2.5 ตามลำดับ

9.2 ทำการวิเคราะห์ซ้ำทุก 5-10 % ของการวิเคราะห์แต่ละรุ่น โดยค่า % RPD ≤ 5

9.3 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่างโดย $R^2 \geq 0.9995$

9.4 ทุก 10 ตัวอย่าง ให้จีดสารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ 1 ครั้ง
โดย % RPD ของความเข้มข้นที่ได้กับความเข้มข้นที่เตรียม ≤ 5

9.5 ทุก 5-10 % ของการวิเคราะห์ตัวอย่างให้วิเคราะห์ตัวอย่างควบคุม (control sample)
โดยค่าที่วิเคราะห์ได้ ต้องไม่เกิน 3 SD

9.6 ชนิดของสีที่ได้จากเทคนิค HPLC และ paper chromatography ต้องสอดคล้องกัน

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

ตารางที่ 3 LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์

สีอินทรีย์ ตั้งเคราะห์	ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้		ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ		ตัวอย่างที่มีไขมันสูง	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Sunset yellow FCF	0.06	0.2	0.25	1.0	0.1	1.0
Allura red	0.06	0.2	0.25	1.0	0.1	1.0
Acid red 52	0.06	0.2	0.25	1.0	0.1	1.0
Tartrazine	0.06	0.2	0.25	1.0	0.1	1.0
Azorubine	0.06	0.2	0.25	1.0	0.2	1.0
Ponceau 4R	0.06	0.2	0.25	1.0	0.1	1.0
Brilliant blue FCF	0.03	0.1	0.03	0.2	0.05	0.5
Patent blue V	0.03	0.1	0.03	0.2	0.05	0.5

DMSc F 1095: การวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนในนมและผลิตภัณฑ์โดย LC-MS/MS

Determination of melamine in milk and products by LC-MS/MS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเมลามีนในนม ผลิตภัณฑ์ที่มีนมเป็นส่วนประกอบ และผลิตภัณฑ์จากแป้ง เช่น นมผง นมข้น โยเกิร์ต ไอศกรีม ช็อกโกแลต ขนมปัง wheat gluten เป็นต้น

2. เอกสารอ้างอิง (References)

Canadian Food Inspection Agency Calgary Laboratory. Determination of Melamine and Cyanuric Acid using Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). Version 1.0, 17 September 2008

3. หลักการ (Principle)

สารเมลามีนจะถูกสกัดด้วย สารละลาย acetonitrile : H₂O พร้อมกับโปรตีนจะถูกทำให้ตกตะกอนในเวลาเดียวกัน สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 LC/MS-MS

4.1.2 เครื่องชั่ง ที่มีความละเอียด 0.0001 g และ 0.01 g

4.1.3 Centrifuge

4.1.4 Vortex mixer

4.1.5 Shaker

4.1.6 Ultrasonic bath

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Centrifuge plastic tube ขนาด 50 ml
- 4.2.2 Micropipette ขนาด 5-40, 40-200, 200-1,000 μ l
- 4.2.3 Vial สีชา ขนาด 2 ml
- 4.2.4 Dispenser ขนาด 5-25 ml
- 4.2.5 Volumetric flask ขนาด 10, 50 และ 500 ml
- 4.2.6 Micro-tubes ขนาด 2 ml
- 4.2.7 Funnel
- 4.2.8 Beaker
- 4.2.9 Plastic syringe ขนาด 1 ml
- 4.2.10 Nylon syringe filter, 0.45 μ m, 13 mm
- 4.2.11 Nylon membrane filter, 0.45 μ m, 47 mm

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega$ -cm

- 5.1 Acetonitrile (CH_3CN), HPLC grade หรือเทียบเท่า
- 5.2 Ammonium formate (NH_4HCO_2)
- 5.3 20 mM ammonium formate: ชั่ง NH_4HCO_2 น้ำหนัก 0.63 g ละลายด้วย H_2O ปริมาตรเป็น 500 ml
- 5.4 Acetonitrile : H_2O (1:1) : ผสม acetonitrile 100 ml กับ H_2O 100 ml
- 5.5 สารมาตรฐาน
 - 5.5.1 Melamine ($C_3H_6N_6$) ผลิตภัณฑ์ของ SIGMA-ALDRICH หรือเทียบเท่า
ความบริสุทธิ์ $\geq 99\%$

- 5.5.2 $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ -labeled melamine ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ($^{13}\text{C}_3$ และ $^{15}\text{N}_3 \geq 98\%$) ผลิตภัณฑ์ของ Cambridge Isotope Laboratories, Inc. หรือเทียบเท่า ใช้เป็น stock internal standard solution (IS)
- 5.5.3 Stock standard solution (1,000 $\mu\text{g/ml}$) : ชั่ง melamine (ข้อ 5.5.1) 50 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile : H_2O (1:1) sonicate ประมาณ 30 min สารต้องละลายจนหมด แล้วจึงปรับปริมาตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C อายุการใช้งาน 1 ปี
- 5.5.4 Intermediate standard solution (10 $\mu\text{g/ml}$) : ปิเปิด stock standard solution (ข้อ 5.5.3) 100 μl ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile : H_2O (1:1) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C อายุการใช้งาน 6 เดือน
- 5.5.5 Working standard solution (0.5 $\mu\text{g/ml}$) : ปิเปิด intermediate standard solution (ข้อ 5.5.4) 50 μl ลงใน micro-tube ขนาด 2 ml ปรับเป็น 1 ml โดยปิเปิด acetonitrile : H_2O (1:1) 950 μl ลงใน micro-tube ผสมกันด้วย vortex mixer (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- 5.5.6 Working standard solution (0.05 $\mu\text{g/ml}$) : ปิเปิด working standard solution (ข้อ 5.5.5) 100 μl ลงใน micro-tube ขนาด 2 ml ปรับเป็น 1 ml โดยปิเปิด acetonitrile : H_2O (1:1) 900 μl ลงใน micro-tube ผสมกันด้วย vortex mixer (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- 5.5.7 $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ -labeled - melamine intermediate standard solution (IS) (0.5 $\mu\text{g/ml}$) : ปิเปิด stock internal standard solution (ข้อ 5.5.2) จำนวน 50 μl ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile : H_2O (1:1) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C อายุการใช้งาน 1 ปี

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 อาหารแข็ง บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 อาหารเหลว เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด คนหรือกวนจนตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ตัวอย่างอาหารแข็ง ชั่ง 2 กรัม อาหารเหลว ชั่ง 5-10 กรัม ใส่ใน centrifuge plastic tube ขนาด 50 ml (blank ไม่มีตัวอย่าง)
- 7.2 เติม H_2O 10 ml เขย่า หรือปั่นด้วย vortex mixer ให้ตัวอย่างไม่เกาะกันเป็นก้อน กรณีตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักไม่ต้องเติมน้ำ เช่น นม น้ำ เครื่องดื่ม
- 7.3 เติม acetonitrile 5 ml ปั่นด้วย vortex mixer แล้วเติมเพิ่มอีก 15 ml นำไปเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 15 min
- 7.4 นำไป sonicate ที่อุณหภูมิไม่เกิน $35^\circ C$ เป็นเวลา 30 min
- 7.5 นำมาปั่นแยกด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 2,500 rpm เป็นเวลา 3 min
- 7.6 ถ่ายสารละลายตัวอย่างส่วนใสลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml
- 7.7 ตะกอนที่เหลือใน centrifuge plastic tube สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยเติม H_2O 10 ml ปั่นด้วย vortex mixer ให้ตัวอย่างไม่เกาะกันเป็นก้อน
- 7.8 เติม acetonitrile 5 ml ปั่นด้วย vortex mixer แล้วเติมเพิ่มอีก 10 ml นำไปเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 15 min ปฏิบัติต่อตามข้อ 7.4-7.5
- 7.9 เทสารละลายตัวอย่างส่วนใสลงใน volumetric flask ใบเดิม (ในข้อ 7.6) ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย acetonitrile แบ่งสารละลายตัวอย่างที่ได้ใส่ใน centrifuge plastic tube ประมาณ 20 ml นำไปปั่นแยกด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 10 min
- 7.10 ปิ่เปตสารละลายตัวอย่างส่วนใส ข้อ 7.9 จำนวน 200 μl ลงใน micro-tubes ขนาด 2 ml เติม $^{13}C_3$ $^{15}N_3$ -labeled - melamine (IS) 0.5 $\mu g/mL$ จำนวน 10 μl และปิ่เปต acetonitrile : H_2O (1:1) 790 μl ลงใน micro-tubes ปั่นด้วย vortex mixer (กรณีพบ melamine เกิน calibration curve ให้เจือจางตามความเหมาะสม) เขย่าหรือปั่นด้วย vortex mixer ผสมให้เข้ากัน และกรองสารละลายที่ได้ผ่าน nylon syringe filter ขนาด 0.45 μm ลงใน vial สีฟ้า ขนาด 2 ml และตรวจวิเคราะห์ด้วย LC –MS/MS

7.11 การสร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio (peak area of standard/peak area of internal standard) กับ concentration ratio (concentration of standard/concentration of internal standard) : สร้าง calibration curve ที่มี concentration ratio 0, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 และ 4 โดยเปิดสารละลายมาตรฐาน melamine (0.05 µg/mL) 0, 10, 20 และ 40 µl และสารละลายมาตรฐาน melamine (0.50 µg/mL) 10, 20 และ 40 µl ลงใน micro-tubes ตามลำดับ และเปิด internal standard $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ -labeled -melamine (0.5 µg/mL) 10 µl ลงในทุก micro-tubes และปรับให้เป็น 1 mL ด้วย acetonitrile : H_2O (1:1) โดย เปิด 0, 980, 970, 950, 980, 970 และ 950 µl ลงใน micro-tubes ตามลำดับ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

7.12 การวิเคราะห์

7.12.1 สภาวะเครื่องมือระบบ LC

analytical column: ZIC HILIC 5µm , 200°A , 150 x 2.1 mm., SeQuant

mobile phase: programmable HPLC gradient system

เวลา (min)	20 mM NH_4HCO_2 (%)	ACN (%)
0.00	10	90
4.00	10	90
5.00	90	10
6.00	10	90
12.00	10	90

flow rate: 0.45 ml/min

column temperature: 40 °C

injection volume: 5 µl

7.12.2 สภาวะเครื่องมือระบบ MS

ionization mode: ESI (turbo spray) positive

scan type: MRM

ion spray voltage: 5500 eV

temperature: 500 °C

collision gas: nitrogen 7 psig

curtain gas: 20 psig

ion spray nebulizer gas (GS-1): 65 psig

TIS heater gas 2 (GS-2): 60 psig

Entrance potential (EP): 10 eV

MS/MS fragmentation condition

m/z 127/85 ใช้ในการคำนวณ (quantification)

m/z 127/68 ใช้ในการยืนยัน (confirmation)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ melamine (mg/kg)} = \frac{\text{Cs (}\mu\text{g/ml)} \times \text{Dilution (ml)}}{\text{Ms (g)}}$$

เมื่อ Cs คือ ปริมาณ melamine ในสารละลายตัวอย่างที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)

$$\text{Cs (}\mu\text{g/ml)} = \text{Co} \times \text{C}_{\text{IS-sample}} (\mu\text{g/ml})$$

Co : concentration ratio form linear calibration curve of sample solution

ได้จาก สมการ $y = mx + c$

เมื่อ y = response ratio, x = concentration ratio (Co),

m = slope, c = intercept

$\text{C}_{\text{IS-sample}}$: concentration of internal standard in sample solution ($\mu\text{g/ml}$)

Dilution คือ ปริมาตรที่เจือจางของสารละลายตัวอย่าง (mL)

$$(\text{dilution} = 50 \text{ ml} \times 1 \text{ ml} / 0.2 \text{ ml} = 250 \text{ ml})$$

Ms = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (g)

8.2 รายงานปริมาณ melamine ที่พบในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 เตรียม calibration curve ใหม่ทุกครั้งที่ทำกรวิเคราะห์ สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio กับ concentration ratio ของ standard (STD) กับ internal standard (IS) โดยค่า correlation coefficient, r ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.995
- 9.2 วิเคราะห์ method blank ทุกครั้งที่ทำกรวิเคราะห์
- 9.3 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 5 % ของตัวอย่าง คำนวณ % RPD (เกณฑ์ยอมรับ 20 %)
- 9.4 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 5 % ของตัวอย่าง คำนวณ % recovery (เกณฑ์ยอมรับ 70-120 %)
- 9.5 ยืนยันผลการตรวจพบ melamine ด้วย ion intensity ratio โดยเปรียบเทียบค่า ion ratio ของ melamine ที่พบในตัวอย่าง กับ ion ratio เฉลี่ยของสารมาตรฐานทุกระดับความเข้มข้นใน calibration curve (ion ratio คือ peak area ของ secondary massหารด้วย peak area ของ primary mass) ต้องแตกต่างกันไม่เกินเกณฑ์การยอมรับดังนี้

Relative intensity [*]	Tolerance difference ^{**}
> 50 %	± 20 %
> 20-50 %	± 25 %
10-20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

* relative intensity (% of base peak)

** tolerance relative to relative intensity (% of peak intensity)

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

ข้อมูล Method validation โดยห้องปฏิบัติการสารพิษและสารปนเปื้อน

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ดำเนินการปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ตารางที่ 1 Limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

ชนิดอาหาร	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
นม น้ำ และอาหารอื่นที่เป็นของเหลว	0.02	0.04
นมผง และอาหารอื่นที่เป็นของแข็ง	0.05	0.20

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย % recovery (Rec) และ %RSD_r ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละชนิดอาหาร

ชนิดอาหาร	ระดับความเข้มข้นของ spiked sample									
	LOQ (n = 7)		1 mg/kg (n=8)		2.5 mg/kg (n=8)		5.0 mg/kg (n=8)		10.0 mg/kg (n=8)	
	Rec (%)	RSD _r (%)	Rec (%)	RSD _r (%)	Rec (%)	RSD _r (%)	Rec (%)	RSD _r (%)	Rec (%)	RSD _r (%)
1) นม										
- นมผง	101*	4.29	110	1.26	109	2.54	103	3.56	95.4	2.84
- นม น้ำ	112**	3.72	-	-	-	-	-	-	-	-
2) ผลิตภัณฑ์ที่มีนมเป็นส่วนประกอบ										
- บิสกิต	104*	3.45	107	2.91	101	3.33	104	4.63	97.9	2.84
- ช็อคโกแลต	105*	4.83	107	1.27	105	2.22	99.6	2.99	98.2	2.34
3) ผลิตภัณฑ์จากแป้ง										
- wheat gluten	92.9*	6.83	108	3.10	97.1	3.23	95.4	3.12	93.4	3.64

หมายเหตุ * คือที่ระดับความเข้มข้น 0.20 mg/kg

** คือที่ระดับความเข้มข้น 0.04 mg/kg

DMSc F1096: การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมที่สกัดได้จากภาชนะเซรามิกโดย FAAS

Determination of lead and cadmium extracted from ceramic wares by FAAS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ที่สกัดได้จากภาชนะเซรามิกภายใต้สภาวะการสกัดที่กำหนดโดยวิธีนี้ตรวจวิเคราะห์ด้วย FAAS

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 973.32 Lead and Cadmium Extracted from Ceramic ware

3. หลักการ (Principle)

สกัด Pb และ Cd จากภาชนะเซรามิก ด้วยสารละลาย 4% acetic acid ภายใต้สภาวะการทดสอบ ที่อุณหภูมิ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 h นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FAAS กำหนดปริมาณ Pb และ Cd เทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง FAAS พร้อม hollow cathode lamps (ตะกั่วและแคดเมียม)
- 4.1.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $22 \pm 2^\circ\text{C}$

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์
- 4.2.2 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้มิเตอร์หรือ vernier
- 4.2.3 Cylinder ขนาด 250 และ 50 ml
- 4.2.4 Volumetric flask ขนาด 1,000 และ 50 ml
- 4.2.5 Micropipette ขนาด 100 μl และ 1,000 μl
- 4.2.6 Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 ml
- 4.2.7 Beaker ขนาด 250 ml
- 4.2.8 ขวดพลาสติกสำหรับใส่สารละลายตัวอย่าง

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade ยกเว้นที่ระบุไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ที่มีค่า resistivity $\geq 18 M\Omega\cdot cm$

5.1 สารเคมี

5.1.1 Acetic acid (CH_3COOH), glacial

5.1.2 Nitric acid (HNO_3), 65-70%

5.1.3 น้ำยาล้างจาน (detergent solution)

5.2 สารละลาย

5.2.1 Acetic acid (4 % v/v) : เจือจาง acetic acid 40 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O

5.2.2 Nitric acid (20 % v/v) : เจือจาง nitric acid 200 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O

5.3 สารมาตรฐาน (standards)

5.3.1 Stock standard solution Pb (1,000 mg/l) ที่สามารถสอบกลับได้ (traceable to SI unit)

5.3.1.1 Intermediate standard solution Pb (100 mg/l) : ปิ่เปิด Stock Pb standard solution (ข้อ 5.3.1) มา 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 4 % acetic acid (ข้อ 5.2.1)

5.3.1.2 Working standard solution Pb (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 mg/l)

: ปิ่เปิด Intermediate standard solution Pb (ข้อ 5.3.1.1) ปริมาตร 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 และ 1.75 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย 4 % acetic acid (ข้อ 5.2.1)

5.3.2 Stock standard solution Cd (1,000 mg/l) ที่สามารถสอบกลับได้
(traceable to SI unit)

5.3.2.1 Intermediate standard solution Cd (100 mg/l) : ปิเปต Stock Cd
standard solution (ข้อ 5.3.2) มา 1 ml ใส่ใน volumetric flask
ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 4 % acetic acid (ข้อ 5.2.1)

5.3.2.2 Working standard solution Cd (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7
และ 0.8 mg/l) : ปิเปต Intermediate standard solution Cd
(ข้อ 5.3.2.1) ปริมาตร 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35
และ 0.40 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตร
ด้วย 4 % acetic acid (ข้อ 5.2.1)

หมายเหตุ เครื่องแก้วและขวดพลาสติกที่ล้างสะอาดแล้ว ก่อนใช้งาน
แช่ด้วย 20 % nitric acid ทิ้งค้างคืนแล้วล้างด้วย H₂O
หลายๆ ครั้ง เก็บในภาชนะที่มีฝาปิดเพื่อป้องกันฝุ่น

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ใช้ตัวอย่างภาชนะเซรามิก ที่มีขนาด รูปร่าง สี และลวดลายบนภาชนะเหมือนกัน
จำนวน 6 ชิ้นเป็นตัวอย่างทดสอบ
- 6.2 ใช้ตัวอย่างทดสอบ 1 ชิ้น วัดความลึกในแนวดิ่งจากจุดที่ลึกที่สุดภายในภาชนะ
ถึงแนว ระดับราบของขอบริมบนสุดของภาชนะ
- 6.3 วัดปริมาตร (ความจุของตัวอย่าง) โดยการบรรจุน้ำให้ถึงระดับน้ำล้น
- 6.4 ล้างตัวอย่างทดสอบ ด้วยน้ำยาล้างจาน ตามด้วยน้ำประปาหลายครั้งจนสะอาด
แล้วล้างด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 40 °C แล้วด้วย H₂O นำไปผึ่งให้แห้งใน
ภาชนะที่มีฝาปิด

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัดตัวอย่าง

- 7.1.1 ใส่ 4 % acetic acid (ข้อ 5.2.1) ลงในตัวอย่างทดสอบทั้ง 6 ชิ้น จนถึงระดับที่ต่ำจากขอบน้ำเส้นลงมา 6-7 mm (วัดตามแนวพื้นที่ผิว) บันทึกปริมาตรที่ใช้ของแต่ละชิ้น ปิดด้วยฝา (ถ้ามี) หรือฟิล์มพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหย วางทิ้งไว้ใน incubator (ที่มีด) ที่อุณหภูมิ 22 ± 2 °C เป็นเวลา 24 h
- 7.1.2 เมื่อครบ 24 h สังเกตระดับของ 4 % acetic acid ในตัวอย่าง หากลดลงเติมสารละลายให้อยู่ในระดับเดิม คนให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายใส่ขวดพลาสติก นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Pb และ Cd ด้วยเครื่อง FAAS
- 7.1.3 เตรียมสารละลาย blank โดยใส่ 4 % acetic acid ลงใน beaker ให้เพียงพอกับการวิเคราะห์ ปิดด้วยฟิล์มพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหย วางทิ้งไว้ใน incubator (ที่มีด) ที่อุณหภูมิ 22 ± 2 °C เป็นเวลา 24 h แล้วปฏิบัติตาม ข้อ 7.1.2

7.2 การวิเคราะห์

- 7.2.1 วิเคราะห์และวัดปริมาณด้วย FAAS โดยวัดปริมาณ Pb ที่ความยาวคลื่น 217.0 nm และ Cd ที่ความยาวคลื่น 228.8 nm
- 7.2.2 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Abs กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Pb และ Cd (5.3.1.2 และ 5.3.2.2) ค่า R^2 ต้อง ≥ 0.995
- 7.2.3 วิเคราะห์สารละลาย blank (7.1.3) และตัวอย่าง (7.1.2) ปฏิบัติตาม 7.2.1 วัดปริมาณ Pb และ Cd เทียบกับกราฟมาตรฐาน
- 7.2.4 กรณีที่ปริมาณ Pb หรือ Cd สูงกว่าช่วงกราฟมาตรฐาน ให้เจือจางด้วย 4 % acetic acid จนสามารถวัดปริมาณสารในช่วงกราฟมาตรฐานได้

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculations and expression of results)

- 8.1 ปริมาณโลหะในสารละลายตัวอย่าง (mg/l) = (A x B) - C

เมื่อ A = ความเข้มข้นของโลหะที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/l)

B = dilution factor

C = ความเข้มข้นของโลหะในสารละลาย blank ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/l)

- 8.2 รายงานผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ย 6 ซ้ำทดสอบ ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ก่อนใช้งานตรวจสอบเครื่องมือโดยทำ sensitivity check ใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตามที่กำหนดในคู่มือการใช้เครื่อง FAAS
- 9.2 ควรตรวจสอบการ drift ของเครื่องมือ โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นสูงสุด เมื่อวัดตัวอย่างไปแล้วทุกๆ 10-12 ตัวอย่าง และหลังสิ้นสุดการวัด ค่าที่เบี่ยงเบนต้องไม่เกิน 5%
- 9.3 วิเคราะห์ spiked blank เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ เกณฑ์ % recovery ต้องอยู่ในช่วง 80-110

DMSc F1097: การวิเคราะห์ปริมาณ caprolactam ที่แพร่จากวัสดุสัมผัสอาหารชนิดไนลอน
Determination of caprolactam migration from nylon food contact materials

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ caprolactam ที่แพร่จากวัสดุสัมผัสอาหารชนิดไนลอน ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ โดย GC-FID

2. เอกสารอ้างอิง (References)

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. 116-124.

3. หลักการ (Principle)

สกัด caprolactam จากตัวอย่างด้วย 20 % ethanol ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 60 °C หรือ 95 °C เป็นเวลา 30 min ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-FID ใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ได้ peak ระหว่างสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน caprolactam ที่ความเข้มข้น 15 µg/ml

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง GC – FID

4.1.2 อ่างน้ำร้อน (water bath) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 60 ± 2°C และ 95 ± 2°C

4.1.3 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์

4.2.2 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier

4.2.3 Cylinder ขนาด 250 ml

4.2.4 Volumetric flask ขนาด 1,000, 100 และ 10 ml

4.2.5 Micropipette ขนาด 100 μ l และ 1,000 μ l

4.2.6 Erlenmeyer flask แบบปากกว้าง ขนาด 300 ml และ 1,000 ml

4.2.7 Beaker ขนาด 10 ml

4.2.8 ขวดแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับใส่สารละลายตัวอย่าง

5. สารเคมี (Reagents)

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

5.1 Ethanol , absolute for analysis

5.2 Ethanol (20 % v/v) : ผสม ethanol (ข้อ 5.1) 2 ส่วน กับ (H_2O) 8 ส่วน

5.3 สารมาตรฐาน (standard)

5.3.1 Caprolactam: purity ≥ 98 %

5.3.1.1 Stock standard solution caprolactam (1,500 μ g/ml) : ชั่ง

caprolactam (ข้อ 5.3.1) 0.1500 g ใน beaker ขนาด 10 ml ละลาย
ด้วย 20 % ethanol เทใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับ
ปริมาตรด้วย 20 % ethanol

5.3.1.2 Intermediate standard solution caprolactam (150 μ g/ml): ปิ่เปิด
stock standard solution (ข้อ 5.3.1.1) 2 ml ลงใน volumetric
flask ขนาด 20 ml ปรับปริมาตรด้วย 20 % ethanol

5.3.1.3 Working standard solution (15 μ g/ml): ปิ่เปิด intermediate
standard solution (ข้อ 5.3.1.2) 1 ml ลงใน volumetric flask
ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 20 % ethanol

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถบรรจุของเหลวได้และต้องการสกัดเพียงด้านเดียว เช่น ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นแผ่นเรียบแข็ง แผ่นฟิล์ม หรือตัวอย่างที่มีวัสดุต่างชนิดประกบกัน สกัดโดยใช้เครื่องสกัด one-side (ภาคผนวก 1)
 - 6.1.1 ตัดตัวอย่างให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกของ กระบอกเหล็กกล้าไร้สนิม ล้างตัวอย่างด้วย H_2O ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น
 - 6.1.2 วางตัวอย่างที่เตรียมไว้บนแผ่นยางซึ่งทาบอยู่บนฐาน วางกระบอกเหล็กกล้าไร้สนิมทับแผ่นตัวอย่าง วางแผ่นยึบบนกระบอกเหล็กกล้าไร้สนิม ขันยึดด้วยตัวยึดให้แน่น
- 6.2 ตัวอย่างที่สามารถบรรจุของเหลวได้ ทำด้วยวัสดุเดียวหรือวัสดุผสมอาจจะ มีรูปทรงคงตัว หนาและแข็ง เช่น ขวด กล่อง ถ้วย โถ ถาด หรือตัวอย่างที่รูปทรงไม่คงตัว แต่สามารถบรรจุของเหลวได้เช่นถุงหรือ ซองประเภทต่าง ๆ สกัดโดยวิธีใส่สารละลายลงในตัวอย่าง (filling)
 - 6.2.1 กำหนดระดับปริมาตรของสารสกัดที่ต้องการใส่ในตัวอย่าง เพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ผิวสัมผัสภายในของตัวอย่าง (วิธีคำนวณพื้นที่ผิวสัมผัสตามรายละเอียดในภาคผนวก 2)
 - 6.2.2 ล้างตัวอย่างด้วย H_2O ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น
- 6.3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถบรรจุของเหลวได้ และทำด้วยวัสดุเดียวกันทั้งชิ้น เช่น แผ่นพลาสติกหรือภาชนะบรรจุที่ทำด้วยวัสดุเดียวและสามารถตัดเป็นชิ้นเล็กได้ สกัดโดยวิธีแช่ตัวอย่างทั้งชิ้น (total immersion)
 - 6.3.1 ตัดตัวอย่างให้เป็นรูปทรงที่สามารถคำนวณพื้นที่ผิวสัมผัสได้ถูกต้องมากที่สุด คำนวณพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่างทุกด้านรวมกัน วิธีคำนวณตามรายละเอียดในภาคผนวก 2 แล้วคำนวณปริมาตรของสารสกัด ในอัตราส่วน 2 ml ต่อพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่าง 1 cm^2
 - 6.3.2 ล้างตัวอย่างด้วย H_2O ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัดตัวอย่าง

- 7.1.1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถบรรจุของเหลวได้ (ข้อ 6.1) ใส่ 20 % ethanol (ข้อ 5.2) อุณหภูมิ 60 หรือ 95 °C ลงในกระบอกเหล็กกล้าไร้สนิมตามที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1.2 ปริมาตร (หน่วยเป็น ml) 2 เท่าของพื้นที่วงกลมภายในของกระบอกเหล็กกล้าไร้สนิม (หน่วยเป็น cm²) ปิดด้วยกระจกนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 ± 2 °C หรือ 95 ± 2 °C แล้วแต่กรณี เป็นเวลา 30 min แล้วนำสารละลายทดสอบ (test solution) ออกจากเครื่องสกัดใส่ในขวดรูปหม้อ ปิดฝา วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ขวดแก้วมีฝาปิด
- 7.1.2 ตัวอย่างที่สามารถบรรจุของเหลวได้ (ข้อ 6.2) ใส่ 20 % ethanol (ข้อ 5.2) อุณหภูมิ 60 หรือ 95 °C ลงในตัวอย่างให้ถึงระดับที่กำหนดไว้แล้วบันทึกปริมาตรที่แน่นอน (หน่วยเป็น ml) ปิดด้วยกระจก หรือปิดปากถุงให้แน่นด้วยแถบรัด นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 ± 2 °C หรือ 95 ± 2 °C แล้วแต่กรณี เป็นเวลา 30 min แล้วนำ test solution ออกจากตัวอย่างใส่ในขวดรูปหม้อ ปิดฝา วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ในกรณีนี้ให้คำนวณปริมาตรสุดท้ายกลับมาในอัตราส่วน 2 ml ต่อพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่าง 1 cm²) ถ่ายใส่ขวดแก้วมีฝาปิด
- 7.1.3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถบรรจุของเหลวได้ และทำด้วยวัสดุเดียวกันทั้งชิ้น (ข้อ 6.3) ใส่ 20 % ethanol (ข้อ 5.2) อุณหภูมิ 60 หรือ 95 °C ลงใน erlenmeyer flask ที่บรรจุตัวอย่างอยู่ภายใน ปิดด้วยกระจก นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 ± 2 °C หรือ 95 ± 2 °C แล้วแต่กรณี เป็นเวลา 30 min แล้วนำตัวอย่างออกจาก erlenmeyer flask ปิดฝาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ขวดแก้วมีฝาปิด
- 7.1.4 การเตรียม blank ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียม test solution โดยใช้ 20 % ethanol (ข้อ 5.2) โดยไม่ต้องมีตัวอย่าง

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สภาวะเครื่อง GC-FID

Column: capillary column HP-5, 30 m x 0.32 mm id, 0.25 μ m film thickness

Temperature program: 100 °C hold 1 min, 35 °C/min to 280 °C 5 min and
20 °C/min to 260 °C 2 min

Carrier gas: He 0.8 ml/min

Inlet temperature: 270 °C

Injection volume: 1 μ l /split ratio 1:1

FID detector: H₂ และ Air เพื่อจุด flame

Temperature detector (FID): 270 °C

7.2.2 ฉีดสารละลายมาตรฐาน caprolactam ในข้อ 5.3.1.3 เข้าเครื่อง GC-FID
จะได้ chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน

7.2.3 ฉีดสารละลาย blank และสารละลายตัวอย่าง ตามข้อ 7.1 เข้าเครื่อง GC-FID
จะได้ chromatogram ของสารละลายตัวอย่าง

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculations and expression of results)

8.1 การคำนวณใช้วิธีเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ peak ของ caprolactam

8.1.1 พื้นที่ใต้ peak ที่พบในสารละลายตัวอย่างน้อยกว่า 3 signal/noise ตอบ ไม่พบ

8.1.2 พื้นที่ใต้ peak ที่พบในสารละลายตัวอย่างมากกว่า 3 signal/noise แต่น้อยกว่า
พื้นที่ใต้ peak ที่พบในสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 15 μ g/ml ตอบ น้อยกว่า
15 mg/dm³

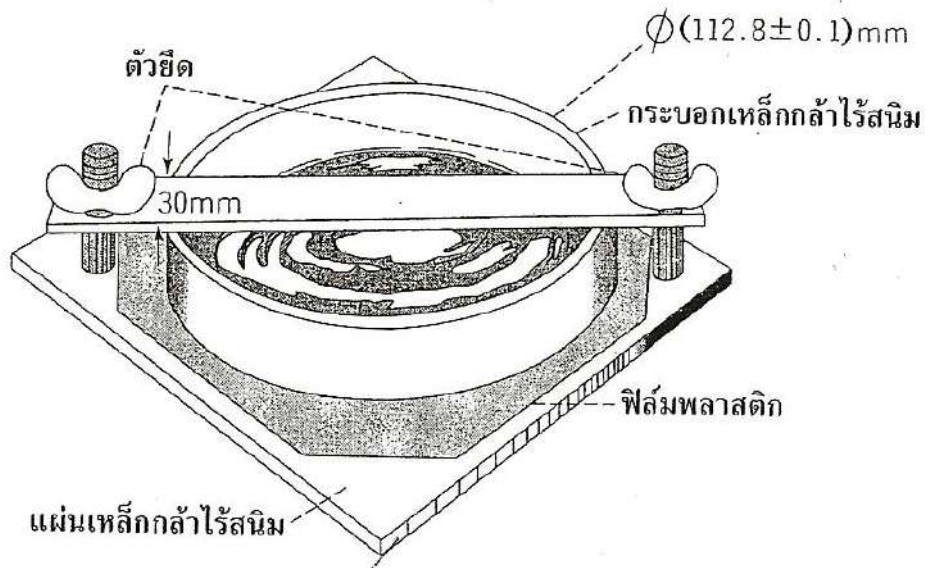
8.1.3 พื้นที่ใต้ peak ที่พบในสารละลายตัวอย่างสูงกว่าในสารละลายมาตรฐาน
ที่ความเข้มข้น 15 μ g/ml ควรใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐานและอ่านค่า
caprolactam เทียบกับกราฟมาตรฐาน

8.2 รายงานผลหน่วยเป็น mg/dm³

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์
- 9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่ RT ตรงกับ peak ของ caprolactam
- 9.3 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 1 ครั้ง และทุก 10 % ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละชุดของการวิเคราะห์
- 9.4 % recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ spiked sample ต้องอยู่ในช่วง 80-110

ภาคผนวก 1



รูปที่ 1 เครื่องสีกัด one – side

ภาคผนวก 2

วิธีคำนวณพื้นที่ผิวสัมผัส

การคำนวณพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่างให้พิจารณาตามความเหมาะสมกับรูปทรงของตัวอย่างและวิธีสกัดตัวอย่างเพื่อให้ได้พื้นที่ที่ถูกต้องใกล้เคียงกับพื้นที่จริงมากที่สุด

1. สูตรคำนวณพื้นที่รูปเรขาคณิต

- | | |
|---------------------------|---|
| 1.1 วงกลม | πR^2 |
| 1.2 วงรี | $\pi/4 \times (\text{ผลคูณของแกนสมมาตรทั้ง 2})$ |
| 1.3 ทรงกลม | $4\pi R^2$ |
| 1.4 สี่เหลี่ยมจัตุรัส | ด้าน x ด้าน |
| 1.5 สี่เหลี่ยมผืนผ้า | กว้าง x ยาว |
| 1.6 สี่เหลี่ยมคางหมู | $1/2 \times \text{สูง} \times \text{ผลบวกของด้านคู่ขนาน}$ |
| 1.7 สี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน | $1/2 \times \text{ผลคูณของเส้นทแยงมุม}$ |
| 1.8 สามเหลี่ยม | $1/2 \times \text{สูง} \times \text{ฐาน}$ |
| 1.9 ทรงกระบอก | $\pi R^2 + (2\pi R \times \text{สูง})$ |

2. การคำนวณพื้นที่ผิวสัมผัสภายในของภาชนะบรรจุรูปทรงอื่น นอกเหนือจากข้อ 1.

2.1 ใช้แถบกา

- 2.1.1 ที่ผิวภาชนะตัวอย่าง ด้านนอก ทำเครื่องหมายระดับของสารสกัดที่ต้องการใส่ในภาชนะ
- 2.1.2 ตัดแถบกาให้มีขนาดเท่ากับระยะรอบภาชนะตัวอย่าง
- 2.1.3 พันแถบการรอบภาชนะด้านนอก ที่ละแถบจนถึงระดับที่กำหนดไว้ในข้อ 2.1.1
- 2.1.4 ลอกแถบกาออกจากภาชนะ วัดความกว้าง และความยาวของแถบกาทุกชิ้น
- 2.1.5 คำนวณพื้นที่ของแถบกาแต่ละชิ้น
- 2.1.6 รวมพื้นที่ทั้งหมด

2.2 ใช้กระดาษตัดปะพื้นผิวภาชนะ

ปะกระดาษบนผิวด้านในของภาชนะ ให้แนบสนิทตามรูปทรงของภาชนะ แล้วนำกระดาษที่ปะไว้ออกมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้เป็นรูปเรขาคณิต คำนวณพื้นที่กระดาษที่ตัดไว้แต่ละชิ้นรวมพื้นที่ทั้งหมด

**DMSc F1098: การวิเคราะห์ปริมาณ 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine
ที่แพร่จากภาชนะบรรจุอาหารลงสู่อาหารจำลอง
Determination of 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine migration from
food packaging into food simulant**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine (เมลามีน) ที่แพร่ (migration) จากภาชนะบรรจุอาหารชนิดพลาสติกเทอร์โมเซต ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่กำหนดโดยวิธีนี้ โดย HPLC – DAD ซึ่งมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.25 µg/ml

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 DD CEN/TS 13130-27: 2005 Materials and articles in contact with foodstuffs - Plastics substances Subject to limitation - Part 27: Determination of 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine in food simulants
- 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

3. หลักการ (Principle)

สกัด 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine จากตัวอย่าง ด้วย 3% acetic acid ซึ่งเป็น อาหารจำลอง (food simulant) ภายใต้สภาวะทดสอบ migration ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 h วิเคราะห์ 2, 4, 6-triamino-1, 3, 5- triazine ด้วยเทคนิค HPLC – DAD และวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง HPLC – DAD

4.1.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$

4.1.3 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.4 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.1.5 อ่างน้ำคลื่นความถี่สูง (ultrasonic water bath)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิ เช่น เทอร์โมมิเตอร์

4.2.2 อุปกรณ์สำหรับวัดระยะ เช่น ไม้บรรทัดหรือ vernier

4.2.3 Cylinder ขนาด 250 ml

4.2.4 Volumetric flask ขนาด 1,000 และ 50 ml

4.2.5 Micropipette ขนาด 100 μl และ 1,000 μl

4.2.6 Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 ml

4.2.7 Beaker ขนาด 250, 100 ml

4.2.8 ขวดพลาสติกสำหรับใส่สารละลายตัวอย่าง

4.2.9 Membrane filter ขนาด pore size 0.45 μm

4.2.10 Vial สำหรับเครื่อง HPLC

5. สารเคมี (Reagents)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่า AR grade ยกเว้นเฉพาะที่กำหนดไว้ และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ที่มีค่า resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$

5.1 Acetic acid (CH_3COOH), glacial

5.2 Acetonitrile (CH_3CN), HPLC grade

5.3 Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{H}_2\text{NaO}_5\text{P}$)

5.4 Sodium hydroxide (NaOH)

- 5.5 Acetic acid (3 % w/v) (Food simulant): เจือจาง acetic acid (ข้อ 5.1) 30 g ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O
- 5.6 Sodium hydroxide (10% w/v) : ชั่ง sodium hydroxide (ข้อ 5.4) 10 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml ละลาย ด้วย H_2O ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O
- 5.7 5 mM phosphate buffer pH 6.5 : ชั่ง sodium phosphate monobasic (ข้อ 5.3) 690 mg ละลายด้วย H_2O 900 ml ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ± 0.2 ด้วย 10% sodium hydroxide (ข้อ 5.6) และ ปรับปริมาตรด้วย H_2O จนครบ 1,000 ml
- 5.8 สารมาตรฐาน (standards)
- 5.8.1 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine ($C_3H_6N_6$), purity >99 %
- 5.8.2 Stock standard solution, 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (1,000 $\mu g/ml$) : ชั่ง 2,4,6-triamino-1, 3,5-triazine (ข้อ 5.8.1) 50 mg ให้ละเอียดถึง 0.1 mg ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติม H_2O 40 ml นำไปวางใน ultrasonic water bath ที่อุณหภูมิ $70^\circ C$ เป็นเวลา 15-30 min เพื่อให้ละลาย แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิระหว่าง $-20^\circ C$ ถึง $20^\circ C$ ใช้ได้นาน 3 เดือน
- 5.8.3 Intermediate standard solution, 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (100 $\mu g/ml$) : ปิ่เปิด stock standard solution (ข้อ 5.8.2) 5 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย 3% acetic acid
- 5.8.4 Working standard solution, 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (0, 0.5, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 $\mu g/ml$) : ปิ่เปิด intermediate standard solution (ข้อ 5.8.3) 0, 0.05, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 3% acetic acid

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ใช้ตัวอย่างทดสอบจำนวน 3 ชิ้น เพื่อทดสอบ migration และ จำนวน 2 ชิ้น เพื่อวัด ปริมาตรของ food simulant ที่ใช้ทดสอบ วัดปริมาตรโดย ใส่ food simulant ลง ในตัวอย่างจนถึงระดับต่ำกว่าขอบบนสุด 5 mm บันทึกปริมาตรและคำนวณ ค่าเฉลี่ย หน่วยเป็น ml
- 6.2 คำนวณพื้นที่ผิวภายในตัวอย่างทดสอบ หน่วยเป็น dm^2

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัดสารละลายตัวอย่าง

- 7.1.1 ใส่ 3 % acetic acid ลงใน beaker ปริมาตรให้เพียงพอเพื่อใส่ในตัวอย่าง ทดสอบจำนวน 3 ชิ้น ตามที่คำนวณไว้ และเพิ่มอีก 100 ml เพื่อเตรียม blank นำไปอุ่นบน hot plate จนได้อุณหภูมิ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ เทใส่ตัวอย่าง ที่เตรียมไว้ ปริมาตรตามที่คำนวณได้ในข้อ 6.1 ปิดด้วยกระจก สารละลาย ที่เหลือใน beaker ปิดด้วยกระจก (blank) นำตัวอย่างและ blank ไปวางใน ตู้อบร้อน ควบคุมอุณหภูมิที่ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ สังเกตอุณหภูมิของสารละลาย food simulant เมื่อถึงระดับ $70 \pm 2^\circ\text{C}$ จับเวลา 2 h เมื่อครบเวลากำหนด รีบนำตัวอย่างและ blank ออกมา (ไม่ให้เกิน 5 min) เทสารละลายตัวอย่างทิ้ง
- 7.1.2 ทดสอบ migration ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ชิ้นทดสอบเดิมล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 7.1.1 เก็บสารละลายตัวอย่าง จากการทดสอบครั้งที่ 3 และ blank ใส่ขวดพลาสติก
- 7.1.3 กรองสารละลายในข้อ 7.1.2 ผ่าน membrane filter ขนาด pore size $0.45\ \mu\text{m}$ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC - DAD

7.2 วิธีวิเคราะห์

7.2.1 สภาพของเครื่อง HPLC - DAD

HPLC column	:	LC-NH ₂ , 250 x 4.6 mm
Mobile phase	:	75% acetonitrile : 25% 5mM phosphate buffer pH 6.5±0.2
Flow rate	:	1 ml/min
Detector	:	DAD (Wavelength 202 nm)
Injection volume	:	20 µl

7.2.2 นิด working standard solution (5.8.4) เข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟ

ความสัมพันธ์ ระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine โดยค่า $R^2 \geq 0.995$

7.2.3 นิดสารละลาย blank และสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 7.1.3) วัดปริมาณ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine ที่ได้ เทียบกับกราฟมาตรฐาน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculations and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine จากสูตร

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

เมื่อ M = ปริมาณ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (mg/ dm²)

C = ปริมาณ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine ที่อ่านได้จากกราฟ มาตรฐาน (µg/ml)

V = ปริมาณของ food simulant ที่ใช้ (100 ml = 0.1 L)

S = พื้นที่ผิวของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (dm²)

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

8.2 การรายงาน หน่วยเป็น mg/kg ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine จากการทดสอบ migration ครั้งที่ 3 โดย รายงานจากค่าเฉลี่ยในการทดสอบตัวอย่าง 3 ชิ้น

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบความพร้อม ของเครื่อง HPLC (system suitability) ก่อนการวิเคราะห์
- 9.2 วิเคราะห์ blank เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน chromatogram ของ blank ต้องไม่มี peak ที่ RT ตรงกับ peak ของ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine
- 9.3 วิเคราะห์ food simulant ที่เติมสารละลายมาตรฐานเพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์เกณฑ์ % recovery ต้องอยู่ในช่วง 80-110

DMSc F 1099: การวิเคราะห์สาร antimicrobial ในเนื้อสัตว์โดย LC-MS/MS

Determination of antimicrobial in animal tissue by LC-MS/MS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์สาร amphenicol, beta-lactam, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline ในเนื้อสัตว์โดยมี limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ดังตาราง

กลุ่มสาร	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
amphenicol		
-chloramphenicol	0.1	0.3
-florfenicol	1.0	3.0
-thiamphenicol	1.0	3.0
beta-lactam	30	50
macrolide	30	50
quinolone	5	10
sulfonamide	5	10
tetracycline	30	50

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 Chung-Wei-Tsai, Chan-Shing and Wei-Hsien. Multi-Residues Determination of Sulfonamide and Quinolone Residues in Fish tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Food and Drug Analysis. 2012; 20(3): 674-680 (SD 20 203 062)
- 2.2 Heller DN, Nochetto CB, Rummel NG, Thomas MH. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues. J Agric Food Chem. 2006; 54(15):5267-78. (SD 20 203 063)
- 2.3 Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) Official Journal of the European Communities L 221, 17.8.2002: 8-36.

3. หลักการ (Principle)

สาร antimicrobial 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม amphenicol, beta-lactam, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ ด้วย acetonitrile จากนั้นนำสารที่สกัดได้กำจัดไขมันด้วย hexane ที่อิ่มตัวด้วย acetonitrile ระเหยสารที่สกัดได้จนแห้ง ละลาย residue ด้วยสารละลายผสมของ 0.1% formic acid: MeOH (1:1) 1,000 mL จากนั้นตรวจชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS คำนวณปริมาณจาก calibration curve ที่ plot ระหว่าง peak area ratio ของ standard และ internal standard กับ concentration ratio ของ standard และ internal standard โดยใช้ internal standard สำหรับทดสอบสารดังตาราง

กลุ่มสาร	internal standard
amphenicol	chloramphenicol-D ₅
beta-lactam	erythromycin- ¹³ C ₂
macrolide	erythromycin- ¹³ C ₂
quinolone	norfloxacin-D ₅
sulfonamide	sulfamethazine-D ₄ , sulfadoxine-D ₃
tetracycline	erythromycin- ¹³ C ₂

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 g

4.1.2 เครื่องชั่งความละเอียด 0.00001 g

4.1.3 เครื่องบดเนื้อ

4.1.4 Refrigerator centrifuge

4.1.5 Nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box

4.1.6 Vortex mixer

4.1.7 Shaker

4.1.8 LC-MS/MS system ประกอบด้วย

- Binary pump: Agilent 1100 series
- Autosampler: Agilent 1100 series
- Micro vacuum degasser: Agilent 1100 series
- Thermostatted column compartment: Agilent 1100 series
- Triple quadrupole mass spectrometer: API 4000

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Screw cap centrifuge tube ขนาด 30 mL และ 50 mL
- 4.2.2 Test tube ขนาด 10 mL
- 4.2.3 Micropipette ขนาด 10-100 μ L, 20-200 μ L และ 100-1,000 μ L
- 4.2.4 Tip ขนาด 10-100 μ L, 20-200 μ L และ 100-1,000 μ L
- 4.2.5 Volumetric flask ขนาด 10, 50 และ 1,000 mL
- 4.2.6 Separatory funnel ขนาด 500 mL
- 4.2.7 Micro-spin filter tube ชนิด PVDF 0.45 μ m
- 4.2.8 Vial สีขาวขนาด 2 mL
- 4.2.9 Filtering device for HPLC eluents
- 4.2.10 Membrane filter ชนิด PVDF ขนาด $\varnothing$ 47 mm 0.45 μ m

5. สารเคมี (Reagents)

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

5.1 Methanol ($MeOH$) (Merck, gradient grade for liquid chromatography) หรือเทียบเท่า

5.2 Acetonitrile (CH_3CN) (JT.Baker, HPLC grade) หรือเทียบเท่า

5.3 Hexane (C_6H_{14})

5.4 Formic acid ($HCOOH$), (98-100%)

5.5 Ammonium acetate

5.6 Hexane saturated with acetonitrile: นำ hexane 250 ml เติม acetonitrile 50 ml เขย่า 1 min ใน separatory funnel ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำชั้น hexane ไปใช้ในการกำจัดไขมัน

5.7 Mobile phase A; 2mM ammonium acetate in 0.1% formic acid: ชั่ง ammonium acetate 0.77 g ละลายใน 0.1% formic acid และปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วย 0.1% formic acid แล้วกรองผ่าน membrane filter ชนิด PVDF ขนาด $\varnothing 47$ mm, $0.45\ \mu\text{m}$ ด้วย filtering device for HPLC eluents

5.8 สารมาตรฐาน (Standards)

5.8.1 สารกลุ่ม beta lactam 6 สาร ได้แก่ cefalexin, cefazolin, cloxacillin, dicloxacillin, nafcillin และ oxacillin

5.8.2 สารกลุ่ม amphenicol 3 สาร ได้แก่ chloramphenicol, florphenicol และ thiamphenicol

5.8.3 สารกลุ่ม macrolide 4 สาร ได้แก่ erythromycin, josamycin, lincomycin และ tilmicosin

5.8.4 สารกลุ่ม quinolone 11 สาร ได้แก่ danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, flumequine, levofloxacin, marbofloxacin, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, oxolinic acid และ sarafloxacin,

5.8.5 สารกลุ่ม sulfonamide 13 สาร ได้แก่ sulfadiazine, sulfadimidine (or sulfamethaxine), sulfadoxine, sulfadimethoxine, sulfamerazine, sulfamethizole, sulfamethoxazole, sulfamonomethoxine, sulfaquinoxaline, sulfisoxazole, sulfathiazole, sulfapyridine และ trimethoprim

5.8.6 สารกลุ่ม tetracycline 4 สาร ได้แก่ chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline และ tetracycline

5.8.7 Internal standard

5.8.7.1 Chloramphenicol-D₅ สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม amphenicol

5.8.7.2 Erythromycin-¹³C₂ สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม macrolide
beta-lactam และ tetracycline

5.8.7.3 Norfloxacin-D₅ สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม quinolone

5.8.7.4 Sulfadoxine-D₃, sulfamethazine-D₄ สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม
sulfonamide

5.9 สารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐานอยู่ในรูป salt base ต้องคำนวณปริมาณตาม formula และความ
บริสุทธิ์ของสารมาตรฐานแต่ละตัว ตัวอย่าง เช่น norfloxacin hydrochloride มี
HCl 1 โมเลกุล MW เท่ากับ 355.8 และมีความบริสุทธิ์ 94%

ดังนั้นถ้าต้องการชั่งน้ำหนัก 10 mg ต้องชั่ง $\frac{(355.8 \times 10) \times 100}{319.3 \times 94} = 11.85 \text{ mg}$

5.9.1 Stock standard solution (1,000 µg/mL): ชั่งสารมาตรฐานประมาณ 10 mg
โดยใช้เครื่องชั่งความละเอียดอย่างน้อย 0.1 mg คำนวณน้ำหนักตามข้อ 5.9
ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 10 mL ใน volumetric flask ด้วยสารละลายที่
เหมาะสม เก็บในตู้เย็น -20°C มีอายุการใช้งาน 6 เดือน ยกเว้นกลุ่ม beta-
lactam เก็บในตู้เย็น -20°C มีอายุการใช้งาน 3 เดือน
สารละลายที่ใช้

- MeOH สำหรับกลุ่ม amphenicol, macrolide, sulfonamide และ tetracycline
- H₂O สำหรับกลุ่ม beta lactam
- 2% 2M NH₄OH in MeOH สำหรับกลุ่ม quinolone

5.9.2 Working standard solution (10 µg/mL); สารกลุ่ม amphenicol, beta- lactam,
macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline ยกเว้น chloramphenicol
(1 µg/mL) ผสมเฉพาะสารในกลุ่มเดียวกันเก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน
1 เดือน

: ปิเปต stock standard solution (5.9.1) สารกลุ่ม amphenicol, beta-lactam, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline (1000 $\mu\text{g/mL}$) ยกเว้น chloramphenicol (100 $\mu\text{g/mL}$) ชนิดละ 100 μL แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL ใน volumetric flask ด้วย

- MeOH สำหรับสารกลุ่ม amphenicol, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline
- H_2O สำหรับกลุ่ม beta lactam

5.9.3 Working standard solution (1 $\mu\text{g/mL}$) สารกลุ่ม amphenicol, beta-lactam, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 เดือน: ปิเปต working standard solution (ข้อ 5.9.2) สารกลุ่ม amphenicol, beta lactam, macrolide (10 $\mu\text{g/mL}$) , quinolone, sulfonamide แต่ละกลุ่ม 1,000 mL ปรับปริมาตรเป็น 10 mL ใน volumetric flask ด้วย

- MeOH สำหรับสารกลุ่ม amphenicol, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline
- H_2O สำหรับกลุ่ม beta lactam

5.9.4 Stock internal standard (1,000 $\mu\text{g/mL}$): ละลาย internal standard 10 mg และปรับปริมาตรเป็น 10 mL ใน volumetric flask ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น -20°C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

5.9.5 Working internal standard solution (1 $\mu\text{g/mL}$): เจือจาง stock internal standard (ข้อ 5.9.4) 50 μL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

5.9.6 Working internal standard solution (100 ng/mL): เจือจาง working internal standard solution (ข้อ 5.9.5) 100 μL ปรับปริมาตรเป็น 10 mL ใน volumetric flask ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ น้ำหนักประมาณ 300-500 g ตัดส่วนที่เป็นไขมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด

7.1.1 ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ 2 ± 0.05 g โดยใช้เครื่องชั่งความละเอียดอย่างน้อย 0.01 g ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 30 mL (ส่วนที่เหลือเก็บไว้เป็น retained portion ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -15°C)

7.1.2 เติม working internal standard solution ตามตารางแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ปริมาตร (μL)
chloramphenicol-d5	0.1	20
erythromycin-13C2	1.0	200
norfloxacin-d5	1.0	100
sulfadoxine-d3	1.0	100
sulfamethazine-d4	1.0	100

7.1.3 เติม H_2O 500 mL นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min

7.1.4 เติม acetonitrile 6 mL นำไปเขย่าด้วย shaker ประมาณ 10 min

7.1.5 ตัวอย่างที่ได้นำไป centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 6,000 rpm นาน 10 min

7.1.6 เก็บส่วนใสที่ได้ใส่ screw cap centrifuge tube ขนาด 50 mL

7.1.7 สกัดซ้ำด้วย acetonitrile 4 mL (ตามข้อ 7.1.4 ถึง 7.1.6)

7.1.8 เติม hexane saturated with acetonitrile 10 ml นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min

7.1.9 Centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 6,000 rpm นาน 10 min ดูดชั้น hexane ที่

- 7.1.10 นำสารละลายที่ได้มาระเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45°C จนแห้งพอดี
- 7.1.11 ละลาย residue ที่ได้จากสารละลายผสม 0.1% formic acid: MeOH (1:1) 1 mL นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min
- 7.1.12 ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ micro-spin filters ชนิด PVDF
- 7.1.13 Centrifuge ที่ความเร็ว 5,500 rpm นาน 10 min
- 7.1.14 เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน vials สีชา ขนาด 2 mL
- 7.1.15 นำไปวิเคราะห์ต่อโดยเครื่อง LC-MS/MS
- 7.2 การสร้าง standard curve (matrix-matched standard curve)
- 7.2.1 ชั่งตัวอย่าง (matrix blank) 2 ± 0.05 g ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 30 mL จำนวน 7 หลอด เติมสารละลายมาตรฐาน antimicrobial 6 กลุ่ม ได้แก่ amphenicol, beta-lactam, quinolone, macrolide, sulfonamide และ tetracycline ความเข้มข้นต่างๆ และ internal standard ดังตาราง แล้วสกัดตามข้อ 7.1.3-7.1.15

กลุ่มสาร beta-lactam, macrolide และ tetracycline

ความเข้มข้น (ng/g)	ปริมาตร standard (μ L) ความเข้มข้น 1 μ g/mL	ปริมาตร standard (μ L) ความเข้มข้น 10 μ g/mL
0.0	0	-
30	60	-
50	100	-
75	150	-
100	-	20
150	-	30
200	-	40

กลุ่มสาร quinolone และ sulfonamide

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/g}$)	ปริมาตร standard (μL) ความเข้มข้น $1\mu\text{g/mL}$	ปริมาตร standard (μL) ความเข้มข้น $10\mu\text{g/mL}$
0.0	0	-
5	10	-
10	20	-
20	40	-
50	100	-
100	-	20
200	-	40

กลุ่มสาร amphenicol: chloramphenicol/ florfenicol, thiamphenicol

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/g}$)	ปริมาตร std. chloramphenicol (mL) ความเข้มข้น 100 ng/mL	ปริมาตร std. florfenicol thiamphenicol (mL) ความเข้มข้น $1\mu\text{g/mL}$
0.0/ 0.0	0	0
0.1/ 1.0	2	2
0.3/ 3.0	6	6
0.5/ 5.0	10	10
1.0/ 10.0	20	20
2.0/ 20.0	40	40
5.0/ 50.0	100	100

Internal standard

สาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	ปริมาตร (µL)
chloramphenicol-D ₅	0.1	20
erythromycin- ¹³ C ₂	1.0	200
norfloxacin-D ₅	1.0	100
sulfadoxine-D ₃	1.0	100
sulfamethazine-D ₄	1.0	100

7.2.2 สร้าง standard curve ระหว่าง peak area ratio กับ concentration ratio

โดย $\text{peak area ratio} = \frac{\text{peak area of standard}}{\text{peak area of internal standard}}$

$\text{Conc. ratio} = \frac{\text{concentration of standard}}{\text{concentration of internal standard}}$

7.3 การหาปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

สภาวะเครื่อง LC-MS/MS

7.3.1 LC conditions;

- Column: eclipse plus C-18 (100 mm x 4.6 mm, 3.5 µm)
- Mobile phase A: 2mM NH₄OAC in 0.1% formic acid
- Mobile phase B: CH₃CN
- Flow rate: 0.5 mL/min
- Injection volume: 10 µL
- Column temperature: 25°C
- Gradient LC conditions;

สำหรับ beta-lactam, macrolide quinolone sulfonamide และ tetracycline

time (min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.0-1.0	98	2
11.0-13.0	0	100
15.0-20.0	98	2

สำหรับ amphenicol

time (min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.0	80	20
5.0-7.5	20	80
7.5-10.0	80	20

7.3.2 MS conditions;

7.3.2.1 MS conditions สำหรับ beta-lactam, macrolide, quinolone, sulfonamide และ tetracycline

- Ionization mode; ESI (turbo spray), positive
- Scan type ; MRM
- Ion spray voltage; 5500 eV
- Temperature TEM; 500°C
- Collision gas, CAD; nitrogen ; 7 psig
- Curtain gas (CUR); 30 psig
- Ion spray nebulizer gas (GS-1); 60 psig
- TIS Heater Gas (GS-2); 60 psig
- Entrance potential (EP); 10 V

7.3.2.2 MS conditions สำหรับ amphenicol

- Ionization mode; ESI (turbo spray), negative
- Scan type ; MRM
- Ion spray voltage; -3500 eV
- Temperature TEM; 450°C
- Collision gas, CAD; nitrogen ; 5 psig
- Curtain gas (CUR); 20 psig
- Ion spray nebulizer gas (GS-1); 55 psig
- TIS Heater Gas (GS-2); 55 psig
- Entrance potential (EP); -10 V

7.3.3 MS/MS fragmentation conditions;

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	dwell time (ms)	DP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
กลุ่ม amphenicol						
1. chloramphenicol	321.0	151.7 (primary)	250	-66	-24	-7
		256.7 (seconary)	250	-66	-16	-17
2. florfenicol	356.0	335.8 (primary)	250	-100	-14	-13
		185.0 (seconary)	250	-100	-26	-13
3. thiamphenicol	354.0	185.0 (primary)	250	-110	-30	-7
		290.0 (seconary)	250	-110	-18	-9
4.chloramphenicol-d5	326.0	156.7	250	-66	-24	-7
กลุ่ม beta-lactam						
1. cefalexin	348.0	158.0 (primary)	5	60	15	15
		174.0 (seconday)	5	60	20	10
2. cefazolin	455.0	323.0 (primary)	5	60	15	15
		156.0 (seconary)	5	60	20	10
3. cloxacillin	436.0	277.0 (primary)	5	70	20	12
		160.0 (seconary)	5	70	20	12
4. dicloxacillin	470.0	160.0 (primary)	5	80	21	12
		311.0 (seconary)	5	80	22	12
5. nafcillin	415.0	199.1 (primary)	5	85	19	12
		171.0 (seconary)	5	85	47	12
6. oxacillin	402.2	160.0 (primary)	5	80	18	10
		243.0 (seconary)	5	80	18	10

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	dwell time (ms)	DP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
กลุ่ม macrolide						
1. erythromycin	734.5	158.2 (primary)	5	65	27	12
		576.0 (secondary)	5	65	40	10
2. josamycin	828.7	174.0 (primary)	5	100	43	12
		109.0 (secondary)	5	100	45	12
3. lincomycin	407.2	126.1 (primary)	5	100	37	10
		359.0 (secondary)	5	100	25	15
4. tilmicosin	869.5	174.0 (primary)	5	100	56	20
		696.5 (secondary)	5	80	28	10
5. erythromycin-13C2	736.5	578.3	5	80	27	10

กลุ่ม quinolone						
1. danofloxacin	358.2	340.0 (primary)	5	70	29	10
		255.0 (secondary)	5	70	51	10
2. difloxacin	400.2	356.0 (primary)	5	65	27	15
		299.0 (secondary)	5	65	37	13
3. enrofloxacin	360.1	342.1 (primary)	5	70	25	13
		316.1 (secondary)	5	70	27	13
4. flumequine	262.1	244.0 (primary)	5	60	41	12
		202.0 (secondary)	5	60	23	12
5. levofloxacin	362.1	261.1 (primary)	5	50	25	4
		221.1 (secondary)	5	50	25	4
6. marbofloxacin	363.2	345.0 (primary)	5	66	21	12
		320.0 (secondary)	5	66	25	12
7. nalidixic acid	233.1	215.0 (primary)	5	50	19	12
		187.0 (secondary)	5	50	33	12
8. norfloxacin	320.1	302.0 (primary)	5	70	27	12
		270.0 (secondary)	5	65	25	12

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	dwell time (ms)	DP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
กลุ่ม quinolone (ต่อ)						
9. ofloxacin	362.0	261.0 (primary)	5	50	25	4
		318.0 (seconary)	5	50	30	4
10. oxolinic acid	262.1	244.0 (primary)	5	56	23	12
		216.(secondary)	5	56	37	12
11. sarafloxacin	386.1	342.0 (primary)	5	65	25	12
		299.0 (seconary)	5	65	39	12
12. norfloxacin-d5	325.1	307.0	5	70	27	12
กลุ่ม sulfonamide						
1. sulfadiazine	251.1	156.0 (primary)	5	55	31	10
		108.0 (seconary)	5	55	21	10
2. sulfadimidine (or sulfamethaxine)	279.1	124.0 (primary)	5	66	36	10
		92.0 (secondary)	5	66	36	10
3. sulfadimethoxine	311.2	156.1 (primary)	5	90	28	10
		245.2 (seconary)	5	90	28	15
4. sulfadoxine	311.2	156.2 (primary)	5	90	28	10
		108.0 (seconary)	5	90	40	10
5. sulfamerazine	265.1	156.1 (primary)	5	60	25	10
		172.2 (seconary)	5	60	25	10
6. sulfamethizole	271.0	156.0 (primary)	5	70	20	10
		108.2 (seconary)	5	70	37	9
7. sulfamethoxazone	254.1	156.0 (primary)	5	70	21	10
		92.0 (secondary)	5	70	37	12
8. sulfamonomethoxine	281.0	156.0 (primary)	5	75	23	10
		108.0 (seconary)	5	75	34	10
9. sulfapyridine	250.1	156.1 (primary)	5	65	22	10
		92.0 (secondary)	5	65	38	10

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	dwell time (ms)	DP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
กลุ่ม sulfonamide (ต่อ)						
10. sulfaquinoxaline	301.1	156.0 (primary)	5	60	22	11
		108.0 (seconary)	5	60	35	13
11. sulfisoxazone	268.1	156.1 (primary)	5	41	19	12
		113.0 (seconary)	5	41	22	10
12. sulfathiazole	256.0	156.1 (primary)	5	77	31	10
		92.0 (secondary)	5	77	37	10
13. trimetoprim	291.0	230.0 (primary)	5	80	30	13
		123.0 (seconary)	5	80	30	13
14. sulfadoxine-d3	314.2	156.0	5	90	28	10
15. sulfamethaxine-d4	283.1	186.1	5	66	36	10
กลุ่ม tetracycline						
1. chlortetracycline	479.1	444.2 (primary)	5	40	28	12
		462.0 (seconary)	5	40	25	12
2. doxycycline	445.2	428.0 (primary)	5	85	28	10
		154.0 (seconary)	5	85	40	7
3. oxytetracycline	461.1	426.2(primary)	5	40	28	11
		443.3 (seconary)	5	40	20	12
4. tetracycline	445.1	410.0 (primary)	5	66	29	10
		154.0 (seconary)	5	66	39	8

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก standard curve

โดยใช้สมการเส้นตรง $Y = aX + b$

ปริมาณของสารที่ตรวจพบ, $C_A (\mu\text{g/kg}) = (Y - b) \times C_{IS} (\mu\text{g/kg}) / a$

โดย $X = \text{concentration ratio}, C_A (\mu\text{g/kg}) / C_{IS} (\mu\text{g/kg})$

$Y = \text{peak area ratio}$

$C_A = \text{conc. of analyte } (\mu\text{g/kg})$

$C_{IS} = \text{conc. of internal standard } \mu\text{g/kg}$

$a = \text{slope ของ calibration curve}$

$b = \text{intercept ของ calibration curve}$

8.2 การรายงานผล

8.2.1 กรณีตรวจไม่พบ หรือพบน้อยกว่าค่า LOD รายงาน ไม่พบ

8.2.2 กรณีตรวจพบมากกว่าค่า LOD แต่น้อยกว่า LOQ รายงาน
พบน้อยกว่า LOQ

8.2.3 กรณีตรวจพบเท่ากับหรือมากกว่า LOQ ให้รายงานปริมาณที่พบโดยใช้
ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ในหน่วยไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g/kg}$)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทำ standard curve ทุกครั้งในการวิเคราะห์ โดยมีค่า determination coefficient, R^2 ต้องมากกว่า หรือ เท่ากับ (≥ 0.95)

9.2 คำนวณ % relative intensities ของ analyte ion intensities ratio กับ standard ion intensities ratio เพื่อยืนยันการตรวจพบโดย % relative intensities ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ $\pm 20\%$

$$\% \text{ Relative intensities} = \frac{(r_{\text{analyte}} - r_{\text{std}}^-)}{r_{\text{std}}^-} \times 100$$

โดย

$r_{\text{analyte}} = \text{ratio ของ secondary ion intensities ต่อ primary ion intensities ของ analyte}$

$r_{\text{std}} = \text{ratio ของ secondary ion intensities ต่อ primary ion intensities ของ standard}$

$r_{\text{std}}^- = \text{ค่าเฉลี่ย ของ } r_{\text{std}} \text{ ทุกความเข้มข้นของ standard curve}$

- 9.3 ทดสอบ method blank ทุกครั้งในการวิเคราะห์
- 9.4 ทดสอบ matrix blank ทุกครั้งในการวิเคราะห์
- 9.5 duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง กรณีพบปริมาณสารที่สนใจ สูงกว่าค่า LOQ ให้คำนวณ % RPD ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25%
- 9.6 spiked sample โดยใช้ negative sample อย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง ที่ระดับที่กำหนด คำนวณ % recovery ต้องอยู่ในช่วงยอมรับตามตาราง

กลุ่มสาร	ระดับ (µg/kg)	ค่า % recovery
Amphenicol		
-chloramphenicol	0.5	50-120
-florfenicol/thiamphenicol	5.0	60-120
beta-lactam	75	70-120
macrolide	75	70-120
quinolone	20	70-120
sulfonamide	20	70-120
tetracycline	75	70-120

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) โดยห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารในเนื้อสัตว์ (โดยใช้เนื้อไก่ และเนื้อปลาเป็นตัวแทน) ดำเนินการเดือนมกราคม ถึง พฤษภาคม และ พฤศจิกายน 2560

- 10.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve: matrix matching) โดยสร้างกราฟมาตรฐานที่ 6 ระดับความเข้มข้น พบว่าได้กราฟเส้นตรงของสารต้านจุลชีพทั้ง 6 กลุ่ม 41 ชนิด คำนวณหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (determination coefficient, R^2) โดยค่า R^2 ที่ได้ ≥ 0.95

10.2 การยืนยันค่า Limit of detection, LOD

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 กลุ่ม และ internal standard ที่ระดับความเข้มข้นดังตาราง ลงใน matrix blank จำนวน 10 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ตามวิธี ผลตรวจพบสาร antimicrobial ทั้ง 6 กลุ่มโดยมีค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) มากกว่า 3 และ % relative intensities น้อยกว่า $\pm 20\%$ ทุกตัวอย่าง

10.3 การยืนยันค่า Limit of quantitation, LOQ

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 กลุ่ม และ internal standard ที่ระดับความเข้มข้นดังตาราง ลงใน matrix blank จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ตามวิธี แล้วคำนวณ % recovery และ mean recovery และคำนวณค่า % RSD ของปริมาณที่ตรวจพบ

10.4 ทดสอบ accuracy และ precision

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด และ internal standard ใน matrix blank ตามตาราง ทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ในเนื้อไก่ และ 1 ระดับความเข้มข้น ในเนื้อปลา ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ตามวิธี คำนวณ % recovery และ mean recovery และคำนวณค่า % RSD ของปริมาณที่ตรวจพบ

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ค่า LOD, LOQ

กลุ่มสาร	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2)
amphenicol	0.1	0.3	≥ 0.95
-chloramphenicol			
-florfenicol			
-thiamphenicol			
beta-lactam	30	50	≥ 0.95
macrolide	30	50	≥ 0.95
quinolone	5	10	≥ 0.95
sulfonamide	5	10	≥ 0.95
tetracycline	30	50	≥ 0.95

ผลการทดสอบ accuracy และ precision แสดงดังตาราง

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
กลุ่ม amphenicol	chloramphenicol	0.3, LOQ	0.31-0.32	0.32 $\pm$ 0.01	105.1	2.1	0.26-0.31	0.29 $\pm$ 0.02	97.3	6.2
		0.5	0.51-0.54	0.52 $\pm$ 0.01	103.9	2.3				
		1.0	1.00-1.09	1.04 $\pm$ 0.03	104.5	2.9				
		2.0					1.9-2.1	2.0 $\pm$ 0.1	100.5	2.8
		5.0	4.05-4.25	4.12 $\pm$ 0.06	82.4	1.6				
	florfenicol	3.0 , LOQ	2.5-3.2	3.0 $\pm$ 0.02	100.1	6.6	2.4-3.1	2.9 $\pm$ 0.2	96.6	7.0
		5.0	4.9-5.4	5.1 $\pm$ 0.2	101.9	3.3				
		10.0	9.8-10.9	10.1 $\pm$ 0.3	101.1	3.1				
		20.0					20.1-21.0	20.4 $\pm$ 0.3	101.9	1.4
		50.0	41.9-53.5	51.3 $\pm$ 1.5	102.5	2.9				
	thiamphenicol	3.0 , LOQ	1.6-2.9	2.6 $\pm$ 0.04	86.5	13.8	2.5-3.0	2.8 $\pm$ 0.2	93.3	6.4
		5.0	4.1-5.4	4.8 $\pm$ 0.4	96.3	8.7				
		20.0					17.8-20.7	20.1 $\pm$ 0.5	100.3	2.6
		10.0	8.1-9.9	9.1 $\pm$ 0.5	90.6	5.8				
		50.0	50.5-53.5	51.3 $\pm$ 1.0	102.6	2.0				
กลุ่ม beta-lactam	cloxacillin	50.0 , LOQ	29.9-55.0	48.8 $\pm$ 8.2	97.6	16.7	48.1-54.1	50.8 $\pm$ 1.9	101.5	3.8
		75.0	74.6-79.5	78.1 $\pm$ 2.2	104.2	2.8				
		100.0	102.0-116.0	106.4 $\pm$ 4.1	106.4	3.8	96.8-105.0	101.4 $\pm$ 2.5	101.4	2.4
		200.0	204.0-220.0	213.8 $\pm$ 5.4	106.9	2.5				
	dicloxacillin	50.0 , LOQ	35.3-57.5	47.9 $\pm$ 6.7	95.8	14	50.6-53.1	51.5 $\pm$ 0.7	103.1	1.3
		75.0	74.4-83.3	78.4 $\pm$ 2.6	104.5	3.4				
		100.0	101.0-108.0	105.4 $\pm$ 2.3	105.4	2.2	92.6-102.0	98.1 $\pm$ 3.4	98.1	3.4
		200.0	208.0-216.0	212.0 $\pm$ 3.3	106.0	1.5				
	oxacillin	50.0 , LOQ	35.6-58.5	50.9 $\pm$ 6.8	101.8	13.3	50.7-52.9	52.0 $\pm$ 0.7	104.1	1.4
		75.0	76.5-81.8	78.9 $\pm$ 1.5	105.2	1.9				
		100.0	101.0-110.0	106.2 $\pm$ 2.6	106.2	2.5	99.8-104.0	101.4 $\pm$ 1.2	101.4	1.2
		200.0	206.0-216.0	210.8 $\pm$ 4.0	105.4	1.9				
	ceftalexin	50.0 , LOQ	42.7-53.0	49.9 $\pm$ 2.7	99.8	5.4	41.6-52.2	49.1 $\pm$ 3.5	98.1	7.1
		75.0	63.5-76.5	69.2 $\pm$ 4.4	92.3	6.3				
		100.0	75.7-103.0	98.3 $\pm$ 9.1	98.3	9.3	79.1-106.0	91.7 $\pm$ 8.1	91.7	8.8
		200.0	148.8-165.2	158.7 $\pm$ 5.5	79.4	3.4				

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
กลุ่ม beta-lactam	cefazolin	50.0 , LOQ	45.8-52.0	49.6 $\pm$ 17	99.3	3.4	50.8-54.2	52.5 $\pm$ 1.4	105	2.6
		75.0	70.0-76.5	74.8 $\pm$ 1.9	99.7	2.6				
		100.0	78.8-103.0	99.0 $\pm$ 7.9	99.0	8.0	98.4-104.0	100.8 $\pm$ 1.5	100.8	1.5
		200.0	187.2-204.0	198.6 $\pm$ 4.5	99.3	2.3				
	naicillin	50.0 , LOQ	41.8-55.5	50.9 $\pm$ 3.9	101.8	7.7	38.4-63.0	49.5 $\pm$ 6.8	99.0	13.7
		75.0	74.8-78.0	75.7 $\pm$ 1.0	101.0	1.4				
		100.0	98.0-106.0	101.7 $\pm$ 2.3	101.7	2.3	70.9-100.0	92.6 $\pm$ 8.4	92.6	9.0
		200.0	200-212.0	204.4 $\pm$ 4.6	102.2	2.3				
กลุ่ม macrolide	erythromycin	50.0 , LOQ	50.0-54.0	52.2 $\pm$ 2.1	104.3	4.0	50.2-52.8	51.2 $\pm$ 1	102.4	2.0
		75.0	75.8-80.3	78.1 $\pm$ 2.1	104.1	2.7				
		100.0	100.0-108.0	103.0 $\pm$ 2.9	103.0	2.8	83.6-103.0	99.8 $\pm$ 5.7	99.8	5.8
		200.0	200.0-218.0	209.4 $\pm$ 6.7	104.7	3.2				
	josamycin	50.0 , LOQ	49.6-52.5	50.7 $\pm$ 0.9	101.4	1.7	25.7-50.0	46.6 $\pm$ 7.0	98.3	15.7
		75.0	61.9-77.3	68.0 $\pm$ 6.2	90.6	9.2				
		100.0	8.5-108.0	102.0 $\pm$ 5.8	102.0	5.7	83.0-103.0	97.8 $\pm$ 6.9	97.8	7.1
		200.0	176.6-214.0	199.1 $\pm$ 14.2	99.6	7.1				
	lincomycin	50.0 , LOQ	40.6-54.0	50.0 $\pm$ 3.8	99.9	7.5	39.0-51.4	45.5 $\pm$ 4.4	91.0	9.7
		75.0	31.7-63.5	48.6 $\pm$ 11.7	64.8	24.1				
		100.0	81.5-98.1	89.6 $\pm$ 6.1	89.6	6.8	82.0-103.0	99.1 $\pm$ 6.1	99.1	6.2
		200.0	160.2-216.0	184.6 $\pm$ 20.5	92.3	11.1				
	tulmicosin	50.0 , LOQ	49.1-54.5	52.3 $\pm$ 1.9	104.5	3.6	49.6-52.2	50.5 $\pm$ 0.9	86.7	1.7
		75.0	61.3-4.9	66.8 $\pm$ 1.9	89.0	8.0				
		100.0	82.9-111.0	93.3 $\pm$ 9.0	93.3	9.7	84.2-103.0	97.4 $\pm$ 5.5	97.4	5.7
		200.0	160.2+194.4	171 $\pm$ 12.6	86.0	7.4				
กลุ่ม quinolone	danofloxacin	10.0 , LOQ	5.8-11.2	9.5 $\pm$ 1.6	94.8	17.3	9.0-10.1	9.6 $\pm$ 0.4	96.1	4.0
		20.0	18.2-23.0	20.7 $\pm$ 1.6	103.5	7.9				
		50.0	49.7-54.0	52.8 $\pm$ 1.6	105.5	3.0				
		100.0					90.7-106.0	101.4 $\pm$ 4.2	101.4	4.2
		200.0	173.0-212.0	195.3 $\pm$ 12.5	97.6	6.4				
	difloxacin	10.0 , LOQ	6.0-11.3	9.5 $\pm$ 1.5	94.8	15.6	9.5-10.9	10.4 $\pm$ 0.5	103.5	5.1
		20.0	17.7-21.4	19.8 $\pm$ 1.2	98.8	6.2				
		50.0	51.0-54.5	52.3 $\pm$ 1.1	104.6	2.1				
		100.0					100.0-103.0	101.4 $\pm$ 1.1	101.4	1.1
		200.0	154.8+194.4	175.4 $\pm$ 14.3	87.7	8.1				

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
กลุ่ม quinolone	enrofloxacin	10.0 , LOQ	5.1-9.9	8.4 $\pm$ 1.4	84.2	16.8	8.2-10.4	9.5 $\pm$ 0.8	95.2	8.3
		20.0	19.0-22.4	20.4 $\pm$ 1.1	102.1	5.5				
		50.0	50.0-54.0	52.5 $\pm$ 1.8	104.9	3.3				
		100.0					96.7-104.0	101.1 $\pm$ 1.9	101.1	1.9
		200.0	164.6-191.8	181.0 $\pm$ 9.5	90.5	5.2				
	flumequine	10.0 , LOQ	7.8-10.6	10.0 $\pm$ 0.8	100.4	8.1	8.5-10.3	9.8 $\pm$ 0.5	98.1	5.4
		20.0	18.5-20.6	20.0 $\pm$ 0.6	100.0	3.0				
		50.0	50.0-52.5	51.1 $\pm$ 0.8	102.2	1.5				
		100.0					99.3-104.0	101.5 $\pm$ 1.7	101.5	1.6
		200.0	179.8-206.0	199.8 $\pm$ 7.4	99.9	3.7				
	levofloxacin	10.0 , LOQ	7.7-10.3	9.5 $\pm$ 0.8	94.8	8.4	9.0-10.8	9.6 $\pm$ 0.8	96.3	8.1
		20.0	18.8-21.8	20.2 $\pm$ 0.9	101.1	4.7				
		50.0	49.9-54.5	51.9 $\pm$ 1.4	103.8	2.7				
		100.0					95.2-107.0	102.3 $\pm$ 3.7	102.3	3.6
		200.0	189.8-208.0	199.3 $\pm$ 7.0	99.7	3.5				
	marbofloxacin	10.0 , LOQ	8.2-10.6	10.1 $\pm$ 0.7	101.5	7.2	8.9-10.5	9.9 $\pm$ 0.5	99.3	5.1
		20.0	15.7-21.4	20.1 $\pm$ 1.6	100.4	8.0				
		50.0	51.0-54.5	52.5 $\pm$ 1.1	105.0	2.2				
		100.0					97.1-106.0	101.2 $\pm$ 2.5	101.2	2.5
		200.0	162.6-177.0	172.7 $\pm$ 4.5	86.0	2.6				
	nalidixic acid	10.0 , LOQ	5.5-10.7	9.8 $\pm$ 1.5	97.9	15.6	8.5-10.1	9.7 $\pm$ 0.6	96.6	6.3
		20.0	17.4-21.6	0.52 $\pm$ 0.01	98.2	6.9				
		50.0	48.3-53.5	50.8 $\pm$ 2.9	101.5	5.7				
		100.0					97.2-104.0	101.6 $\pm$ 2.1	101.6	2.1
		200.0	163.2-216.0	190.5 $\pm$ 1.85	95.3	9.7				
	norfloxacin	10.0 , LOQ	5.2-10.6	8.8 $\pm$ 1.5	88.5	16.9	7.4-10.3	8.3 $\pm$ 0.8	83.0	9.1
		20.0	16.7-22.2	19.2 $\pm$ 2.0	96.0	10.3				
		50.0	49.9-54.5	51.5 $\pm$ 1.5	103.1	3.0				
		100.0					80.2-102.0	91.5 $\pm$ 8.0	91.5	8.7
		200.0	197.0-222.0	207.1 $\pm$ 7.2	103.5	3.5				

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
กลุ่ม quinolone	ofloxacin	10.0 , LOQ	9.5-10.8	10.4 $\pm$ 0.4	104.1	3.6	8.2-10.4	9.30 $\pm$ 0.8	92.70	9.0
		20.0	19.8-21.2	20.6 $\pm$ 0.5	102.8	2.4				
		50.0	50.0-53.5	51.6 $\pm$ 1.2	103.2	2.4				
		100.0					98.8-104.0	101.2 $\pm$ 1.7	101.2	1.7
		200.0	190.2-216.0	204.4 $\pm$ 7.1	102.2	3.5				
	oxolinic acid	10.0 , LOQ	8.2-10.6	10.2 $\pm$ 0.7	101.7	7.0	9.2-10.9	10.4 $\pm$ 0.4	100.4	4.2
		20.0	13.7-20.6	17.3 $\pm$ 2.3	86.7	13.5				
		50.0	48.1-54.0	51.1 $\pm$ 2.3	102.2	4.5				
		100.0					100.0-107.0	102.3 $\pm$ 2.0	102.3	2.0
		200.0	189.4-216.0	204.0 $\pm$ 9.2	102.0	4.5				
	sarafloxacin	10.0 , LOQ	4.9-10.1	8.4 $\pm$ 1.7	84.0	20.3	8.8-10.2	9.6 $\pm$ 0.4	95.9	4.4
		20.0	17.2-21.8	19.2 $\pm$ 1.8	95.8	9.5				
		50.0	48.3-53.5	51.0 $\pm$ 1.8	102.1	3.6				
		100.0					83.8-105.0	99.0 $\pm$ 5.9	99.0	6.0
		200.0	161.8-179.8	172.3 $\pm$ 5.6	86.1	3.2				
กลุ่ม sulfonamide	sulfadiazine	10.0 , LOQ	8.1-10.7	9.7 $\pm$ 0.9	96.6	9.6	9.4-105.0	10.0 $\pm$ 0.3	104.0	3.3
		20.0	20.0-21.6	20.6 $\pm$ 0.5	103.0	2.3				
		50.0	51.0-54.0	52.6 $\pm$ 1.2	105.2	2.2				
		100.0					100.0-103.0	10.6 $\pm$ 0.8	101.6	0.8
		200.0	199.2-218.0	206.1 $\pm$ 5.8	103.1	2.8				
	sulfadimidine	10.0 , LOQ	5.7-10.9	10.0 $\pm$ 1.6	100.3	15.7	8.1-10.2	9.3 $\pm$ 0.9	93.4	9.4
		20.0	17.6-21.45	20.0 $\pm$ 1.2	99.9	5.9				
		50.0	52.5-54	53.6 $\pm$ 0.6	107.2	1.1				
		100.0					98.4-104.0	102.3 $\pm$ 2.0	102.3	2.0
		200.0	148.2-168.8	158.4 $\pm$ 7.6	79.2	4.8				
	sulfadimethoxine	10.0 , LOQ	9.8-10.7	10.4 $\pm$ 7.3	103.5	2.5	5.1-9.3	7.8 $\pm$ 1.4	78.4	17.7
		20.0	19.5-21.4	20.6 $\pm$ 0.5	103.2	2.5				
		50.0	50.5-54.0	52.5 $\pm$ 1.1	105.0	2.0				
		100.0					70.3-105.0	94.9 $\pm$ 10.9	94.9	11.5
		200.0	176.0-214.0	99.1 $\pm$ 12.5	99.5	6.3				

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
	sulfadoxine	10.0 , LOQ	7.9-10.9	10.2 $\pm$ 0.9	102.1	8.5	5.0-10.3	7.9 $\pm$ 1.6	78.6	20.0
		20.0	20.2-21.2	20.8 $\pm$ 0.3	104.1	1.7				
		50.0	50.5-54.5	52.3 $\pm$ 1.3	104.5	2.5				
		100.0					83.0-106.0	97.4 $\pm$ 8.1	97.4	8.3
กลุ่ม sulfonamide	sulfamerazine	200.0	127.8-155.4	143.7 $\pm$ 8.3	71.9	5.8				
		10.0 , LOQ	6.2-10.9	101 $\pm$ 1.4	101.0	13.9	8.7-10.7	9.9 $\pm$ 0.6	98.8	5.9
		20.0	20.4-22.0	21.2 $\pm$ 0.6	105.8	2.6				
		50.0	51.0-54.0	52.9 $\pm$ 1.0	105.7	1.9				
		100.0					99.5-106.0	101.8 $\pm$ 1.7	101.8	1.7
	sulfamethizole	10.0 , LOQ	6.1-10.8	9.8 $\pm$ 1.4	98.4	14.0	9.3-10.4	10.0 $\pm$ 0.3	99.5	3.3
		20.0	19.4-21.8	20.7 $\pm$ 0.9	103.4	4.5				
		50.0	51.1-54.5	53.1 $\pm$ 1.0	106.1	1.8				
		100.0					95.3-103.0	100.1 $\pm$ 2.1	101.1	2.0
		200.0	149.4-186.6	174.0 $\pm$ 12.6	87.0	7.2				
	sulfamethoxazole	10.0 , LOQ	7.5-10.3	9.3 $\pm$ 1.0	93.1	10.8	9.8-10.4	10.1 $\pm$ 0.2	100.8	1.6
		20.0	18.8-21.2	20.3 $\pm$ 0.7	101.5	3.5				
		50.0	52.5-54.5	53.4 $\pm$ 1.0	106.8	1.9				
		100.0					80.9-102.0	91.0 $\pm$ 7.7	91.0.8	8.5
		200.0	155.6-167.6	161.3 $\pm$ 3.1	80.2	1.9				
	sulfamonomethoxine	10.0 , LOQ	8.9-10.9	10.1 $\pm$ 0.7	100.8	6.7	9.9-10.3	10.1 $\pm$ 0.1	101.1	1.4
		20.0	19.7-21.4	20.9 $\pm$ 0.6	104.3	2.9				
		50.0	51.5-54.0	52.7 $\pm$ 1.0	105.4	1.9				
		100.0					88.8-106.0	96.5 $\pm$ 5.5	96.5	5.8
		200.0	145.2-174.6	161.0 $\pm$ 9.4	80.5	5.9				
	sulfapyridine	10.0 , LOQ	5.9-10.9	10.0 $\pm$ 1.5	99.7	15.0	9.4-10.3	10.1 $\pm$ 0.3	100.7	2.8
		20.0	20.2-22.4	20.9 $\pm$ 0.7	104.7	3.3				
		50.0	52.5-54.5	53.5 $\pm$ 1.4	106.9	2.6				
		100.0					101.0-103.0	101.8 $\pm$ 0.9	101.8	0.9
		200.0	15.6-191.4	172.2 $\pm$ 11.3	86.1	6.5				

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
กลุ่ม sulfonamide	sulfadoxaline	10.0 , LOQ	8.3-10.9	10.3 $\pm$ 0.8	102.8	7.6	9.0-10.3	9.9 $\pm$ 0.5	98.5	4.6
		20.0	17.5-21.8	20.6 $\pm$ 1.3	102.8	6.5				
		50.0	52.0-55.0	53.2 $\pm$ 0.9	106.4	1.7				
		100.0					80.3-101.0	91.7 $\pm$ 8.2	91.7	8.2
		200.0	174.4-210.0	195.8 $\pm$ 12.4	97.9	6.3				
	sulfisoxazole	10.0 , LOQ	6.4-10.8	10.1 $\pm$ 1.3	101.3	13.1	7.7-10.0	8.8 $\pm$ 0.9	88.2	10.3
		20.0	18.7-21.8	20.8 $\pm$ 0.9	104.2	4.3				
		50.0	50.5-54.5	53.0 $\pm$ 1.3	106.0	2.4				
		100.0					97.7-107.0	101.0 $\pm$ 2.5	101.0	2.5
		200.0	142.4-197.2	167.8 $\pm$ 15.5	83.9	9.2				
	sulfathiazole	10.0 , LOQ	5.2-10.7	9.4 $\pm$ 1.7	94.3	17.5	9.3-10.0	9.6 $\pm$ 0.2	95.9	2.4
		20.0	17.3-21.8	19.8 $\pm$ 1.5	98.9	7.6				
		50.0	51.0-54.5	52.5 $\pm$ 1.4	105.0	2.7				
		100.0					93.6-104.0	98.1 $\pm$ 3.5	98.1	3.5
		200.0	160.2-195.4	183.1 $\pm$ 11.1	92.0	6.0				
	trimethoprim	10.0 , LOQ	6.9-10.7	9.2 $\pm$ 1.3	92.2	14.0	6.5-10.8	8.8 $\pm$ 1.6	88.1	17.7
		20.0	19.9-22.2	20.9 $\pm$ 0.8	104.6	3.7				
		50.0	50.5-55.0	53.5 $\pm$ 1.6	106.9	3.0				
		100.0					98.9-105.0	100.7 $\pm$ 2.0	100.7	2.0
		200.0	143.2-152.2	146.8 $\pm$ 2.6	73.4	1.8				

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	spiked Level ,ug/kg	เนื้อไก่				เนื้อปลา			
			min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD	min - max	mean $\pm$ SD	% rec	%RSD
กลุ่ม tetracycline	chlortetracycline	50.0 , LOQ	44.1-55.5	62.5 $\pm$ 3.9	105.0	7.4	43.3-50.4	47.0 $\pm$ 2.2	93.9	4.8
		75.0	75.0-80.3	77.7 $\pm$ 2.6	103.6	3.3				
		100.0	98.9-104.0	102.1 $\pm$ 1.4	102.1	1.4	98.4-102.0	98.6 $\pm$ 2.4	98.6	2.5
		200.0	188.2-214.0	201.7 $\pm$ 6.9	100.9	3.4				
	doxycycline	50.0 , LOQ	43.7-54.0	48.7 $\pm$ 3.1	97.3	6.3	45.5-50.6	47.9 $\pm$ 31.7	95.7	3.5
		75.0	67.0-79.5	74.6 $\pm$ 3.4	99.5	4.5				
		100.0	89.7-106.0	97.6 $\pm$ 6.0	97.6	6.1	96.6-103.0	100.2 $\pm$ 2.1	100.2	2.1
		200.0	184.8-208.0	196.2 $\pm$ 6.6	98.1	3.4				
	oxytetracycline	50.0 , LOQ	36.9-51.0	48.7 $\pm$ 4.7	97.5	9.7	38.0-47.0	42.5 $\pm$ 3.0	85.1	7.1
		75.0	69.5-78.8	74.5 $\pm$ 2.2	99.4	3.0				
		100.0	92.4-108.0	99.2 $\pm$ 5.2	99.2	5.2	86.5-101.0	97.6 $\pm$ 4.5	97.6	4.6
		200.0	198.0-210.0	204.6 $\pm$ 5.4	102.3	2.6				
	tetracycline	50.0 , LOQ	42.4-53.0	48.6 $\pm$ 3.8	92.2	7.8	39.3-51.8	45.6 $\pm$ 4.4	91.2	9.6
		75.0	74.8-78.8	76.5 $\pm$ 1.3	102.0	1.6				
		100.0	90.5-104.0	99.0 $\pm$ 3.6	99.0	3.6	92.8-101.0	98.3 $\pm$ 2.3	98.3	2.4
		200.0	200.0-210.0	205.2 $\pm$ 3.3	102.6	1.6				

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางสาวกรรณา ตีรสมิทธิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 3. นายสมภพ วัฒนมณี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 4. นางสาวสุนันทา เทพดนตรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 5. นางสาวกานดา เอกเจริญกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. อาหาร หมายถึง อาหารที่คนสามารถบริโภคได้ และให้หมายความรวมถึงเครื่องดื่ม ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ
2. Dilution หมายถึง การเจือจางของตัวอย่าง
3. น้ำกรอง หมายถึง น้ำที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าน้ำกลั่น หรือ deionized water
4. คำย่อที่ใช้ และคำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	Word/คำเต็ม
AnO ₂	anaerobic condition
O ₂	aerobic condition

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 2038	อาหาร	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium</i> spp. ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	I	101
DMSc F 2039	อาหาร	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Campylobacter</i> spp. ในห้วงโซ่อาหาร	I	109

DMSc F 2038: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Clostridium* spp. ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร Detection of *Clostridium* spp. in dietary supplements

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Clostridium* spp. ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

The United States Pharmacopeia. The National Formulary, USP 42/NF 37 Volume 5 (2022) Microbiological Procedures for Absence of Specified Microorganisms-Nutritional and Dietary Supplements. Test for Absence of *Clostridium* Species. Rockville, MD : The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- | | | |
|----------------------------|---|---------------------------------|
| 3.1 <i>C. carnis</i> | = | <i>Clostridium carnis</i> |
| 3.2 <i>C. durum</i> | = | <i>Clostridium durum</i> |
| 3.3 <i>C. histolyticum</i> | = | <i>Clostridium histolyticum</i> |
| 3.4 <i>C. tertium</i> | = | <i>Clostridium tertium</i> |

4. หลักการ (Principle)

Clostridium spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีบาง species ที่เป็น aerotolerant *Clostridium* ซึ่งสามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ด้วย เช่น *C. carnis*, *C. durum*, *C. histolyticum*, *C. tertium* เป็นต้น การตรวจหา *Clostridium* spp. โดยเตรียมตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 แล้วแบ่งตัวอย่างที่เจือจางแล้วออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งต้ม 80°C นาน 10 นาที ทำให้เย็นลงโดยเร็ว และอีกส่วนหนึ่งไม่ต้องต้ม นำทั้ง 2 ส่วนไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิดเหลว จากนั้นนำไปแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง และตรวจยืนยัน

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Columbia agar (CA)

5.1.2 Columbia agar with gentamicin (CAg)

5.1.3 Phosphate buffer pH 7.2

5.1.4 Reinforced medium for Clostridia (RC)

5.2 สารเคมี

5.2.1 Gentamicin

5.2.2 Gram stain reagents

5.2.3 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic incubator) $35 - 37^{\circ}C$

6.1.5 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $35 - 37^{\circ}C$

6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}C$ และ $80 \pm 1^{\circ}C$

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 หัวและเข็มเปียเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.5 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.6 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ของเหลวข้นหนืด และของเหลว เขย่าหรือคนผสม ตัวอย่างในแต่ละหน่วยภาชนะบรรจุให้เข้ากัน ตัก เท หรือปิเปต ตัวอย่างจากแต่ละหน่วย มารวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน (กรณีตัวอย่างของแข็ง อาจตัดเป็น ชิ้นเล็ก สำหรับเมล็ดหรือชิ้นอาหารที่แข็งมากและละลายยาก ให้ตำหรือบดให้เป็น ชิ้นเล็กหรือผงเสียก่อน โดยใช้อุปกรณ์และเทคนิคปราศจากเชื้อ) จากนั้นลุ่มตัวอย่าง (test portion) อย่างน้อย 10 กรัม ใส่ในโถปั่นหรือถุงตีผสมอาหาร เติมน้ำละลาย สำหรับเจือจาง phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หรือปริมาตร 9 เท่า แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นหรือเครื่องตีผสมอาหารนาน 1-2 นาที

7.2 การตรวจวิเคราะห์

7.2.1 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 7.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปต้ม 80 °C 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงโดยเร็ว

7.2.2 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 7.1 และ 7.2.1 อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน RC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลอดต่อหลอด บ่มที่ 35 - 37 °C 48 ชั่วโมง AnO_2

7.2.3 นำตัวอย่างข้อ 7.2.2 มาฉีดลงบน CAg และ CA บ่มที่ 35 - 37 °C 48 ชั่วโมง AnO_2

7.2.4 อ่านผล ถ้าพบการเจริญของเชื้อ เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน จีดลงบน CA โคโลนีละ 2 จานเพาะเชื้อ แยกบ่มที่ O_2 และ AnO_2 35 - 37 °C 48 ชั่วโมง

7.2.5 ยืนยันผลโดยนำโคโลนีไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase (โดยเขี่ยเชื้อ ลงบนกระจกสไลด์ แล้วหยด 3% H_2O_2 สังเกตการเกิดฟองก๊าซ) และ ย้อมสีแกรม

7.2.5.1 กรณีที่พบการเจริญของเชื้อเฉพาะในสภาวะ AnO_2 และได้ผล ยืนยัน catalase ลบ (ไม่เกิดฟองก๊าซ) แกรมบวก รูปท่อน (อาจพบ หรือไม่พบสปอร์) แสดงว่า พบ *Clostridium* spp.

7.2.5.2 กรณีที่พบการเจริญของเชื้อเฉพาะใน AnO_2 แต่ได้ผลยืนยันต่างจาก
ข้อ 7.2.5.1 แสดงว่าไม่พบ *Clostridium* spp.

7.2.5.3 กรณีที่พบการเจริญของเชื้อทั้งใน O_2 และ AnO_2 และได้ผลยืนยัน
catalase ลบ แกรมบวก รูปท่อน เช่นเดียวกับข้อ 7.2.5.1 อาจเป็น
aerotolerant *Clostridium* ควรยืนยัน *Clostridium* species เพิ่มเติม

หมายเหตุ: - กรณีที่ตัวอย่างมีส่วนผสมของจุลินทรีย์โพรไบโอติกกลุ่มแลคติกแอซิด
แบคทีเรีย ซึ่งมักเดิมในปริมาณสูงมากกว่า 10^6 ต่อกรัม อาจทำให้ตรวจพบ
เชื้อกลุ่มนี้ที่มีคุณลักษณะ catalase ลบ แกรมบวก รูปท่อน แต่ไม่สร้าง
สปอร์ ซึ่งทำให้สับสนกับเชื้อ *Clostridium* spp. ได้ ดังนั้นกรณีดังกล่าว
หากตรวจไม่พบสปอร์ ควรยืนยัน *Clostridium* species เพิ่มเติม)
- ในการยืนยัน *Clostridium* species อาจส่งเชื้อไปยังสถาบันวิจัย
วิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือสถาบันอื่น
ที่น่าเชื่อถือ หรือตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่น เช่น rapid biochemical
test ที่เป็นที่ยอมรับ เทคนิคทางอนุชีววิทยา เป็นต้น

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

Clostridium spp. / น้ำหนัก (เช่น กรัม) พบหรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Clostridium* spp. ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

10.3 กรณีที่ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าสงสัย ให้ทำการทดสอบซ้ำ (retest) โดยอาจเพิ่มปริมาณ
ตัวอย่าง (test portion) เช่น 10 กรัม เพิ่มเป็น 25 กรัม เป็นต้น

ภาคผนวก 1
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Columbia agar (CA)

Pancreatic digest of casein	10.0 กรัม
Meat peptic digest	5.0 กรัม
Heart pancreatic digest	3.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Cornstarch	1.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ฆ่าเชื้อ ที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

2. Columbia agar with gentamicin (CAg)

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 1. เติม gentamicin ประมาณ 20 มิลลิกรัม ต่อ base medium 1 ลิตร
ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อ

3. Phosphate buffer pH 7.2

3.1 stock solution

KH_2PO_4	34.0 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วย 1 N NaOH
(NaOH 40 กรัม ละลายน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตร
เป็น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที แล้วเก็บแช่เย็น

3.2 diluent

ดูด stock solution (ข้อ 3.1) 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดทดลองหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
pH 7.2 ± 0.2

4. Reinforced medium for Clostridia (RC)

Beef extract	10.0 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Soluble starch	1.0 กรัม
Glucose monohydrate	5.0 กรัม
Cysteine hydrochloride	0.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodium acetate	3.0 กรัม
Agar	0.5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

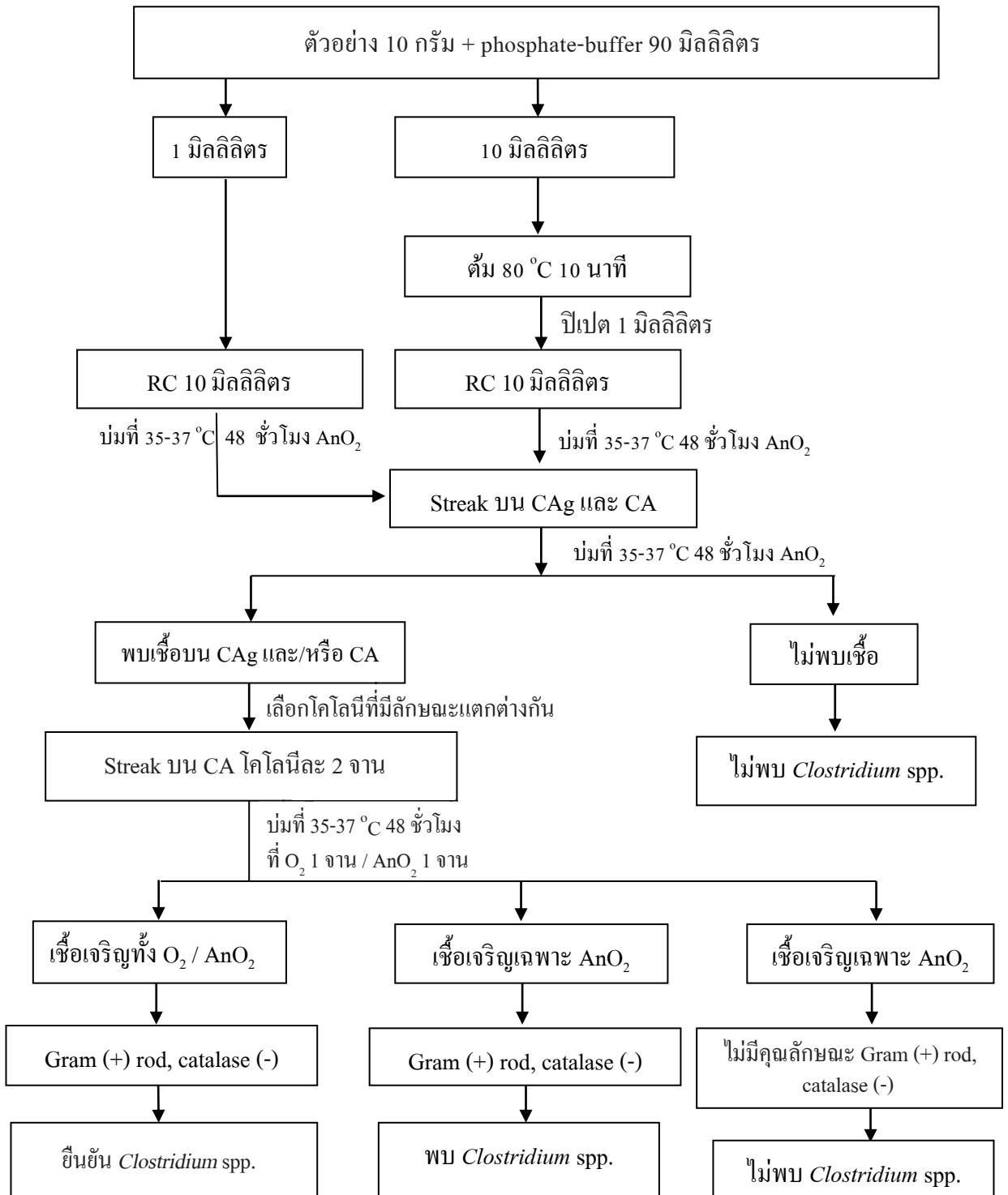
สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. 3% Hydrogen peroxide (H₂O₂)

นำ 35% hydrogen peroxide stock 8.6 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 91.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หรือใช้ stock ความเข้มข้นอื่น มาเจือจางให้เป็น 3% หรือใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Clostridium* spp. ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

DMSc F 2039: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Campylobacter* spp. ในห่วงโซ่อาหาร

Analytical method of *Campylobacter* spp. in food chain

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Campylobacter* spp. ในอาหารคน อาหารสัตว์ ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมบริเวณการผลิตอาหาร และตัวอย่างจากขั้นตอนการผลิตเบื้องต้น เช่น มูลสัตว์ สวอป เป็นต้น ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 10272-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.--Part 1: Detection method

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 <i>C. coli</i>	=	<i>Campylobacter coli</i>
3.2 <i>C. jejuni</i>	=	<i>Campylobacter jejuni</i>
3.3 <i>C. lari</i>	=	<i>Campylobacter lari</i>
3.4 <i>C. upsaliensis</i>	=	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
3.5 <i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
3.6 <i>E. faecalis</i>	=	<i>Enterococcus faecalis</i>
3.7 MALDI-TOF MS	=	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
3.8 PCR	=	Polymerase Chain Reaction

4. หลักการ (Principle)

Campylobacter spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนโค้ง หรือ บิดเป็นเกลียว ขนาดเล็ก สามารถเคลื่อนที่แบบหมุนเป็นเกลียว (corkscrew) และเจริญได้ดีในสถานะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ (microaerobic) *Campylobacter* ชนิดที่ทนความร้อน (thermotolerant) เจริญที่อุณหภูมิ 41.5°C และ มีโอกาสก่อโรคในคน ได้แก่ *C. jejuni* และ *C. coli* ซึ่งเป็น species ที่พบบ่อยที่สุด รวมทั้ง *C. lari*, *C. upsaliensis* และอื่นๆ

หลักการตรวจหา (detection) *Campylobacter* spp. แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่น เพื่อให้ *Campylobacter* spp. เติบโตเพิ่มจำนวนและยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น
- 4.2 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar)
- 4.3 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจสอบรูปร่างและการเคลื่อนที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และตรวจยืนยันทางชีวเคมี และ/หรือทางชีวโมเลกุล

การตรวจหา (detection) *Campylobacter* spp. จำแนกเป็น 3 วิธี ขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง และวัตถุประสงค์ในการตรวจ ดังนี้

วิธี A: การตรวจหา *Campylobacter* โดยเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใช้สำหรับตัวอย่างที่มี *Campylobacter* และจุลินทรีย์อื่นๆ ปริมาณน้อย และ/หรือมีเชื้อ *Campylobacter* ที่มีความเครียด เช่น ผลัดกันซ์ปรงสุก หรือแช่แข็ง

วิธี B: การตรวจหา *Campylobacter* โดยเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใช้สำหรับตัวอย่างที่มี *Campylobacter* ปริมาณน้อย แต่มีจุลินทรีย์อื่นๆ ปริมาณมาก เช่น เนื้อสัตว์ดิบ (รวมทั้งเนื้อสัตว์ปีก) หรือน้ำนมดิบ

วิธี C: การตรวจหา *Campylobacter* โดยไม่ผ่านขั้นตอนเพิ่มปริมาณเชื้อ แต่ใช้วิธี direct plating ใช้สำหรับตัวอย่างที่มี *Campylobacter* ปริมาณมาก เช่น อุจจาระ กากอาหารในไส้ตัน (caecal contents) ของสัตว์ปีก หรือ เนื้อสัตว์ปีกดิบ

- หมายเหตุ 1. ในการเลือกใช้วิธี หากมีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะทำให้ทราบระดับการปนเปื้อนเชื้อ ให้ใช้วิธี C ควบคู่ไปกับวิธี A และ/หรือวิธี B
2. วิธี B มีประโยชน์ในการตรวจผลิตภัณฑ์ต่างๆ (รวมทั้งผลิตภัณฑ์ปรุงสุกหรือแช่แข็ง) ที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม 3rd generation β -lactams เช่น cefoperazone (วิธี A ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Bolton broth และ mCCD agar ที่เติม cefoperazone ส่วนวิธี B ใช้ enrichment broth ที่เติมสารยับยั้งชนิดอื่นที่ไม่ใช่ cefoperazone จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มนี้)

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Bolton broth

5.1.2 Columbia blood agar หรือ Non-selective blood agar ชนิดอื่น

5.1.3 mCCD agar (Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด เช่น Preston agar, Butzler agar เป็นต้น

5.1.4 Preston broth

5.2 สารเคมี

5.2.1 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

5.2.2 Indoxyl acetate disc

5.2.3 3.5% Ninhydrin solution

5.2.4 Oxidase reagent

5.2.5 Sodium hippurate solution

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave)
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ควรมี phase contrast
- 6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.6 ตู้เย็น (refrigerator) $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.7 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 6.1.9 อุปกรณ์ที่ทำให้เกิดสภาวะ microaerobic (มีส่วนประกอบของแก๊สออกซิเจน $5 \pm 2\%$ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ $10 \pm 3\%$ และอาจมีแก๊สไฮโดรเจน $\leq 10\%$ ที่เหลือเป็นแก๊สไนโตรเจน)

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว (screw-cap bottle)
- 6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.3 หัวหย็ยเชื้อ (loop) ขนาด 1 และ 10 ไมโครลิตร และเข็มหย็ยเชื้อ (needle)
- 6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.5 ปิเปต (pipette)
- 6.2.6 แท่งแกว่ง (spreader)
- 6.2.7 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เชื้อ *Campylobacter* ไม่ทนต่อการแช่แข็ง แต่อยู่รอดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้น ควรเก็บรักษาตัวอย่างอาหารที่รอตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ โดยป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้ง และนำมาตรวจวิเคราะห์โดยเร็วที่สุด

วิธี A และ B

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืด เขย่าหรือผสมตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง (test portion) ตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 10 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือบีบตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่าง (test portion) ตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 10 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์

วิธี C

- 7.1.3 กรณีที่ตัวอย่างเป็นกากอาหารในไส้ตัน (caecal contents) หรืออุจจาระ ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์
- 7.1.4 กรณีตัวอย่างอื่นๆ เช่น เนื้อไก่ดิบ เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 7.1.1 จากนั้นเติมของเหลว เช่น peptone salt solution หรือ Preston broth ในปริมาณที่เหมาะสม เช่น อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร (1 in 2 (volume fraction)) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์

7.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment)

ใช้กับวิธี A และ B ดังนี้

วิธี A

7.2.1 เติม Bolton broth 90 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ข้อ 7.1.1 หรือ 7.1.2 เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า ผสมให้เข้ากันดี บ่มที่ 37°C 4-6 ชั่วโมง และบ่มต่อที่ 41.5°C 44 ± 4 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic

วิธี B

7.2.2 เติม Preston broth 90 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ข้อ 7.1.1 หรือ 7.1.2 เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า ผสมให้เข้ากันดี บ่มที่ 41.5°C 24 ± 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic

หมายเหตุ

- ต้องอุ่น enrichment broth ให้ได้อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้งาน
- วิธีการนี้ได้รับการทดสอบความถูกต้องแล้วสำหรับปริมาณตัวอย่าง 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร (ยกเว้นตัวอย่างไส้ตัน (caecum))
- อาจใช้ปริมาณตัวอย่าง (test portion) ลดลงได้ โดยไม่ต้องทดสอบความถูกต้อง หรือทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ แต่ยังคงใช้อัตราส่วนของตัวอย่าง : อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 1 : 9
- อาจใช้ปริมาณตัวอย่าง (test portion) มากกว่า 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตรได้ แต่ให้ทำการทดสอบความถูกต้อง หรือทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ก่อน เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีผลกระทบต่อการศึกษา *Campylobacter*

7.3 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation)

7.3.1 วิธี A : ใช้ห้วงเย็บเชื้อขนาด 10 ไมโครลิตร นำเชื้อจากข้อ 7.2.1 มาฉีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCD agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ๆ ละ 1 จาน

หมายเหตุ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ที่มีสารยับยั้งเชื้ออื่นที่แตกต่างไปจาก mCCD agar จะช่วยเพิ่มโอกาสการตรวจพบ *Campylobacter* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรณีที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้ออื่นที่ต่อต้านยาต้านจุลชีพในกลุ่ม 3rd generation β -lactams เช่น cefoperazone

7.3.2 วิธี B : ใช้ห้วงเย็บเชื้อขนาด 10 ไมโครลิตร นำเชื้อจากข้อ 7.2.2 มาฉีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCD agar

7.3.3 วิธี C :

7.3.3.1 ใช้ห้วงเย็บเชื้อหรือไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างที่ผสมเข้ากันดี จากข้อ 7.1.3 มาป้ายลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCD agar ครึ่งหนึ่งของจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้ห้วงเย็บเชื้ออีกอันหนึ่ง ฉีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลืออีกครึ่งจาน

7.3.3.2 ใช้ห้วงเย็บเชื้อ นำตัวอย่างที่ผสมเข้ากันดี จากข้อ 7.1.4 จำนวน 1 loop ฉีดลงบน mCCD agar หรือหยดปริมาตรที่เหมาะสมลงบนผิวหน้า mCCD agar แล้วเกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้ว

7.3.4 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCD agar ในข้อ 7.3.1, 7.3.2 หรือ 7.3.3 บ่มที่ 41.5°C 44 ± 4 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ microaerobic (อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งอื่น บ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต)

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *Campylobacter* spp. บน mCCD agar จะมีสีเทา (มักพบ metallic sheen) แบน ชื่น และแผ่ (อาจแผ่น้อย กรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีผิวหน้าแห้ง) และอาจพบโคโลนีลักษณะอื่นๆ ได้

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *Campylobacter* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
จำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.4 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmation)

การสัมผัสอากาศ จะทำให้ *Campylobacter* สูญเสียความสามารถในการเพาะเลี้ยง
เชื้ออย่างรวดเร็ว จึงควรนำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะมาตรวจยืนยันทันที พร้อมทั้ง
ใช้เชื้อควบคุมบวกและเชื้อควบคุมลบทดสอบควบคู่ไปด้วย เช่น ใช้ *C. jejuni*
WDCM 00005 เป็นเชื้อควบคุมบวก และ *E. coli* WDCM 00013 เป็นเชื้อควบคุมลบ
การตรวจยืนยัน สามารถใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมี แต่อาจตรวจด้วยวิธีทดสอบ
ทางเลือกอื่น เช่น PCR น้ำเหลืองวิทยา MALDI-TOF MS เป็นต้น

7.4.1 การเลือกโคโลนีเพื่อนำมาตรวจยืนยัน

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือที่สงสัย อย่างน้อย 1 โคโลนี มาแยกเชื้อ
ให้บริสุทธิ์ โดยฉีกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะที่มีส่วนผสมของเลือด
เช่น columbia blood agar บ่มที่ 41.5°C 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ
microaerobic แล้วนำไปตรวจยืนยัน ถ้าผลเป็นลบ ให้เลือกโคโลนีที่สงสัย
มาตรวจยืนยันเพิ่มอีกไม่เกิน 4 โคโลนี (ถ้าจำเป็น ให้เก็บงานเพาะเชื้อข้อ
7.3.4 ไว้ที่ 5 ± 3°C ภายใต้สภาวะ microaerobic เพื่อใช้ในการตรวจยืนยัน
และ/หรือ จำแนกเชื้อต่อไป) ในการตรวจยืนยัน ให้ปฏิบัติตามรายการ
ทดสอบดังต่อไปนี้

7.4.2 การตรวจสอบรูปร่าง และการเคลื่อนที่

นำเชื้อสดจากข้อ 7.4.1 มาตรวจสอบรูปร่าง และการเคลื่อนที่ภายใต้
กล้องจุลทรรศน์

เชื้อ *Campylobacter* มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง การเคลื่อนที่แบบหมุนเป็น
เกลียว (corkscrew) เก็บรักษาเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าว เพื่อนำมาทดสอบ
ในรายการต่อไป

7.4.3 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้สภาวะ aerobic (สภาวะที่มีออกซิเจน)

ใช้ห้วงเย็บเชื้อ ถ่ายเชื้อจากข้อ 7.4.1 มาฉีดยบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะที่มีเลือดเป็นส่วนประกอบ (non-selective blood agar) เช่น columbia blood agar นำไปบ่มที่ 25°C 44 ± 4 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ aerobic

ผลบวก : เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ : เชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Campylobacter spp. ให้ผลลบ

7.4.4 การทดสอบ oxidase activity

ฉีดเชื้อจากข้อ 7.4.1 ลงบนกระดาษกรองที่หยดด้วย oxidase reagent โดยใช้ห้วงเย็บเชื้อที่ไม่ได้ทำด้วยนิเกิล-โครเมียม เพราะจะทำให้เกิดผลบวกปลอม (อาจใช้ห้วงเย็บเชื้อที่ทำด้วย platinum iridium หรือพลาสติก หรือแท่งแก้ว) สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

ผลบวก : เกิดสีม่วงอ่อน ม่วงอมน้ำเงิน หรือน้ำเงินเข้ม ภายใน 10 วินาที

ผลลบ : ไม่เกิดสี หรืออาจเกิดสีหลังจาก 10 วินาที

Campylobacter spp. ให้ผลบวก

หมายเหตุ อาจใช้ชุดทดสอบ oxidase สำเร็จรูป โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.4.5 การแปลผล

พิจารณาจากคุณลักษณะตามตารางที่ 1 และจะสรุปได้ว่า พบ *Campylobacter* เมื่อพบเชื้อที่มีคุณลักษณะดังกล่าว อย่างน้อย 1 โคโลนี

ตารางที่ 1 คุณลักษณะของ *Campylobacter*

รูปร่าง	รูปท่อนโค้ง ขนาดเล็ก (Small curved bacilli) ^a
การเคลื่อนที่	หมุนเป็นเกลียวอย่างรวดเร็ว (Characteristic corkscrew darting) ^a
การเจริญที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้สภาวะ aerobic	-
oxidase activity	+
^a เชื้ออายุมาก อาจเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะอย่างรวดเร็ว คือ เปลี่ยนเป็นรูปร่างกลม และมีการเคลื่อนที่ลดลง	

7.5 ขั้นตอนการจำแนกเชื้อ (Identification) (ทางเลือก)

เชื้อ *Campylobacter* spp. ที่เจริญได้ที่ 41.5°C ส่วนใหญ่พบเชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* แต่อาจพบ species อื่น ๆ ได้ การจำแนก *Campylobacter* species พิจารณาจากคุณลักษณะตามตารางที่ 2

7.5.1 การทดสอบ catalase activity

เจียเชื้อจากข้อ 7.4.1 มาแตะลงบนแผ่นกระจก และหยด 3% hydrogen peroxide สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น (ยืนยันผลโดยใช้เชื้อควบคุม เช่น ใช้ *C. jejuni* WDCM 00005 เป็นเชื้อควบคุมบวก และ *E. faecalis* WDCM 00087 เป็นเชื้อควบคุมลบ)

ผลบวก : เกิดฟองก๊าซภายใน 30 วินาที

ผลลบ : ไม่เกิดฟองก๊าซ

7.5.2 การทดสอบ hippurate hydrolysis

ใช้ห้วงขนาด 10 ไมโครลิตร เชื้อเชื้อปริมาณมากจากข้อ 7.4.1 ใส่ลงในหลอดที่มีสารละลาย sodium hippurate 0.4 มิลลิลิตร (ระวังอย่าเปียกชื้นติดมา) เขย่าผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C 2 ชั่วโมง $\pm$ 5 นาที หรือบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่ 37°C 4 ชั่วโมง $\pm$ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ninhydrin 0.2 มิลลิลิตร ลงยังไปส่วนบนของสารละลาย (ห้ามเขย่า) บ่มที่ 37°C 5-10 นาที อ่านผล (ยืนยันผลโดยใช้เชื้อควบคุม เช่น ใช้ *C. jejuni* WDCM 00005 เป็นเชื้อควบคุมบวก และ *C. coli* WDCM 00004 เป็นเชื้อควบคุมลบ)

ผลบวก : สารละลายมีสีม่วงเข้ม

ผลลบ : สารละลายมีสีม่วงอ่อน หรือไม่เปลี่ยนสี

7.5.3 การทดสอบ indoxyl acetate hydrolysis

เชื้อเชื้อจากข้อ 7.4.1 ด้วยห้วงขนาด 1 ไมโครลิตร (เต็ม loop) มาแตะลงบน indoxyl acetate disc จากนั้นหยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของแผ่น disc (ยืนยันผลโดยใช้เชื้อควบคุม เช่น ใช้ *C. jejuni* WDCM 00005 เป็นเชื้อควบคุมบวก และ *C. lari* WDCM 00204 เป็นเชื้อควบคุมลบ)

ผลบวก : แผ่น disc เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 5 - 10 นาที

ผลลบ : แผ่น disc ไม่เปลี่ยนสี

หมายเหตุ อาจใช้ indoxyl acetate disc สำเร็จรูป โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของ *Campylobacter* species

คุณลักษณะ	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalase activity	+	+	+	- or weak
Hippurate hydrolysis	+ ^a	-	-	-
Indoxyl acetate hydrolysis	+	+	-	+
^a <i>C. jejuni</i> บางสายพันธุ์อาจให้ผลลบ				

8. การคำนวณผล (Calculation of results)

-

9. รายงานผลการทดสอบ (Test report)

การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

Campylobacter spp. / น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาควง 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาควง 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Campylobacter* spp. ใน
ห่วงโซ่อาหาร

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Bolton broth

1.1 Basic medium

Enzymatic digest of animal tissues	10.0	กรัม
Lactalbumin hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium pyruvate	0.5	กรัม
Sodium metabisulfite	0.5	กรัม
Sodium carbonate anhydrous	0.6	กรัม
α -Ketoglutaric acid, monopotassium salt	1.0	กรัม
Haemin (dissolved in 0.1% sodium hydroxide)	0.01	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	945	มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 945 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที		
pH 7.4 $\pm$ 0.2		

1.2 Sterile lysed horse blood

ใช้ horse blood saponin-lysed หรือ lysed by freezing then thawing

1.3 Antibiotic solution

Cefoperazone sodium salt	0.02	กรัม
Vancomycin hydrochloride	0.02	กรัม
Trimethoprim lactate salt	0.02	กรัม
Amphotericin B	0.01	กรัม
Ethanol/น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50/50 (volume fraction)	5	มิลลิลิตร
ละลายส่วนประกอบใน Ethanol/น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ อัตราส่วน 50/50		

การใช้งาน

Basic medium	945	มิลลิลิตร
Sterile lysed horse blood	50	มิลลิลิตร
Antibiotic solution	5	มิลลิลิตร

เติม sterile lysed horse blood (ข้อ 1.2) ลงใน basic medium (ข้อ 1.1) ที่มีอุณหภูมิ
ต่ำกว่า 47°C จากนั้นเติม antibiotic solution (ข้อ 1.3) ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด 5°C
ได้นาน 7 วัน

2. Columbia blood agar

2.1 Basic medium

Enzymatic digest of animal tissues	23.0	กรัม
Starch soluble	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	8.0-18.0*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

* ขึ้นอยู่กับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

2.2 Sterile sheep หรือ horse blood

การใช้งาน

Basic medium	1,000	มิลลิลิตร
Sterile blood	50	มิลลิลิตร

เติม sterile sheep หรือ horse blood (ข้อ 2.2) ลงไปใน basic medium (ข้อ 2.1)
ที่มีอุณหภูมิประมาณ 44-47 °C ผสมให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อ (ประมาณ
18-20 มิลลิลิตร) และปล่อยให้วุ้นแข็ง เก็บในที่มืด 5°C ได้นาน 1 เดือน

3. Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCD agar)

3.1 Basic medium

Meat extract	10.0	กรัม
Enzymatic digest of animal tissues	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Activated charcoal	14.0	กรัม
Enzymatic digest of casein	3.0	กรัม
Sodium deoxycholate	1.0	กรัม
Iron (II) sulfate hydrate	0.25	กรัม
Sodium pyruvate	0.25	กรัม
Agar	8.0-18.0*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง โดยนำไปต้มให้เดือด ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที
pH 7.4 ± 0.2

* ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของวุ้น (gel strength of the agar)

3.2 Antibiotic solution

Cefoperazone sodium salt	0.032	กรัม
Amphotericin B	0.01	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	5	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน
แผ่นกรองเมมเบรน

การใช้งาน

Basic medium	1,000	มิลลิลิตร
Antibiotic solution	5	มิลลิลิตร

เติม antibiotic solution (ข้อ 3.2) ลงใน basic medium (ข้อ 3.1) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 44-47°C
ผสมให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อ (ประมาณ 18-20 มิลลิลิตร) และปล่อยให้วุ้นแข็ง เก็บใน
ที่มืด 5°C ได้นาน 1 เดือน

4. Preston broth

4.1 Basic medium

Enzymatic digest of animal tissues	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	945	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 945 มิลลิลิตร มาเชื้อที่ 121°C 15 นาที

pH 7.4 ± 0.2

4.2 Sterile lysed horse blood

ใช้ horse blood saponin-lysed หรือ lysed by freezing then thawing

4.3 Antibiotic solution

Polymyxin B sulfate	5,000	IU
Rifampicin	0.01	กรัม
Trimethoprim lactate salt	0.01	กรัม
Amphotericin B	0.01	กรัม
95% Ethanol (volume fraction)	5	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดใน ethanol

การใช้งาน

Basic medium	945	มิลลิลิตร
Sterile lysed horse blood	50	มิลลิลิตร
Antibiotic solution	5	มิลลิลิตร

เติม sterile lysed horse blood (ข้อ 4.2) ลงใน basic medium (ข้อ 4.1) ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 4°C จากนั้นเติม antibiotic solution (ข้อ 4.3) ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด 5°C ได้นาน 7 วัน

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

นำ 35% hydrogen peroxide stock 8.6 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 91.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
หรือใช้ stock ความเข้มข้นอื่น มาเจือจางให้เป็น 3% หรือใช้ชนิดสำเร็จรูป

2. Indoxyl acetate discs

Indoxyl acetate	0.1	กรัม
Acetone	1	มิลลิลิตร

ละลาย indoxyl acetate ใน acetone จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 25-50 ไมโครลิตร
ลงใน blank paper discs (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 - 1.2 เซนติเมตร) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่
อุณหภูมิห้อง บรรจุในหลอดหรือขวดสีชาที่มี silica gel เก็บที่อุณหภูมิ 5°C

3. 3.5% Ninhydrin solution

Ninhydrin	1.75	กรัม
Acetone	25	มิลลิลิตร
2-Butanol	25	มิลลิลิตร

ละลาย ninhydrin ในสารผสมของ acetone/butanol แล้วเก็บในที่มืด โดยต้องไม่เก็บที่
อุณหภูมิห้อง นานเกิน 4 ชั่วโมง หรือ เก็บที่อุณหภูมิ 5 °C ไม่เกิน 7 วัน

4. Oxidase reagent

N,N,N',N' -Tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นก่อนใช้งาน

5. Sodium hippurate solution

Sodium hippurate hydrate	10.0	กรัม
--------------------------	------	------

Phosphate-buffered saline (PBS) ประกอบด้วย

Sodium chloride	8.5	กรัม
-----------------	-----	------

Disodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8.98	กรัม
---	------	------

Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	2.71	กรัม
--	------	------

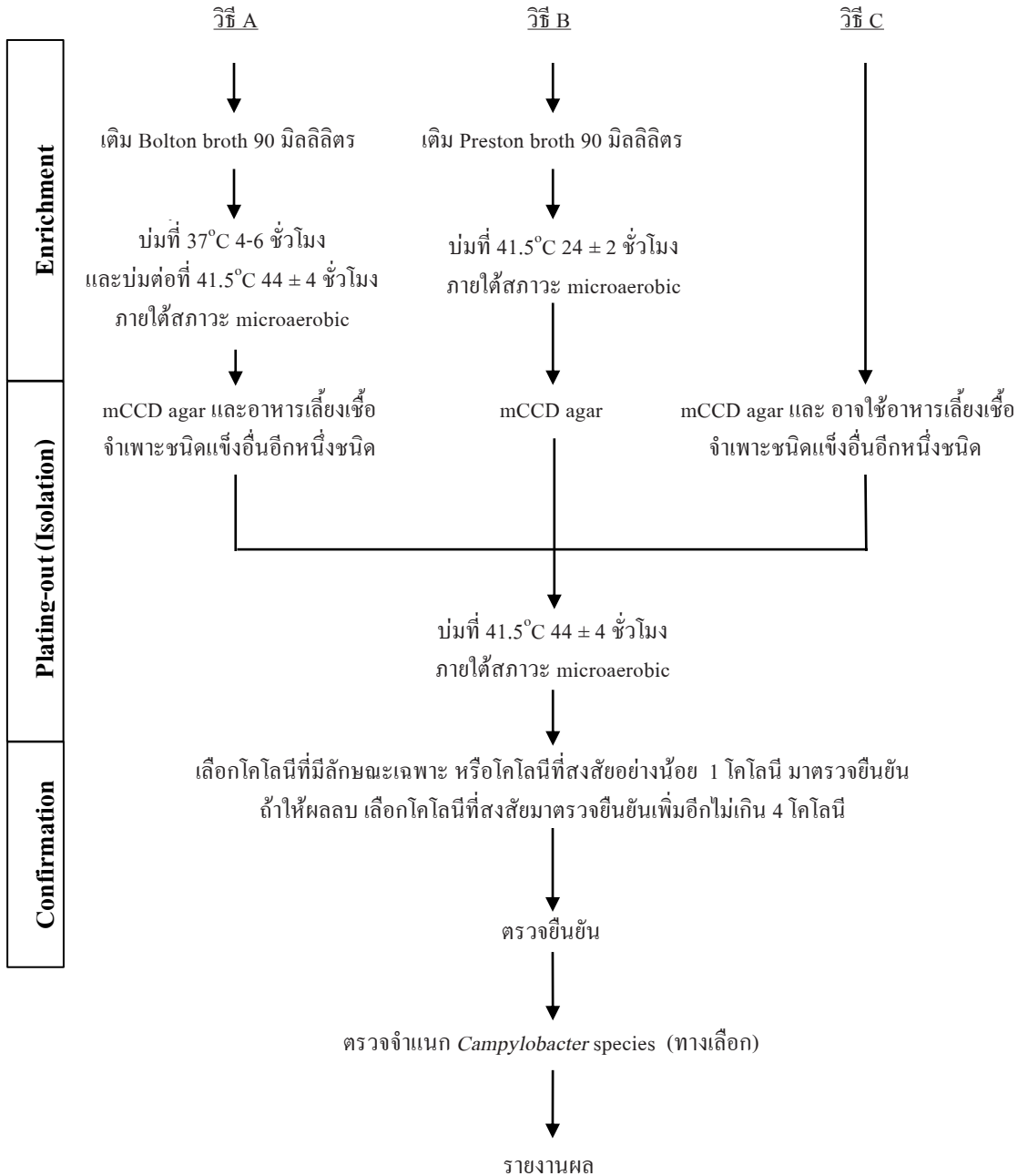
น้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายรวม	1,000	มิลลิลิตร
--------------------------------------	-------	-----------

ละลาย sodium hippurate hydrate ในสารละลาย PBS ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน แบ่งใส่หลอดๆ ละ 0.4 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ตัวอย่างอาหาร 10 กรัม หรือมิลลิลิตร
(เช่น ผลิตภัณฑ์ปรุงสุก หรือ แห้งแข็ง)

ตัวอย่างอาหาร 10 กรัม หรือมิลลิลิตร
(เช่น เนื้อสัตว์ดิบ นมดิบ)

ตัวอย่างอื่นๆ
(เช่น swab อุจจาระ เนื้อสัตว์ปีกดิบ)



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Campylobacter* spp. ในห่วงโซ่อาหาร

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางสาวจันทอง เพ็ชรนอก | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นายก่อเกียรติ ศาสตรินทร์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 3. นางกนกวรรณ ตุ่นสกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |

วิทยาลัยการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 3006	อาหาร	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในชา	I	131
DMSc F 3007	อาหาร	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทดอง	I	137
DMSc F 3008	อาหาร	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้งสาลี	I	143

DMSc F 3006: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในชา

Determination of light filth in tea

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (Light Filth) ในชาใบ และชาผง

2. เอกสารอ้างอิง (references)

2.1 AOAC Official Method AOAC 981.18 (16.2.06) : Light Filth in Tea

2.2 AOAC Official Method 945.75 : Extraneous Materials (Foreign Matter)
in Products

3. หลักการ (Principle)

แยกสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์
ออกจากตัวอย่างชา โดยต้มในน้ำร้อนให้เดือดแล้วนำไป wet sieve และเติม paraffin oil
เพื่อดักจับสิ่งแปลกปลอมที่ลอยขึ้นมารวมในชั้นน้ำมัน ซึ่งสามารถแยกออกใน
Wildman trap flask เก็บชั้นน้ำมันมากรองแล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 g

4.1.2 Widefield zoom stereoscopic microscope

4.1.3 Compound microscope

4.1.4 เครื่องทำน้ำร้อนพร้อมสายฉีด

4.1.5 Stirrer - hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 ชุดเครื่องกรอง ประกอบด้วย filtering flask ขนาด 2,000 ml

Hirsch funnel ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm และเครื่องปั๊มสุญญากาศ

- 4.2.2 Wildman trap flask ประกอบด้วย erlenmeyer flask ขนาด 2,000 ml และภายใน flask มี metal rod ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm (3/16 inches) มีความยาวมากกว่าความสูงของ flask ประมาณ 10 cm ส่วนปลายของ metal rod มีแผ่นยาง (rubber pad) รูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm ติดอยู่
- 4.2.3 Glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 cm
- 4.2.4 Magnetic stirring bar ขนาดยาวโดยประมาณ 47 mm เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9 mm
- 4.2.5 Beaker ขนาด 1,000, 500 และ 50 ml
- 4.2.6 Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm
- 4.2.7 Forceps
- 4.2.8 Glass rod
- 4.2.9 Wash bottle
- 4.2.10 Sieve no. 230 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 inches ควรทำจาก stainless steel
- 4.2.11 เข็มเย็บ ซึ่งปลายที่ใช้เย็บเป็นลวดเส้นเล็กที่มีขนาดเหมาะสมกับการใช้งาน
- 4.2.12 กระดาษกรอง Whatman No. 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm
- 4.2.13 นาฬิกาจับเวลา
- 4.2.14 แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์

5. สารเคมี (Reagents)

- 5.1 40% Isopropanol เตรียมโดยใช้ isopropanol ความเข้มข้น 99.9% ปริมาตร 40 ml ผสมกับ น้ำกรอง 60 ml
- 5.2 Flotation oil เตรียมโดยใช้ paraffin oil 85 ml ผสมกับ heptane 15 ml
- 5.3 Na_4EDTA (tetrasodium EDTA)
- 5.4 Tween 80 (polysorbate 80)
- 5.5 Sequestering agent เตรียมโดย

- Tween 80 – 40% isopropanol เตรียมโดยใช้ Tween 80 (polysorbate 80) 40 ml ผสมกับ 40% isopropanol ปริมาตร 210 ml แล้วนำไปกรอง
- Na_4EDTA – 40% isopropanol เตรียมโดยใช้ Na_4EDTA 5 g ละลายในน้ำกรอง 150 ml จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปกรอง
- นำสารละลาย Tween 80 – 40% isopropanol 50 ml ผสมกับสารละลาย Na_4EDTA – 40% isopropanol 50 ml จากนั้นเติม 40% isopropanol ปริมาตร 200 ml ผสมให้เข้ากัน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

-

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ชั่งตัวอย่าง 10 g ลงใน beaker ขนาด 1,000 ml
- 7.2 เติมน้ำร้อน 300 ml ต้มให้เดือดเบาๆ และกวนโดยใช้ magnetic stirring นาน 6 min
- 7.3 ถ่ายส่วนผสมจาก beaker ลงใน sieve no. 230 ใช้ น้ำร้อนฉีดลงใน sieve ล้างจนน้ำใส
- 7.4 ถ่ายสิ่งที่ตกค้างจาก sieve ลงใน wildman trap flask ขนาด 2,000 ml โดยใช้ 40 % isopropanol ฉีดล้าง และปรับปริมาตรด้วย 40 % isopropanol ให้ได้ 900 ml
- 7.5 ปรับระดับแท่งกวน (stirring rod) ใน wildman trap flask ให้แผ่นยางส่วนบนอยู่ต่ำกว่าระดับผิวของส่วนผสมเล็กน้อยและเติม flotation oil 50 ml ให้ไหลผ่านไป ตามแท่งกวน จากนั้นยกแท่งกวนขึ้นให้แผ่นยางอยู่เหนือส่วนผสม
- 7.6 กวนด้วย magnetic stirring นาน 6 min และตั้งทิ้งไว้ 2 -3 min
- 7.7 เติม sequestering agent 300 ml ให้ไหลผ่านไปตามแท่งกวน กวนซ้ำๆ ที่ผิวของ ส่วนผสม นาน 1 min
- 7.8 เติม 40 % isopropanol ซ้ำๆ ผ่านแท่งกวนจนเกือบเต็มคอ flask ปรับระดับและ ล็อกแท่งกวนให้แผ่นยางอยู่เหนือชั้นของส่วนผสม ตั้งทิ้งไว้ 5 min หมุนแท่งกวน และตั้งทิ้งไว้อีก 25 min

- 7.9 trap off เทของเหลวที่อยู่เหนือแผ่นยางลงใน beaker ล้างคอ flask จนสะอาดด้วย 40 % isopropanol
- 7.10 เติม flotation oil 30 ml ลงใน flask ให้ไหลผ่านไปตามแท่งกวน จากนั้นกวนด้วย stirring rod ซ้ำๆ 1 min ให้ flotation oil แยกตัว
- 7.11 เติม 40 % isopropanol จนเกือบเต็มคอ flask ตั้งทิ้งไว้ 30 min
- 7.12 เทของเหลวที่อยู่เหนือแผ่นยาง ลงใน beaker ใหม่อีก ล้างคอ flask ให้สะอาดด้วย 40% isopropanol
- 7.13 นำชั้นน้ำมันไปกรองบนกระดาษกรองโดยใช้ชุดเครื่องกรอง
- 7.14 นำกระดาษกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 30 เท่า หากสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กไม่สามารถจำแนกชนิดได้ให้นำสิ่งแปลกปลอมนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ และ mount ด้วย glycerine jelly ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจภายใต้ compound microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

การรายงานสิ่งแปลกปลอมที่พบในแต่ละ subsample จะแบ่งชนิดสิ่งแปลกปลอมเป็นกลุ่มๆ เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง ขนหนู และขนนก ระบุจำนวนและขนาดที่พบในกรณี que สิ่งแปลกปลอมที่พบมีจำนวนมากจนไม่สามารถนับได้ทั้งหมด ให้รายงานจำนวนโดยประมาณหรือขั้นต่ำที่สามารถตรวจสอบได้และให้ใส่เครื่องหมายมากกว่า

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ตรวจสอบน้ำประปาและน้ำกรองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทุกครั้งที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเก็บน้ำประปาและน้ำกรองจำนวนอย่างละ 1,000 ml นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

- 9.2 ตรวจสอบอากาศภายในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้กระดาษกรองวางลงใน petri dish หยดน้ำยาผสมกลีเซอรอล กับ 95% ethyl alcohol ในอัตรา 3:2 ตั้งทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 24 h นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า
- 9.3 ตรวจสอบ sieve โดยล้างทำความสะอาดทุกครั้งก่อนใช้งาน จากนั้นทำ blank control โดยเก็บน้ำที่ได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า
- 9.4 ทำ Assuring the quality of test results 1 ครั้งต่อปี โดยวิเคราะห์ 6 subsamples ซึ่ง spiked material ใช้ปีกแมลง (*Sitophilus* spp.) ขนาด 1 x 1 mm อย่างน้อย 10 ชิ้น และขนหนู (fur hair) ขนาดยาว 2 mm อย่างน้อย 10 เส้น ต่อการตรวจวิเคราะห์ 1 subsample โดยผลการตรวจต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ % recovery ขนหนูต้องพบไม่น้อยกว่า 80% และชิ้นส่วนแมลงต้องพบไม่น้อยกว่า 85% ส่วน % RSD (relative standard deviation) ต้องมีค่าน้อยกว่า 15%

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

ผลการวิเคราะห์ Method Validation ของวิธีวิเคราะห์ Light Filth in Tea มีผู้ร่วมทดสอบ 3 คน วิเคราะห์คนละ 12 subsamples โดยใช้ spiked materials คือ ชิ้นส่วนแมลง (*Sitophilus* spp.) ขนาด 1 x 1 mm และขนหนู (fur hair) ยาว 2 mm ชนิดละ 16, 20 และ 24 ชิ้น/เส้น โดยผลการทดสอบพบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือ พบขนหนูและชิ้นส่วนแมลงพบมากกว่า 80%

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผู้ทดสอบแต่ละคน

ผู้ทดสอบ	Mean/rat hairs			Mean/elytral squares		
	16	20	24	16	20	24
คนที่ 1	15.50	19.25	22.50	15.75	19.50	23.25
คนที่ 2	15.75	19.50	24.00	16.00	19.50	23.75
คนที่ 3	15.00	18.75	22.00	16.00	20.00	24.00

DMSc F 3007: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอม ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทดอง

Determination of filth in pickles

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์สิ่งแปลกปลอม (Filth) ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทดอง ได้แก่ ผักและผลไม้ดอง เป็นต้น

2. เอกสารอ้างอิง (references)

2.1 AOAC Official Method 945.85: Filth in Pickles

2.2 AOAC Official Method 945.75: Extraneous Materials (Foreign Matter) in Products

3. หลักการ (Principle)

แยกสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์ เป็นต้น ออกจากตัวอย่าง โดยสิ่งแปลกปลอมจะลอยขึ้นมาอยู่ในชั้นของ heptane ซึ่งสามารถแยกสิ่งแปลกปลอมใน Wildman trap flask เก็บชั้น heptane มากรอง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 g

4.1.2 Widefield zoom stereoscopic microscope

4.1.3 Compound microscope

4.1.4 Stirrer - hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง

4.1.5 เครื่องทำน้ำร้อนพร้อมสายฉีด

4.1.6 อ่างน้ำเย็น (cooling bath)

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 ชุดเครื่องกรอง ประกอบด้วย filtering flask ขนาด 2,000 ml Hirsch funnel ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm และเครื่องปั๊มสุญญากาศ
- 4.2.2 Magnetic stirring bar เป็นแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ขนาดยาว โดยประมาณ 47 mm เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9 mm
- 4.2.3 Wildman trap flask - ประกอบด้วย erlenmeyer flask ขนาด 2,000 ml ภายใน flask มี metal rod ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm (3/16 inchs) มีความยาวกว่าความสูงของ flask ประมาณ 10 cm ส่วนปลายของ metal rod มีแผ่นยาง (rubber pad) รูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm ติดอยู่
- 4.2.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm
- 4.2.5 ตะแกรง (sieve) เบอร์ 8 และ 140 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 inches
- 4.2.6 Glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 cm
- 4.2.7 Beaker ขนาด 500, 50 ml
- 4.2.8 Forceps
- 4.2.9 Wash bottle
- 4.2.10 Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm
- 4.2.11 นาฬิกาจับเวลา
- 4.2.12 แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

5. สารเคมี (Reagents)

Heptan, Commercial n-heptane containing < 8% toluene

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

-

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ผลិតภัณฑ์อาหารดองทั้งหัวหรือผล

- 7.1.1 เทตัวอย่างทั้งหมดลงในตะแกรงเบอร์ 8 ที่วางซ้อนอยู่บนตะแกรงเบอร์ 140
- 7.1.2 ล้างภาชนะบรรจุให้สะอาดเพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมที่ติดอยู่ด้านข้างและเทน้ำล้างลงใน ตะแกรงเบอร์ 8
- 7.1.3 ฉีดน้ำร้อนล้างตัวอย่างบนตะแกรงให้ทั่ว กลับด้านตัวอย่างเป็นครั้งคราว
- 7.1.4 ถ่ายส่วนที่เหลือนบนตะแกรงเบอร์ 140 ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml โดยใช้ น้ำฉีดล้างตะแกรงลงในบีกเกอร์ใบเดิม นำของเหลวในบีกเกอร์ไปกรองบนกระดาษกรองเบอร์ 8 โดยใช้ชุดเครื่องกรอง
- 7.1.5 คีบกระดาษกรองวางลงใน petri dish นำไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมภายใต้ Widefield zoom stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 30 เท่า

7.2 ผลิตภัณฑ์อาหารดองที่หั่นเป็นชิ้นและปรุงรส

- 7.2.1 ชั่งตัวอย่าง 100 g ลงใน trap flask ขนาด 2,000 ml เติมน้ำ 200 ml
- 7.2.2 นำไปต้มบน hot plate ให้เดือดเบาๆ นาน 15 min พร้อมกวนตัวอย่างโดยใช้ magnetic stirring
- 7.2.3 หลังจากนั้นนำ trap flask ไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยแช่ในอ่างน้ำเย็น ให้อุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง
- 7.2.4 เติม heptane ปริมาตร 25 ml ผ่าน metal rod และกวนตัวอย่าง โดยใช้ magnetic stirring จน heptane แยกตัวเป็นเม้นคานาน 1 min เพื่อจับ สิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง
- 7.2.5 เติมน้ำให้ชั้น heptane อยู่ในช่วงคอ trap flask ตั้งทิ้งไว้ นาน 30 min โดย 20 min แรก ให้กวนทุกๆ 3-6 min ส่วน 10 min หลัง ให้ตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้ชั้น heptane แยกตัว
- 7.2.6 หมุน stirring rod เพื่อให้เศษตัวอย่างและสิ่งแปลกปลอมที่อาจติดอยู่กับ แผ่นยางหลุดออกและเทชั้น heptane ลงในบีกเกอร์ ขนาด 500 ml
- 7.2.7 นำของเหลวในบีกเกอร์ไปกรองบนกระดาษกรองเบอร์ 8 โดยใช้ชุดเครื่องกรอง

7.2.8 คีบกระดาศกรองวางลงใน petri dish

7.2.9 เติม heptane ปริมาตร 15 ml ผ่าน stirring rod ลงใน trap flask แล้วกวนอย่างแรง โดยใช้ stirring rod จน heptane แยกตัวเป็นเม็ดนาน 1 min เพื่อจับสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง

7.2.10 ดำเนินการตามข้อ 7.2.5 ถึงข้อ 7.2.8

7.2.11 นำกระดาศกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 30 เท่า หากสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กไม่สามารถจำแนกชนิดได้ให้นำสิ่งแปลกปลอมนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ และ mount ด้วย glycerine jelly ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจภายใต้ compound microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

รายงานสิ่งแปลกปลอมที่พบ โดยจัดแบ่งชนิดสิ่งแปลกปลอมเป็นกลุ่มๆ เช่น แมลง ทั้งตัวชิ้นส่วนแมลง ขนสัตว์ฟันแทะ ขนคน และขนนก เป็นต้น ให้ระบุจำนวน ขนาด และรายละเอียดอื่นๆ ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมที่พบมีจำนวนมากและไม่สามารถนับได้ทั้งหมด ให้รายงานจำนวนโดยประมาณหรือขั้นต่ำที่สามารถตรวจสอบได้และให้ใส่เครื่องหมายมากกว่า

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอย่างน้อย 2 subsamples

9.2 ตรวจสอบน้ำประปาและน้ำกรองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทุกครั้งที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเก็บน้ำประปาและน้ำกรองอย่างน้อย 1,000 ml นำไปกรองผ่านกระดาศกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.3 ตรวจสอบอากาศภายในห้องปฏิบัติการ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้กระดาศกรองวางลงใน petri dish หยคน้ำยาผสมกลีเซอรอล กับ 95% ethyl alcohol ในอัตรา 3:2 ตั้งทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 24 h นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.4 ตรวจสอบ sieve โดยล้างทำความสะอาดทุกครั้งก่อนใช้งาน จากนั้นทำ blank control โดยเก็บน้ำที่ได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

-

DMSc F 3008: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้งสาลี

Determination of light filth in alimentary pastes

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (Light filth) ในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้งสาลี ได้แก่ มักกะโรนี สปาเก็ตตี้ บะหมี่เหลือง อุดัง ราเมน แผ่นก๊วย และบะหมี่สำเร็จรูป เป็นต้น

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Methods 969.41: Light Filth in Alimentary Pastes

2.2 AOAC Official Methods 945.75: Extraneous Materials (Foreign Matter) in Products

3. หลักการ (Principle)

ย่อยตัวอย่างด้วยกรดใน autoclave แล้วนำไป wet sieve ต้มส่วนที่เหลือด้วยกรดและ paraffin oil จากนั้นนำมาแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยน้ำร้อนใน percolator เก็บชิ้นน้ำมันมากรอง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 g

4.1.2 Autoclave ชนิด slow exhaust

4.1.3 Widefield zoom stereoscopic microscope

4.1.4 Compound microscope

4.1.5 Stirrer - hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง

4.1.6 เครื่องทำน้ำร้อนพร้อมสายฉีด

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 ชุดเครื่องกรอง ประกอบด้วย filtering flask ขนาด 2,000 ml Hirsch funnel ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm และเครื่องปั๊มสุญญากาศ
- 4.2.2 ตะแกรง (sieve) เบอร์ 230 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 inches ควรทำจาก stainless steel และเป็นชนิด plain weave ที่มีเส้นลวดสานกันแบบ ขึ้น 1 ลง 1
- 4.2.3 Magnetic stirring bar เป็นแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ขนาดยาว โดยประมาณ 47 mm เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9 mm
- 4.2.4 Glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 cm
- 4.2.5 Percolator ขนาด 2,000 ml
- 4.2.6 Beaker ขนาด 2,000, 1,000, 50 ml
- 4.2.7 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 cm
- 4.2.8 Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 cm
- 4.2.9 Glass rod
- 4.2.10 Forceps
- 4.2.11 Wash bottle
- 4.2.12 Clamp
- 4.2.13 นาฬิกาจับเวลา
- 4.2.14 แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 3 % HCl เตรียมโดยใช้ HCl ความเข้มข้น 36.5 - 38.0 % ปริมาตร 30 ml ผสมกับน้ำกรอง 970 ml
- 5.2 Isopropanol ความเข้มข้น 99.9 % หรือ ethanol 95 %
- 5.3 Paraffin oil สีขาว ใส มีค่า 125/135 Saybolt universal viscosity และมีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.84 - 0.86
- 5.4 Antifoam solution - 1 g Dow Corning Antifoam A compound diluted with 20 ml ethyl acetate ใช้ส่วนใสด้านบน และปิดฝาให้แน่น

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 ชั่งตัวอย่าง 225 g ลงใน beaker ขนาด 2,000 ml
- 6.2 เติม 3 % HCl (30 + 970) ปริมาตร 1,000 ml และ antifoam solution 0.3 ml (สำหรับสลายตัวให้หักเป็นเส้น โดยไม่วางราบอยู่ที่ก้น)
- 6.3 นำไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 30 min และใช้ slow exhaust
- 6.4 ถ่ายส่วนผสมจาก beaker ลงใน sieve no. 230
- 6.5 ใช้น้ำประปาที่ร้อน (อุณหภูมิ 50 -70 °C) จีกลงไปใน sieve เพื่อล้างของเหลวเดิม และส่วนของตัวอย่างที่เป็น fine material ใน beaker ออก (ขั้นตอนนี้เรียก “wet sieve”) โดยต้องเอียง sieve และระวังไม่ให้น้ำกระเด็น (splash) เพราะจะทำให้สิ่งปนปลอมสูญหาย (loose material)
- 6.6 ใช้น้ำร้อน อุณหภูมิ 60-100 °C ถ่ายสิ่งที่ตกค้างกลับลงใน beaker ขนาด 2,000 ml ใบเดิมให้ได้ปริมาตร 1,000 ml
- 6.7 เติม HCl conc. ปริมาตร 30 ml และใส่ magnetic bar
- 6.8 เติม paraffin ปริมาตร 50 ml แล้วกวนให้เป็น vortex ด้วย hot plate stirrer นาน 6 min โดยระวังของเหลวกระเด็นและแท่งแม่เหล็กอยู่ในสมดุล

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ใช้ clamp หนีบท่อสายยางที่ก้น percolator จากนั้นเติมน้ำกรองประมาณ 250 ml ลงใน percolator
- 7.2 ถ่ายส่วนผสมใน beaker (ข้อ 6.8) ลงใน percolator และล้าง beaker ด้วยน้ำประปาที่ร้อนลงใน percolator ให้ได้ปริมาตร 1,700 ml (โดยทำเครื่องหมายบอกปริมาตร 1,700 ml ไว้)
- 7.3 ทิ้งไว้ นาน 3 min แล้ว drain ให้ได้ปริมาตร oil interface 250 ml
- 7.4 ทิ้งส่วนที่ drain แล้วทำซ้ำโดยเติมน้ำประปาที่ร้อนผ่านผิวด้านใน percolator เพื่อล้าง materail ที่ติดอยู่ ให้ได้ปริมาตร 1,700 ml
- 7.5 ทิ้งไว้ นาน 2-3 min แล้ว drain ทิ้งและทำซ้ำใหม่อีก 2 ครั้ง (ให้ชั้น lower layer เกือบจะหรือปราศจากสารแขวนลอย ถ้ายังไม่สะอาด ให้ทำต่ออีก 1 รอบ)

- 7.6 สุดท้าย ให้ drain ในส่วนของชั้น interface ระหว่าง น้ำมันกับน้ำ ให้ได้ปริมาตร 250 ml ใส่ใน beaker ใบเดิม
- 7.7 ล้างด้านใน percolator ด้วย น้ำประปาร้อน 50 ml isopropanol หรือ alcohol และ น้ำประปาร้อน ถ้าจำเป็นให้ใช้ 5% detergent solution (sodium lauryl sulfate solution)
- 7.8 นำของเหลวที่อยู่ใน beaker ไปกรองลงบนกระดาษกรอง และล้างด้วยน้ำประปา ร้อน alcohol หรือ isopropanol และน้ำหรือ detergent ใช้ปริมาณน้อยที่สุดรวมกัน ไม่เกิน 50 ml ถ้าจำเป็นใช้ rubber policeman ล้างทำความสะอาดด้านข้าง beaker
- 7.9 กรองโดยใช้ชุดเครื่องกรอง
- 7.10 คีบกระดาษกรองวางลงใน petri dish
- 7.11 นำกระดาษกรองไปตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 30 เท่า หากสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กมากไม่สามารถ จำแนกชนิดได้ ให้นำสิ่งแปลกปลอมนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ และ mount ด้วย glycerine jelly ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจสอบภายใต้ Compound microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

ถ้าตัวอย่างตรวจพบสิ่งปนปลอม “โดยเฉลี่ย” จำนวนเท่ากับหรือมากกว่ารายการต่อไปนี้ ถือว่าเป็น defect action level หรือ US.FDA จะกักกันสินค้าที่ด่าน

- ชิ้นส่วนแมลง 225 ชิ้น
- ขนสัตว์ฟันแทะ 4.5 เส้น

รายงานสิ่งแปลกปลอมที่พบต่อจำนวน subsample โดยจัดแบ่งชนิดของสิ่งแปลกปลอม ที่พบเป็นกลุ่ม ๆ เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง ขนหนู และ human hair เป็นต้น และ ให้ระบุจำนวน ขนาดและรายละเอียดอื่น ๆ ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ในกรณีที่ สิ่งแปลกปลอมที่พบมีจำนวนมากและไม่สามารถนับค่าที่แท้จริงได้ ให้รายงานจำนวน โดยประมาณหรือขั้นต่ำที่สามารถตรวจสอบได้และให้ใส่เครื่องหมายมากกว่า

9. การควบคุมผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทำ Assuring the quality of test results 1 ครั้งต่อปี โดยมีรายละเอียดตาม protocol ที่กำหนดไว้

9.2 การควบคุมภายในห้องปฏิบัติการ ปฏิบัติดังนี้

9.2.1 ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการต้องสวมถุงมือ ตาข่ายคลุมผม เสื้อแขนยาว (lab coat) ที่สะอาดตลอดเวลา เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งต่าง ๆ ที่อาจติดมากับเสื้อผ้าของผู้คน และจัดทำ authentic slides ของเส้นขน/ผม ไว้ใช้ในการเปรียบเทียบ เมื่อมีการตรวจพบเส้นขน/ผม ในตัวอย่าง

9.2.2 ตรวจสอบอากาศในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ ๆ ละหนึ่งครั้ง โดยใช้กระดาษ กรองวางลงในจานแก้ว (petri dish) หยคน้ำยาผสมกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์ ในอัตรา 3:2 พอเปียก เปิดฝาจานแก้วตั้งทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 24 h เสร็จแล้วนำมา ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.2.3 ตรวจสอบน้ำประปาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทุกครั้ง ของการวิเคราะห์ที่ใช้น้ำ โดยเปิดน้ำทิ้งไว้ 10 min จึงรองน้ำ 1,000 ml นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า กรณีน้ำกรองให้ตรวจทุกครั้งที่มีการใช้น้ำกรองในการตรวจวิเคราะห์ โดยเก็บน้ำกรองจำนวน 1,000 ml นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.2.4 ตรวจสอบ sieve โดยล้างทำความสะอาดทุกครั้งก่อนใช้งาน จากนั้นทำ blank control โดยเก็บน้ำที่ได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วตรวจภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า

9.3 petri dish ที่บรรจุกระดาษกรองที่มีสิ่งแปลกปลอมจากการตรวจวิเคราะห์ ต้องปิดสนิท เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก ยกเว้นอยู่ในระหว่างการจำแนกและนับ จำนวนสิ่งแปลกปลอม โดย widefield zoom stereoscopic microscope หลังจากนั้น ต้องปิดฝา petri dish ทันทีที่ตรวจเสร็จแล้ว ในกรณีที่ผู้วิเคราะห์ไม่สามารถ ตรวจสอบ เสร็จภายใน 1 วัน ควรเก็บ petri dish ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-8 °C

10. รายละเอียดอื่น

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางนิตยา พันธุ์บัว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางปวีณา พานิชกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 3. นางสาวสุนันท์ ทองหยู | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ |
| 4. นางสาวสุพัฒตา ท้าวมา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |

มาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 4021	ข้าวโพดตัดแปร พันธุ์กรรมชนิด MIR162 Maize (SYN-IR162-4)	Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MIR162 (SYN-IR162-4)	-	151
DMSc F 4022	ข้าวโพดตัดแปร พันธุ์กรรมชนิด MON88017-3	Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MON88017-3	-	157
DMSc F 4023	ถั่วเหลืองตัดแปร พันธุ์กรรมชนิด DP305423-1	Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for detection of soy event DP305423-1	-	163
DMSc F 4024	ถั่วเหลืองตัดแปร พันธุ์กรรมชนิด MON89788-1	Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for detection of soy event MON89788-1	-	169

**DMSc F 4021: Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method
for detection of maize event MIR162 (SYN-IR162-4)**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MIR162 (SYN-IR162-4) [ที่ตัดแปรพันธุ์กรรมใส่ยีน *vip3Aa20* ที่ผลิต vegetative insecticidal protein (*vip3Aa* variant) จาก *Bacillus thuringiensis* strain AB88 เพื่อให้ทนต่อ lepidopteran insects และ ยีน *pmi* จาก *Escherichia coli* สำหรับใช้เป็น selective marker] โดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E)/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.; *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 International Service of Acquisition of the Agri-Biotech Applications. Event MIR162. [online]. {cite: 13.11.2018}; [2 screens] Available form: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=130>

- 2.5 Charles Delobel C., Mazzara M., Bevilacqua A., Van den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Maize MIR162 by Real-time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication (2011)
- 2.6 European Commission. Event MIR162. [online]. {cite: 21.11.2016}; [2 screens]
Available form: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-022.pdf>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

- RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction
- dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates
- CT: Threshold Cycle / Cycle of Threshold

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
- 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
- 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ primers สามารถจับเข้ากับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
- 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 3' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MIR162

4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด MIR162 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง MIR162 และข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 92 bp

5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด

MIR162-fl: 5' – gCg Cgg TgT CAT CTA TgT TAC TA_g – 3'

5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนตัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด

MIR162-r1: 5' – TgC CTT ATC TgT TgC CTT CA_g A – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.5 RTi-PCR probe:

MIR162-p1: 5' – FAM-TCT AgA CAA TTC AgT ACA TTA AAA
AC_g TCC gCC A – TAMRA – 3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ MIR162_1

ตาราง MIR162_1

Reagent	Final concentration
Jumpstart ReadyMix (2x) Sigma	1x
Primer Fw	0.30 $\mu\text{mol/L}$
Primer Rev	0.30 $\mu\text{mol/L}$
Probe	0.15 $\mu\text{mol/L}$
Sulforhodamine 101	0.30 $\mu\text{mol/L}$
MgCl ₂	5.5 mmol/L
Nuclease-free water	#
Template DNA	Maximum 250 ng
Final Volume	25 μL

7.2 การควบคุมในขั้นตอนการทำ PCR (PCR controls) ทุกครั้งที่วิเคราะห์ ต้องมีหลอดควบคุมดังต่อไปนี้

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM MIR162 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง MIR162_2

ตาราง MIR162_2

Stage	Temperature (°C)	Time (second)	No. of Cycles
Activation/ Initial Denaturation	95	600	1
Denaturation	95	15	
Annealing & Extension	60	60	
Denaturation, Annealing & Extension			40

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้ต่ำกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชนิด MIR162 (MIR162 maize) พบ/ detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชนิด MIR162 (MIR162 maize) ไม่พบ/
not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ผลวิเคราะห์มีความถูกต้องสามารถแปลผลได้เมื่อ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

-

**DMSc F 4022: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection
of maize event MON88017-3**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MON88017-3 (ที่ตัดแปรพันธุ์กรรมใส่ยีน *cp4 epsps (aroA:CP4)* จาก *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 เพื่อให้ทนต่อยาปราบวัชพืชนชนิด glyphosate และ ยีน *cry3Bb1* ผลิต Cry3Bb1 delta endotoxin จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kumamotoensis* เพื่อให้ทนต่อ Coleopteran insect) โดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E)/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.; *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 JRC Reference Reports: Compendium of reference methods for GMO analysis, EURL-GMFF/ ENGL, 2011

2.5 Charles Delobel C., Foti N., Grazioli E., Mazzara M., Van Den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON 88017 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication (2008)

2.6 International Service of Acquisition of the Agri-Biotech Applications. Event 88017 [online]. {cite: 13.11.2018}; [2 screens] Available form:

<http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=94>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

CT: Threshold Cycle / Cycle of Threshold

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 3' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MON88017-3

4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด MON88017-3 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง MON88017-3 และข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 95 bp

5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด MON88017 AF: 5' – gAg CAg gAC CTg CAg AAg CT – 3'

5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนตัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด

MON88017 AR: 5' – TCC ggA gTT gAC CAT CCA – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.5 RTi-PCR probe

MON88017 AP: 5' - FAM – TCC CgC CTT CAg TTT AAA CAg AgT Cgg gT - TAMRA – 3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ 88017_1

ตาราง 88017_1

Reagent	Final concentration
TaqMan® Universal PCR Master Mix	1x
Primer Fw	0.15 μ mol/l
Primer Rev	0.15 μ mol/l
Probe	0.05 μ mol/l
Nuclease-free water	#
Template DNA	Maximum 200 ng
Final Volume	50 μ L

7.2 การควบคุมในขั้นตอนการทำ PCR (PCR controls) ทุกครั้งที่วิเคราะห์ ต้องมีหลอดควบคุม ดังต่อไปนี้

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM MIR162 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุใน ตาราง 88017_2

ตาราง 88017_2

Stage	Temperature (°C)	Time (second)	No. of Cycles
Decontamination (UNG)	50	95	1
Activation/ Initial Denaturation	95	95	1
Denaturation	95	60	
Annealing & Extension	60	60	
Denaturation, Annealing & Extension			45

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control
เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้น้อยกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถ อ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวก ทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MON88017-3 (MON88017-3 maize)

พบ/detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MON88017-3 (MON88017-3 maize)

ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องสามารถแปลผลได้เมื่อ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

ผลการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีโดยฝ่ายชีวโมเลกุล สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารใน ground maize เมื่อใช้ปริมาณ 100 ng/Reaction พบว่าวิธีนี้ให้ค่า limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.1% GM ground maize และมีค่า ของ specificity และ sensitivity เป็น 100% ทั้ง 2 ค่าเมื่อทดสอบค่าที่ระดับ LOD

DMSc F 4023: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of soy event DP305423-1

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาลำดับเบสดีเอ็นเอของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมชนิด DP305423-1 [ที่ตัดแปรพันธุกรรมโดยใส่ยีน *gm-hra* ของถั่วเหลืองที่ทำให้ทนต่อยาปราบวัชพืช ชนิด sulfonylurea-based เพื่อใช้เป็น marker และใส่ยีน *gm-fad2-1* (partial sequence) จาก ถั่วเหลืองเพื่อยับยั้งการเปลี่ยน oleic acid เป็น linoleic acid] โดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W,: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 JRC Reference Reports: Compendium of reference methods for GMO analysis, EURL-GMFF/ ENGL, 2011
- 2.5 Mazzara M., Munaro B., Grazioli E., Savini C., Charles Delobel C., Van Den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real-time PCR v. 1.01 - Validation Report and Validated Method" Online Publication (2013)

2.6 International Service of Acquisition of the Agri-Biotech Applications. DP305423

[online].{cite: 13.11.2018}; [2 screens] Available form:

<http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=168>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

CT: Threshold Cycle / Cycle of Threshold

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 3' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในถั่วเหลืองตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด DP305423-1

4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเหลือง DP305423-1 และถั่วเหลือง ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง DP305423-1 และถั่วเหลือง ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นถั่วเหลือง โดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 93 bp

5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของถั่วเหลือง DP305-f1: 5' – CgT gTT CTC TTT TTg gCT AgC – 3'

5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนดัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในถั่วเหลือง

DP305-r5: 5' – gTg ACC AAT gAA TAC ATA ACA CAA ACT A – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.5 RTi-PCR probe

DP305-p: 5' - FAM-TgA CAC AAA TgA TTT TCA TAC AAA AgT CgA
gA – TAMRA - 3

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ DP305_1

ตาราง DP305_1

Reagent	Final concentration
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	1 x
Primer Fw	0.80 $\mu\text{mol/l}$
Primer Rev	0.50 $\mu\text{mol/l}$
Probe	0.22 $\mu\text{mol/l}$
Nuclease-free Water	#
Template DNA	Maximum 100 ng
Final Volume	25 μL

7.2 การควบคุมในขั้นตอนการทำ PCR (PCR controls) ทุกครั้งที่วิเคราะห์ ต้องมีหลอดควบคุม ดังต่อไปนี้

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM MIR162 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง DP305_2

ตารางDP305_2

Stage	Temperature (°C)	Time (second)	No. of Cycles
Activation/ Initial Denaturation	95	600	1
Denaturation	95	15	
Annealing & Extension	60	60	
Denaturation, Annealing & Extension			40

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control
เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้ต่ำกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง

2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์
ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด DP305423-1(DP305423-1 soy) พบ/
detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด DP305423-1(DP305423-1 soy) ไม่พบ/
not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องสามารถแปลผลได้เมื่อ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยฝ่ายชีวโมเลกุล สำนักคุณภาพและความปลอดภัย
อาหารใน ground soy เมื่อใช้ปริมาณ 100 ng/Reaction พบว่าวิธีนี้ให้ค่า limit of detection
(LOD) เท่ากับ 0.1% GM ground soy และมีค่า ของ specificity และ sensitivity เป็น 100%
ทั้ง 2 ค่าเมื่อทดสอบค่าที่ระดับ LOD

**DMSc F 4024: Qualitative Real-time Polymerase Chain Reaction method for
detection of soy event MON89788-1**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON89788-1 [ที่ดัดแปรพันธุกรรมใส่ยีน *cp4 epsps (aroA:CP4)* ที่ผลิตเอนไซม์ทนยาปราบวัชพืชชนิด 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) จาก *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4] โดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction (RTi-PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005/ AMD.1:2013(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.; *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- 2.4 JRC Reference Reports: Compendium of reference methods for GMO analysis, EURL-GMFF/ ENGL, 2011
- 2.5 Charles Delobel C., Bogni A., Pinski G., Mazzara M., Van Den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON 89788 Using Real-time PCR v 1.01 – Validation Report and Validated Method" Online Publication (2013)

2.6 International Service of Acquisition of the Agri-Biotech Applications. Event 89788
[online]. {cite: 13.11.2018}; [2 screens] Available form: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=176>

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

RTi-PCR: Real-time Polymerase Chain Reaction
dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates
CT: Threshold Cycle / Cycle of Threshold

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

RTi-PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้น
พร้อมๆ กัน

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 3' integration border region (IBR)
ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในถั่วเหลือง
ตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียว
ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON89788-1

4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเหลือง MON89788-1 และ
ถั่วเหลือง ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง MON89788-1 และถั่วเหลือง ดัดแปร
พันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ
หรือตรวจที่ต้นถั่วเหลือง โดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, RTi-PCR grade

5.2 RTi-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product
ขนาด 139 bp

5.5.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของถั่วเหลือง
MON89788-F: 5' – TCC CgC TCT AgC gCT TCA AT – 3'

5.5.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนดัดแปรที่มีการใส่เข้าไป
ในถั่วเหลือง

MON89788-R: 5' – TCg AgC Agg ACC TgC AgA A – 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ RTi-PCR)

5.5 RTi-PCR probe:

MON89788-P: 5' – FAM-CTg AAg gCg ggA AAC gAC AAT CTg-TAMRA – 3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา RTi-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ 89788_1

ตาราง 89788_1

Reagent	Final concentration
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	1x
Primer Fw	0.15 $\mu\text{mol/l}$
Primer Rev	0.15 $\mu\text{mol/l}$
Probe	0.05 $\mu\text{mol/l}$
Nuclease-free water	#
Template DNA	Maximum 200 ng
Final Volume	50 μL

7.2. การควบคุมในขั้นตอนการทำ PCR (PCR controls) ทุกครั้งที่วิเคราะห์ ต้องมีหลอดควบคุมดังต่อไปนี้

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM MON89788-1 soy

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง 89788_2

ตาราง 89788_2

Stage	Temperature (°C)	Time (second)	No. of Cycles
Decontamination (UNG)	50	120	1
Activation/ Initial Denaturation	95	600	1
Denaturation	95	15	
Annealing & Extension	60	60	
Denaturation, Annealing & Extension			45

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 กำหนดค่า threshold line

กำหนดค่า threshold line ในช่วงที่ amplification curve profile ของ positive control เริ่มมีค่า CT เกิดขึ้น และไม่มี fork effect ระหว่างตัวอย่างที่ทำซ้ำ

8.2 การกำหนดค่า baseline

กำหนดให้ต่ำกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 sub-sample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ถั่วเหลืองคัดแปรรูปพันธุ์กรรมชนิด MON89788-1 (MON89788-1 soy)

พบ/ detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ถั่วเหลืองคัดแปรรูปพันธุ์กรรมชนิด MON89788-1 (MON89788-1 soy)

ไม่พบ/ not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องสามารถแปลผลได้เมื่อ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

-

ภาคผนวก

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1001	การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดย Kjeldahl method
2	DMSc F 1002	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนม
3	DMSc F 1003	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมผงและผลิตภัณฑ์นมชนิดผง
4	DMSc F 1004	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมข้นจืดและนมข้นหวาน
5	DMSc F 1005	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนยแข็ง
6	DMSc F 1006	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนมและผลิตภัณฑ์นม
7	DMSc F 1007	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในนมข้นหวาน
8	DMSc F 1008	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในเนยแข็ง
9	DMSc F 1009	การวิเคราะห์เนื้อนมไม่รวมไขมันในนมพร้อมดื่มและนมแปลงไขมัน
10	DMSc F 1010	การวิเคราะห์เนื้อนมไม่รวมไขมันในนมข้นไม่หวานและนมข้นแปลงไขมันไม่หวาน
11	DMSc F 1011	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชา
12	DMSc F 1012	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในกาแฟ
13	DMSc F 1013	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในโกโก้ผง
14	DMSc F 1014	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาสมุนไพร
15	DMSc F 1015	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในชา
16	DMSc F 1016	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในกาแฟคั่ว
17	DMSc F 1017	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา
18	DMSc F 1018	การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักผลไม้
19	DMSc F 1019	การวิเคราะห์ปริมาณอะซีลเฟม-เค, แอสพาเทม และซัคคาริน ในอาหาร
20	DMSc F 1020	การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมซัคคาเมตในอาหาร
21	DMSc F 1021	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี ในอาหาร
22	DMSc F 1022	การวิเคราะห์ปริมาณดินุกในอาหารกระป๋อง
23	DMSc F 1023	การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมดในอาหาร
24	DMSc F 1024	การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2001	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2002	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium perfringens</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2003	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2004	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร
5	DMSc F 2005	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในน้ำและน้ำแข็ง
6	DMSc F 2006	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
7	DMSc F 2007	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
8	DMSc F 2008	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter sakazakii</i> ในนม และผลิตภัณฑ์นม

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 5 วิธี คือ

1	DMSc F 2003	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2004	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร
3	DMSc F 2006	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2007	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
5	DMSc F 2008	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter sakazakii</i> ในนม และผลิตภัณฑ์นม

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1025	การวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งหมดในน้ำ
2	DMSc F 1026	การวิเคราะห์ปริมาณความกระด้างทั้งหมดในน้ำ
3	DMSc F 1027	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไอศกรีม
4	DMSc F 1028	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในไอศกรีมโดย Kjeldahl method
5	DMSc F 1029	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในไอศกรีม
6	DMSc F 1030	การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกในเครื่องดื่ม
7	DMSc F 1031	การวิเคราะห์ปริมาณ ไนไตรต์ และ ไนเตรต ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์
8	DMSc F 1032	การวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างที่เหลือจากการระเหยอาหารจำลอง
9	DMSc F 1033	การวิเคราะห์ปริมาณบิสฟีนอล เอ (Bisphenol A; 2,2-bis(4-hydroxyphenyl propane) ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
10	DMSc F 1034	การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'-Dichlorodiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
11	DMSc F 1035	การวิเคราะห์ปริมาณ 4,4'-Dihydroxydiphenyl sulfone ที่แพร่ลงสู่อาหารจำลอง
12	DMSc F 1036	การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
13	DMSc F 1037	การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสี ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
14	DMSc F 1038	การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากหัวนมยาง
15	DMSc F 1039	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในหัวนมยางสังเคราะห์
16	DMSc F 1040	การวิเคราะห์ปริมาณ 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber
17	DMSc F 1041	การวิเคราะห์ปริมาณ 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (Antioxidant BHT) และ 2,2'-Methylethylenebis (6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol) (Antioxidant 2246) ที่แพร่ออกมาจากผลิตภัณฑ์ vulcanised rubber

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2009	วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหารโดยวิธี pour plate และ spread plate
2	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2012	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร โดยวิธี MPN
5	DMSc F 2013	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร โดยวิธี pour plate
6	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 3 วิธี คือ

1	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 3001	การวิเคราะห์น้ำหนักสุทธิและน้ำหนักเนื้อในผักกระป๋อง
2	DMSc F 3002	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระในผักกระป๋อง

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1042	การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ
2	DMSc F 1043	การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ในเตรทและซัลเฟต ในน้ำ
3	DMSc F 1044	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำ
4	DMSc F 1045	การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แคลเซียม โครเมียม ทองแดง แมงกานีส นิเกิล สังกะสี และเงินในน้ำ
5	DMSc F 1046	การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ
6	DMSc F 1047	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันอาหารทั้งหมดในอาหาร โดย Enzymatic-Gravimetric Method
7	DMSc F 1048	การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มในน้ำส้มสายชู โดยวิธี Titration
8	DMSc F 1049	การตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรดในซอสบางชนิด โดยวิธี Titration
9	DMSc F 1050	การวิเคราะห์ค่าของกรดในน้ำมันและไขมัน
10	DMSc F 1051	การวิเคราะห์ Phenolic Antioxidants ในน้ำมัน, ไขมันและเนย
11	DMSc F 1052	การวิเคราะห์สารโพลาร์ในน้ำมันและไขมัน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
12	DMSc F 1053	การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมตในผักผลไม้
13	DMSc F 1054	การวิเคราะห์ปริมาณ 3-chloro-1, 2- propanediol (3-MCPD) ในอาหารและส่วนผสมอาหาร

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2015	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี MPN
2	DMSc F 2016	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2017	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Clostridium botulinum</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2018	วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ
5	DMSc F 2019	วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทชนิดที่มีความเป็นกรด

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 1 วิธี คือ

1	DMSc F 2016	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร
---	-------------	---

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4001	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบของพืช ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี CTAB พื้นฐาน
2	DMSc F 4002	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในอาหารที่มีส่วนประกอบ ของพืช ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Basic silica method
3	DMSc F 4003	Qualitative endogenous gene testing: <i>lectin</i> (by means of Polymerase Chain Reaction)
4	DMSc F 4004	Qualitative endogenous gene testing: the chloroplast <i>trnL</i> intron (by means of Polymerase Chain Reaction)
5	DMSc F 4005	Qualitative endogenous gene testing: <i>Invertase</i> (by means of Polymerase Chain Reaction)
6	DMSc F 4006	Qualitative endogenous gene testing: <i>hmgA</i> (by means of real-time Polymerase Chain Reaction)
7	DMSc F 4007	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA: CaMV-35S promoter (by means of Polymerase Chain Reaction)
8	DMSc F 4008	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA : NOS-terminator (by means of Polymerase Chain Reaction)
9	DMSc F 4009	Screening method for the detection of genetically modified plant DNA : nptII (by means of Polymerase Chain Reaction)

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1055	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง โดย Kjeldahl method
2	DMSc F 1056	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในเนย
3	DMSc F 1057	การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในเนย
4	DMSc F 1058	การตรวจวิเคราะห์ไขมันในเนยโดยการคำนวณ
5	DMSc F 1059	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในครีม
6	DMSc F 1060	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในกะทิและผลิตภัณฑ์
7	DMSc F 1061	การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในกะทิและผลิตภัณฑ์
8	DMSc F 1062	การทดสอบน้ำมันแร่ในน้ำมันและไขมัน
9	DMSc F 1063	การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในเกลือบริโภคน้ำที่เสริมไอโอดีนโดยวิธีไตเตรชัน
10	DMSc F 1064	การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์และตับโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
11	DMSc F 1065	การตรวจวิเคราะห์เรดโทพามีนในเนื้อสัตว์และตับโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
12	DMSc F 1066	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลตกค้างในอาหาร โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
13	DMSc F 1067	การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol) ในเนื้อสัตว์และตับโดยเทคนิค LC-MS/MS
14	DMSc F 1068	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2020	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Shigella</i> spp. ในอาหาร
2	DMSc F 2021	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Escherichia coli</i> O157 ในอาหาร
3	DMSc F 2022	วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterobacteriaceae ในอาหาร
4	DMSc F 2023	วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterococci ในอาหาร
5	DMSc F 2024	วิธีตรวจวิเคราะห์ mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 °C
6	DMSc F 2025	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในน้ำและน้ำแข็ง

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 3003	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (ภายนอก) ในเมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืช

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4010	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from Genetically modified GTS 40-3-2 (Roundup Ready® soya beans) by means of Polymerase Chain Reaction
2	DMSc F 4011	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Bt11 maize by means of Polymerase Chain Reaction
3	DMSc F 4012	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Event176 (Bt176) maize by means of Polymerase Chain Reaction
4	DMSc F 4013	Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified T25 maize by means of Polymerase Chain Reaction
5	DMSc F 4014	Event-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified MON810 maize by means of Polymerase Chain Reaction

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1069	การวิเคราะห์ปริมาณโบรมีนในน้ำโดย Ion Chromatograph
2	DMSc F 1070	การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในอาหาร โดย GC
3	DMSc F 1071	การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในเครื่องดื่ม โดย HPLC
4	DMSc F 1072	การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหาร โดย HPLC
5	DMSc F 1073	การวิเคราะห์ฟลาโวกซิน เอ็ม 1 ในนม โดย HPLC
6	DMSc F 1074	การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร โดย LC/MS-MS
7	DMSc F 1075	การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก ผลไม้ โดย GC: กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์
8	DMSc F 1076	การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก ผลไม้ โดย HPLC: กลุ่มคาร์บาเมต
9	DMSc F 1077	การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราตกค้างในผัก ผลไม้ โดย HPLC
10	DMSc F 1078	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมในพลาสติกและยาง โดย AAS
11	DMSc F 1079	การตรวจเอกลักษณ์ชนิดพลาสติกโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer
12	DMSc F 1080	การวิเคราะห์ปริมาณสารระเหยได้ใน Polystyrene
13	DMSc F 1081	การวิเคราะห์ปริมาณ Vinyl chloride monomer ใน Poly (vinyl chloride)
14	DMSc F 1082	การวิเคราะห์ปริมาณ Tricresyl phosphates ใน Poly(vinyl chloride)

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2026	การวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2027	การวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง
3	DMSc F 2028	การวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำและน้ำแข็ง
4	DMSc F 2029	การวิเคราะห์ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> และ <i>Streptococcus thermophilus</i> ในนมเปรี้ยว โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 37°C

ยกเลิกวิธีมาตรฐานจำนวน 1 วิธี คือ

1	DMSc F 2028	การวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำและน้ำแข็ง
---	-------------	---

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4015	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MIR604
2	DMSc F 4016	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MON863
3	DMSc F 4017	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event NK603

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 6
วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1083	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำ (ความชื้น) ในน้ำผึ้ง
2	DMSc F 1084	การวิเคราะห์ปริมาณ hydroxymethylfurfural ในน้ำผึ้ง
3	DMSc F 1085	การวิเคราะห์ปริมาณ diastase activity ในน้ำผึ้ง
4	DMSc F 1086	การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมในเครื่องดื่มเกลือแร่
5	DMSc F 1087	การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในเครื่องดื่มเกลือแร่
6	DMSc F 1088	การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหลายชนิด (multi-elements) ที่แพร่จากพลาสติกกล่องอาหารจำลอง
7	DMSc F 1089	การวิเคราะห์การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำโดยเทคนิค HGAAS
8	DMSc F 1090	การวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเมตาโบไลต์ในอาหาร โดยวิธี LC-MS/MS

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2030	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Cronobacter</i> spp. ในอาหาร
2	DMSc F 2031	วิธีตรวจวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำและน้ำแข็ง
3	DMSc F 2032	วิธีตรวจวิเคราะห์ Coliforms, Fecal coliforms และ <i>E. coli</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2033	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี Pour plate และ Spread plate
5	DMSc F 2034	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Listeria</i> spp. และ <i>Listeria monocytogenes</i> ในอาหาร
6	DMSc F 2035	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. ในอาหาร
7	DMSc F 2036	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
8	DMSc F 2037	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 3004	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในแป้งข้าวเจ้า
2	DMSc F 3005	การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาในผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้า

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 4018	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event DAS-59122-7
2	DMSc F 4019	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event TC1507
3	DMSc F 4020	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event T25



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
www.dmsc.moph.go.th

