

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 5

Standard Methods for Food Analysis

Volume V



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐาน
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร
เล่มที่ 5

Standard Methods
for Food Analysis

Volume V



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 5

Standard Methods for Food Analysis, Volume V

พิมพ์ครั้งที่ 1: สิงหาคม 2560

จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN: 978-616-11-3433-4

สงวนลิขสิทธิ์

ที่ปรึกษา

นางสาวจรรวณ ลิ้มสัจจะสกุล

ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร

นางกนกพร อธิสุข

ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (วิทยาศาสตร์กายภาพ)

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

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มุ่งมั่นสู่การเป็นองค์กรชั้นนำด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุขในภูมิภาคเอเชีย ดำเนินภารกิจที่สำคัญประการหนึ่งคือ พัฒนาห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข และเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงทางด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารของประเทศ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เป็นหน่วยงานสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำหน้าที่เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารของประเทศ และห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านอาหารแห่งอาเซียน สาขาโลหะหนักและโลหะหนักปริมาณน้อย ซึ่งมีหน้าที่ในการกำหนดมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านการตรวจวิเคราะห์อาหาร จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์อาหารของประเทศให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน เพื่อเป็นที่ยอมรับในระดับชาติและนานาชาติ เพื่อลดข้อโต้แย้งด้านความปลอดภัยของอาหารขึ้นภายในประเทศและระหว่างประเทศ การนำผลวิเคราะห์ไปใช้เป็นหลักฐานทางคดี ในกรณีที่คุณภาพอาหารไม่เป็นไปตามมาตรฐาน หรือใช้กำกับ ดูแล ควบคุมคุณภาพอาหาร ให้ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดกฎหมาย

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร จัดทำอย่างต่อเนื่องเป็นเล่มที่ 5 โดยเล่มนี้มีวิธีมาตรฐานทางเคมีจำนวน 14 วิธี สำหรับวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยานั้นนอกจากทบทวนให้เป็นวิธีทันสมัย จำนวน 2 วิธี ยังได้จัดทำเพิ่มเติม จำนวน 2 วิธี รวมเป็น 4 วิธี และได้จัดทำวิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล จำนวน 3 วิธี รวม 21 วิธี เพื่อให้หน่วยงานและผู้เกี่ยวข้อง นำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานและเป็นวิธีอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์ ควบคุม กำกับ ดูแล คุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร ต่อไป



(นายแพทย์สุชุม กาญจนพิมาย)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

14 กรกฎาคม 2560

สารบัญ

	หน้า
วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	7
นิยามและคำย่อ	9
รหัสวิธี	11
DMSc F 1069: การวิเคราะห์ปริมาณโบรเมตในน้ำโดย Ion Chromatograph	13
DMSc F 1070: การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในอาหารโดย GC	19
DMSc F 1071: การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในเครื่องดื่มโดย HPLC	27
DMSc F 1072: การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหาร โดย HPLC	31
DMSc F 1073: การวิเคราะห์ฟลาโวกซิน เอ็ม 1 ในนม โดย HPLC	35
DMSc F 1074: การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหาร โดย LC/MS-MS	41
DMSc F 1075: การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก ผลไม้ โดย GC: กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์	47
DMSc F 1076: การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก ผลไม้ โดย HPLC: กลุ่มคาร์บาเมต	55
DMSc F 1077: การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราตกค้างในผัก ผลไม้ โดย HPLC	63
DMSc F 1078: การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมในพลาสติกและยาง โดย AAS	69
DMSc F 1079: การตรวจเอกลักษณ์ชนิดพลาสติกโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer	75
DMSc F 1080: การวิเคราะห์ปริมาณสารระเหยได้ใน Polystyrene	81
DMSc F 1081: การวิเคราะห์ปริมาณ Vinyl chloride monomer ใน Poly (vinyl chloride)	85
DMSc F 1082: การวิเคราะห์ปริมาณ Tricresyl phosphates ใน Poly(vinyl chloride)	89

สารบัญ

	หน้า	
วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหาร		93
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์		
นียามและคำย่อ		95
รหัสวิธี		95
DMSc F 2026: การวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร		97
DMSc F 2027: การวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง		119
DMSc F 2028: การวิเคราะห์ <i>Fecal enterococcus</i> และ <i>Fecal streptococcus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง		133
DMSc F 2029: การวิเคราะห์ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> และ <i>Streptococcus thermophilus</i> โนนมเปรี้ยว โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 37°C		151
วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหาร		165
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์		
รหัสวิธี		166
DMSc F 4015: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MIR604		167
DMSc F 4016: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MON863		173
DMSc F 4017: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event NK603		179
ภาคผนวก		185
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1		185
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2		187
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3		189
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4		191

วิธีมาตรฐานทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

1	นางกนกพร อธิสุข	ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (วิทยาศาสตร์กายภาพ)
2	นางสาวกรรณิกา จิตศิขรา	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
3	นางสาวจิตผกา สันต์ครบ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
4	นางสาวปยุธา แสงวิรุฬห์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
5	นางวิชาดา จงมีวาสนา	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
6	นางสาวศศิธร หอมคำรงค์วงศ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
7	นางสาวสุวรรณี ชีรภาพธรรมกุล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
8	นางสาวอรุณี ดนุศล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
9	นางสาวประภาศรี บุญขประภาพันธ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
10	นายเสกสรร ทองโพธิ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

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

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

4. การใช้สัญลักษณ์ (ตัวเลข+ตัวเลข) หลังชื่อของสารเคมี เช่น HCl (1+2) หมายถึง สารผสมระหว่าง HCl 1 หน่วยปริมาตร กับ H₂O 2 หน่วยปริมาตร
5. คำย่อที่ใช้ และ คำเต็ม แสดงในตาราง

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



Abbreviation	Word/คำเต็ม
LC	Liquid Chromatograph
m	Meter, milli – as prefix
M	Molar
Me	Methyl, CH ₃ -
MeOH	Methanol, CH ₃ OH
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Mass spectrometer
MW	molecular weight
MΩ	Megaohm
N	Normal
ng	Nanogram
-OAc	acetate
-OCN	Cyanate
od	outer diameter or dimension
ppm	part per million
ppb	part per billion
rpm	round per minute
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
wt	Weight
μg	Microgram (10 ⁻⁶ g)
μL	Microliter (10 ⁻⁶ L)
μm	Micron, micrometer (10 ⁻⁶ m)
/	Per
%	Percent
>	more than
<	less than
≥	equal to and more than
≤	equal to and less than

วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1069	น้ำ	โบรเมต (Bromate)	III	13
DMSc F 1070	อาหาร	โคเลสเตอรอล (Cholesterol)	III	19
DMSc F 1071	เครื่องดื่ม	กาเฟอีน (Caffeine)	III	27
DMSc F 1072	อาหาร	กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก (Benzoic acid and Sorbic acid)	III	31
DMSc F 1073	นม	อฟลาทอกซิน เอ็ม1 (Aflatoxin M1)	III	35
DMSc F 1074	อาหาร	อะคริลาไมด์ (Acrylamide)	III	41
DMSc F 1075	ผักและผลไม้	สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ตกค้าง (Pesticides residue): กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์ กาโนฟอสเฟต และกลุ่มสาร สังเคราะห์ไพรีทรอยด์	III	47
DMSc F 1076	ผักและผลไม้	สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ตกค้าง (Pesticides residue): กลุ่มคาร์บาเมต	III	55
DMSc F 1077	ผักและผลไม้	สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ตกค้าง (Fungicides residue)	III	63
DMSc F 1078	พลาสติก และยาง	ตะกั่ว และ แคดเมียม (Lead and Cadmium)	III	69
DMSc F 1079	พลาสติก	ตรวจเอกลักษณ์ (Identification)	III	75
DMSc F 1080	โพลีสไตรีน	สารระเหย (Volatile substance)	III	81
DMSc F 1081	โพลีไวนิล คลอไรด์	ไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ (Vinylchloride monomer)	III	85
DMSc F 1082	โพลีไวนิล คลอไรด์	ไตรกลีซิลฟอสเฟต (Tricresyl phosphates)	III	89

DMSc F 1069: การวิเคราะห์ปริมาณโบรมेटในน้ำโดย Ion chromatograph

Determination of bromate in water by Ion chromatograph

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้สำหรับหาปริมาณโบรมेट (BrO_3^-) ในน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำแข็ง น้ำแร่ น้ำประปาและน้ำจากแหล่ง อื่นๆ ยกเว้นน้ำเสีย โดยมีค่า LOD เท่ากับ $1.0 \mu\text{g/L}$ และ LOQ เท่ากับ $3.0 \mu\text{g/L}$

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 Wagner HP, Pepich BV, Pohl C, et al. U.S. EPA Method 302.0: Determination of bromate in drinking water using two-dimensional Ion Chromatography with suppressed conductivity detection; 2009. p.1– 37.
- 2.2 Dionex Corporation. Determination of trace concentrations of chlorite, bromate, and chlorate in bottled natural mineral waters. Application Note 184.
- 2.3 Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington DC: American Public Health Association; 2012. 4110 B p. 4-5 – 4-7.

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างน้ำซึ่งผ่านการกรองอนุภาคที่ใหญ่กว่า $0.45 \mu\text{m}$ เมื่อนำมาฉีดเข้าไปในเครื่อง Ion Chromatograph (IC) สารละลายที่เป็น mobile phase จะพาตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนกับ stationary phase (ซึ่งมักเป็น resin) ในคอลัมน์ ไอออนแต่ละชนิดจะถูกแยกจากกันตามความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออน ถ้าความสามารถในการแลกเปลี่ยนสูงจะอยู่ในคอลัมน์ได้นาน (retention time สูง) จากนั้นจะออกจากคอลัมน์เข้าสู่ suppressor เพื่อลดค่า background เป็นการช่วยปรับให้สามารถตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าที่เกิดจากไอออนที่สนใจได้ดีขึ้น ขณะที่ค่าการนำไฟฟ้าที่เกิดจาก eluent จะลดลง ใน suppressor ไอออนที่แยกออกมาจะมีสภาพเป็นกรด เมื่อผ่านเข้าไปในเครื่องตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าจะเกิดสัญญาณซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น โครมาโตแกรม คำนวณหาปริมาณของโบรมेटจาก calibration curve ที่สร้างระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 IC - Conductivity detector

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Beaker ขนาด 50 ml

4.2.2 Micropipette ขนาด 100, 200, 500 และ 1,000 μ l

4.2.3 Syringe filter และ Polyethersulfone (PES) membrane filter ขนาด 0.45 μ m

4.2.4 Syringe ขนาด 10 ml

4.2.5 Volumetric flask ขนาด 10 และ 100 ml

4.2.6 หลอดพลาสติก ขนาด 50 ml

5. สารเคมี (Reagent)

น้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า Resistivity ≥ 18 m Ω /cm

5.1 สารมาตรฐาน (Standards): สารละลายมาตรฐาน BrO_3^- 1,000 mg/L

5.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

5.2.1 first Intermediate standard solution BrO_3^- 10 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน BrO_3^- ความเข้มข้น 1,000 mg/L ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2.2 second Intermediate standard solution BrO_3^- 0.1 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน BrO_3^- ความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.2.3 working standard BrO_3^- 0.003, 0.005, 0.01, และ 0.02 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน BrO_3^- ความเข้มข้น 0.100 mg/L ปริมาตร 300, 500, 1000 และ 2000 μ L ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

สามารถปิ่เปิดปริมาตรสารละลายมาตรฐานลงใน volumetric flask ให้ได้ช่วงความเข้มข้นอื่นที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างน้ำ: สุ่มตัวอย่างและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 ตัวอย่างน้ำแข็ง: สุ่มตัวอย่าง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 สภาวะเครื่อง IC

detector: conductivity detector

column: IonPac AS19 (analytical 4×250 mm, guard 4×50 mm)

eluent: Hydroxide system (eluent generator) สำหรับผลิต KOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบอัตโนมัติเพื่อใช้เป็นสารละลาย eluent โดยใช้ H_2O เป็นสารละลายเริ่มต้น

Injection volume: 500 μL

Flow rate: 1 ml/min

เตรียมความพร้อมของเครื่อง IC ให้ eluent ไหลผ่าน column รอกเครื่องทำงานตามสภาวะที่กำหนด ค่า total conductivity < 3 μsec และ baseline คงที่ประมาณ 30 min

7.2 ทดสอบ system suitability ของเครื่องก่อนใช้งาน

ฉีดสารละลายมาตรฐาน 5 ซ้ำ โดยใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 ระดับที่อยู่ในช่วงของ calibration curve ใส่ลงในหลอดพลาสติกประมาณ 10 ml วางในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของ BrO_3^- จะแสดงเป็นโครมาโตแกรม คำนวณ % RSD ของ retention time และ peak area เกณฑ์การยอมรับ < 1.0% และ < 2.5% ตามลำดับ

7.3 สร้างกราฟมาตรฐาน calibration curve

7.3.1 ฉีด blank (H_2O) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน

7.3.2 ฉีด working standard solution ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายมาตรฐาน BrO_3^-

7.3.3 สร้าง calibration curve ให้ peak area อยู่บนแกน y ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอยู่บนแกน x คำนวณ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Correlation coefficient, r) เกณฑ์การยอมรับคือ $r > 0.995$

7.4 เทตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันใส่ beaker ขนาด 50 ml ลูดยด้วย syringe พลาสติกกรองผ่าน PES membrane filter ขนาด 0.45 μm ลงในหลอดพลาสติกประมาณ 10 ml นำไปวางในเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ แล้วฉีดเข้าเครื่อง IC

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ปริมาณโบรเมต จากสูตร

$$\begin{aligned} C (\mu\text{g/L}) &= A \times \text{RF} \times D \\ \text{โดย } A &= \text{peak area ของ } \text{BrO}_3^- \text{ ในตัวอย่าง} \\ \text{RF (response factor)} &= \frac{\text{ความเข้มข้นสารมาตรฐาน}}{\text{peak area สารมาตรฐาน}} \\ D &= \text{dilution factor} \end{aligned}$$

8.2 รายงานปริมาณโบรเมต (BrO_3^-) ในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร ($\mu\text{g/L}$) ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 วิเคราะห์ control sample และ plot ใน control chart

9.2 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกชุดตัวอย่าง (ชุดละไม่เกิน 10 ตัวอย่าง) ค่า Relative Percent Difference (RPD) ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 วิธีนี้โดยมีค่า Limit of detection (LOD) เท่ากับ $1.0 \mu\text{g/L}$ และ ค่า Limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ $3.0 \mu\text{g/L}$

10.2 ผลการตรวจสอบการใช้ได้ (method validation) ของวิธีโดยห้องปฏิบัติการฝ่ายน้ำและสารกัมมันตรังสี สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ดำเนินการเมื่อพฤศจิกายน 2557

10.2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 2.0, 5.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0 และ $20.0 \mu\text{g/L}$ ได้ค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 0.997

10.2.2 การยืนยันค่า Limit of Quantitation (LOQ) ที่ระดับความเข้มข้น $3.0 \mu\text{g/L}$ และศึกษา Recovery และ Repeatability ที่ระดับความเข้มข้น 5.0, 11.0 และ $17.0 \mu\text{g/L}$ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน BrO_3^- ลงในตัวอย่างน้ำ นำนาวเคราะห์ 10 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	Spiked level (µg/L)	% Recovery		%RSD
		ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
BrO ₃ ⁻	3.0	108.1-115.0	112.1 ± 0.08	2.35
	5.0	96.8-109.6	103.6 ± 0.20	3.86
	11.0	93.0-108.1	98.7 ± 0.91	8.37
	17.0	93.4-107.6	101.5 ± 1.02	5.92

DMSc F 1070: การวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในอาหารโดย Gas Chromatograph

Determination of cholesterol in food by Gas Chromatograph

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอล (cholesterol) ในอาหารและผลิตภัณฑ์ ที่มีปริมาณของโคเลสเตอรอลในช่วง 2-120 mg/100 g

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 994.10 Cholesterol in Foods

3. หลักการ (Principle)

ไขมันในอาหารถูก saponified ที่อุณหภูมิสูง ด้วยสารละลาย ethanolic potassium hydroxide สกัดโคเลสเตอรอลด้วย toluene และเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ trimethylsilyl (TMS) ether แล้ววิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องมือ Gas chromatograph

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.1.2 เตาไฟฟ้าพร้อมเครื่องกวนแม่เหล็ก (hot plate with magnetic stirrer)
- 4.1.3 เครื่องทำน้ำเย็นระบบหมุนเวียน
- 4.1.4 เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator)
- 4.1.5 เตาอบร้อน (hot air oven)
- 4.1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 4.1.7 เครื่อง Gas chromatograph (GC) - Flame ionization detector (FID)

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Conical flask with glass stoppered ขนาด 125 และ 250 ml
- 4.2.2 Condenser
- 4.2.3 Cylinder ขนาด 50 และ 100 ml

- 4.2.4 Flat bottom flask (boiling flask) ขนาด 125 ml
- 4.2.5 Glass funnel และ สำลึบริสุทธิ์หรือ glass wool
- 4.2.6 แท่งกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer bar)
- 4.2.7 Micropipette ขนาด 100-1000 μ l, 5 และ 10 ml
- 4.2.8 Separatory funnel ขนาด 500 ml
- 4.2.9 Volumetric flask ขนาด 10, 100 และ 1000 ml
- 4.2.10 Volumetric pipette ขนาด 5, 10, 25, 50 และ 100 ml

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 สารเคมี

- 5.1.1 Dimethylformamide (DMF)
- 5.1.2 Hexamethyldisilane (HMDS)
- 5.1.3 Trimethylchlorosilane (TMCS)
- 5.1.4 Acetone
- 5.1.5 n-Heptane
- 5.1.6 n-Hexane
- 5.1.7 Toluene
- 5.1.8 Ethanol (absolute)
- 5.1.9 Methanol (anhydrous)
- 5.1.10 Sodium sulfate (anhydrous)
- 5.1.11 Potassium hydroxide (KOH)
- 5.1.12 Hydrofluoric acid (HF 48%)

5.2 การเตรียมสารละลาย

- 5.2.1 10% HMDS: เจือจาง HMDS 50 ml ด้วย toluene ปริมาตรครบ 500 ml
- 5.2.2 95% Ethanol (v/v): เจือจาง Ethanol 950 ml ครบปริมาตร 1 L ด้วย H_2O
- 5.2.3 50% KOH (w/w): ละลาย KOH 50 g ด้วย H_2O 50 g

5.2.4 1 M KOH: ละลาย KOH 56 g ด้วย H_2O ประมาณ 800 ml รอให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรครบ 1 L ด้วย H_2O

5.2.5 0.5 M KOH: เจือจาง KOH 1 M ด้วย H_2O อัตราส่วน 1:1

5.2.6 10% HF: เจือจาง HF 104 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรครบ 500 ml

5.3 สารมาตรฐาน (standards)

5.3.1 Cholesterol

- stock standard solution 2 mg/ml: ชั่ง cholesterol 0.02 g ละลายด้วย DMF ปรับปริมาตรครบ 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ $\leq -15^\circ C$ ได้นาน 3 เดือน

- working standard solution: ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 mg/ml โดยเจือจาง stock standard solution ปริมาตร 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 μl ด้วย DMF ปรับปริมาตรครบ 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ $\leq -15^\circ C$ ได้นาน 1 เดือน

5.3.2 5 α -Cholestane internal standard solution 0.1 mg/ml: ชั่ง 5 α -cholestane 0.01 g ละลายด้วย n-heptane ปรับปริมาตรครบ 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ $\leq -15^\circ C$ ได้นาน 3 เดือน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างอาหาร เครื่องดื่ม ที่เป็นของเหลวเนื้อเดียวกัน คว่ำภาชนะบรรจุกลับปัดกลับผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 ตัวอย่างอาหาร เครื่องดื่ม ที่เป็นของเหลวและมีเนื้ออาหารปน ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.3 ตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง บดปั่นจนละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ขั้นตอนการ saponification

7.1.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนในช่วง 0.5-5 g (ขึ้นอยู่กับปริมาณ cholesterol ในตัวอย่าง) ลงใน conical flask with glass stoppered ขนาด 250 ml ที่มี magnetic stirrer

- 7.1.2 เติม 95%Ethanol 40 ml และ 50% KOH 8 ml ระวังไม่ให้ค้างเกินที่คอขวด
- 7.1.3 นำ flask วางบนเตาไฟฟ้าพร้อมเครื่องกวนแม่เหล็ก ต่อ condenser แล้วเปิดให้ความร้อนพร้อมกวนสารละลาย เมื่อสารละลายเดือดแล้วความแน่นกลับลงมา จึงจับเวลาของการ reflux 70 ± 10 min เมื่อครบเวลา เติม 95% ethanol 60 ml ผ่าน condenser ลงไป กวนสารละลายต่ออีก 15 min จึงถอด condenser ออก แล้วพัก flask ให้หายร้อนและเอาแท่งกวนแม่เหล็กออก

7.2 ขั้นตอนการสกัด (extraction)

- 7.2.1 ปิ่เปิด toluene 100 ml ลงใน flask ปิดจุก แล้วเขย่าประมาณ 30 sec ถ่ายสารละลายลงใน separatory funnel ขนาด 500 ml
- 7.2.2 เติมสารละลาย 1 M KOH ลงไป 110 ml เขย่าอย่างแรงประมาณ 10 sec ปล่อยให้แยกชั้น แล้วไขสารละลายชั้นล่างทิ้งไป
- 7.2.3 เติมสารละลาย 0.5 M KOH ลงไป 40 ml เขย่าเบาๆ แบบหมุนวน ประมาณ 10 sec ปล่อยให้แยกชั้น แล้วไขสารละลายชั้นล่างทิ้งไป
- 7.2.4 ล้างชั้น toluene ด้วยน้ำ 40 ml เขย่าเบาๆ แบบหมุนวน ปล่อยให้แยกชั้น แล้วไขสารละลายชั้นล่างทิ้งไป ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งเขย่าให้แรงขึ้น ถ้าเกิด emulsion ให้เติม 95% ethanol ลงไปเล็กน้อย
- 7.2.5 กรองชั้น toluene ผ่าน Na_2SO_4 anhydrous ประมาณ 20 g ลงใน conical flask with glass stoppered ขนาด 125 ml ที่มี Na_2SO_4 anhydrous ประมาณ 2 g ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 min
- 7.2.6 ปิ่เปิด toluene 25 ml (ปริมาตรขึ้นอยู่กับปริมาณ โคเลสเตอรอล) ลงใน boiling flask ขนาด 125 ml (ระวังไม่ให้ Na_2SO_4 anhydrous ติดมาด้วย) นำไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40°C เติม acetone 3 ml ลงไป แล้วนำไปประเหยแห้งอีกครั้ง
- 7.2.7 ละลาย residue ด้วย DMF 3 ml (สารละลายที่ได้ควรมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของ calibration curve หากทราบว่าตัวอย่างมีปริมาณ cholesterol น้อยให้ละลาย residue ด้วยปริมาตรที่น้อยลง) แล้วนำสารละลายเข้าสู่ขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์ (derivatization)

7.3 ขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์

7.3.1 centrifuge tube with glass stoppered ที่จะใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์จะต้องทำการ silanized tube โดยเติม 10% HF ลงใน tube แช่นานประมาณ 10 นาที กลั้วล้างให้ทั่วด้วย H_2O ตามด้วย MeOH แล้วนำไปให้แห้งด้วย N_2 จากนั้นเติม 10% HMDS ใน toluene ปิดจุกตั้งไว้นานประมาณ 1 hr กลั้วล้างให้ทั่วด้วย toluene ตามด้วย MeOH แล้วอบแห้งใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ $100^\circ C$ ก่อนนำไปใช้งาน (silanized tube อย่างน้อยทุก 6 เดือน ถ้าเป็นการล้างใช้ใหม่ (reuse) ให้ล้างด้วย H_2O , EtOH, n-hexane และ acetone แล้วอบที่อุณหภูมิ $100^\circ C$ หลีกเลี่ยงการล้าง tube ด้วยด่างที่แรง)

7.3.2 การเตรียม calibration curve และตัวอย่าง: ปิเปต working cholesterol standard solution สารมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 mg/ml และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน silanized tube แต่ละหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 7.3.1

7.3.3 ปิเปต 10% HMDS 0.2 ml และ TMCS 0.1 ml ลงในแต่ละหลอด ปิดจุกและเขย่าอย่างแรงประมาณ 30 sec แล้ววางไว้โดยไม่ไปรบกวนนาน 15 min

7.3.4 ปิเปต 5α -cholestane internal standard solution 1 ml และ H_2O 10 ml ลงในแต่ละหลอด ปิดจุกและเขย่าอย่างแรงประมาณ 30 sec นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 2500 rpm นาน 2 min ให้ได้สารละลายใส

7.3.5 ใช้ pasteur pipette ดูดชั้นของสาร n-heptane ซึ่งอยู่ชั้นบนโดยไม่ให้ติดชั้นน้ำ ลงในขวด vial พร้อมปิดฝา ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

สภาวะของเครื่องมือ

Column: fused silica capillary (SAC-5) 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness

Carrier gas: helium, flow rate 2 ml/min

Split/splitless: split mode

Oven temperature: $255^\circ C$ (isothermal)

Injector temperature: $300^\circ C$

Detector temperature: $300^\circ C$

Injection volume: 1, 2 μl

Runtime: 21 min

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

plot กราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่าง response ratio (cholesterol peak area / internal standard peak area) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 mg/ml) ค่า response ratio ของสารละลายตัวอย่างควรจะอยู่ในช่วง response ratio ของสารมาตรฐาน

คำนวณ

$$g \text{ Test portion/ ml derivatized} = (W_1/V_1) \times (V_2/V_3)$$

และ

$$\text{Cholesterol (mg/100 g)} = (C \times 100) / W$$

เมื่อ

$$W_1 = \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}$$

$$V_1 = \text{ปริมาตรของ toluene ที่ใช้ในการสกัด (100 ml)}$$

$$V_2 = \text{ปริมาตรของสารละลายที่ pipette มาวิเคราะห์ (25 ml)}$$

$$V_3 = \text{ปริมาตรของ DMF ที่ใช้ในการละลาย residue (3 ml)}$$

$$C = \text{ความเข้มข้นของ Cholesterol ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/ml)}$$

$$W = g \text{ Test portion/ ml derivatized}$$

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณโคเลสเตอรอลเป็นเลขจำนวนเต็มในหน่วย mg/100 g

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของ standard curve ≥ 0.998

9.2 วิเคราะห์ QC sample ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง กำหนดค่าเบี่ยงเบน $\pm 2SD$

10. รายละเอียดอื่น

ข้อมูล Interlaboratory study ปรากฏในตาราง

Table 994.10 Interlaboratory study results for determination of cholesterol in foods by direct saponification methods

Sample	Mean rec., mg/100 g	s_r , mg/100 g	s_R , mg/100 g	RSD_r , %	RSD_R , %	R^a , mg/100 g	R^b , mg/100 g
Butter cookies	28.1	0.75	0.83	2.69	2.95	2.11	2.32
Vegetable bacon baby food	3.71	0.36	0.47	9.60	12.6	1.00	1.31
Vegetable chicken baby food	4.69	0.32	1.00	6.82	21.3	0.89	2.79
Skinless wieners	76.7	2.79	5.98	3.63	7.80	7.80	16.8
NIST egg powder (SRM No. 1845) ^c	1965	60.0	82.1	3.05	4.18	168	230
Commercial powdered eggs	1195	65.7	66.6	5.50	5.57	184	188
Cheeze Whiz ^b	66.9	1.61	3.78	2.40	5.64	5.40	10.6

^a $r = 2.8 \times S_r$

^b $R = 2.8 \times S_R$

^c NIST certified value at 1900 ± 20 mg/100 g

DMSc F 1071: การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในเครื่องดื่ม โดย HPLC

Determination of caffeine in beverage by HPLC

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในเครื่องดื่ม ชา กาแฟ และโกโก้

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 AOAC Official Method 980.14 Theobromine and Caffeine in Cacao Products
- 2.2 Ashoor S H, Seperich G J, Monte W C, Welty J. High performance liquid chromatographic determination of caffeine in decaffeinated coffee, tea and beverage product. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983; 66(3): 606-608.
- 2.3 Terada H, Sakabe Y. High performance liquid chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products. J. Chromatograph. 1984; 291: 453-459.

3. หลักการ (Principle)

กาเฟอีนสามารถถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วยน้ำร้อน นำไปวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี HPLC- UV detector

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง HPLC- UV detector
- 4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.1.3 Water bath

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Cylinder ขนาด 500 ml
- 4.2.2 Erlenmayer flask ขนาด 250 ml
- 4.2.3 Micropipette ขนาด 20-200 μ l และ 100-1000 μ l
- 4.2.4 Volumetric flask ขนาด 10, 100, 200, 250 และ 500 ml
- 4.2.5 กระดาษกรอง No. 1

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 สารเคมี

- 5.1.1 Methanol (MeOH), HPLC grade
- 5.1.2 Glacial acetic acid
- 5.1.3 Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate
- 5.1.4 Zinc sulfate heptahydrate

5.2 การเตรียมสารละลาย

- 5.2.1 Carrez I: ละลาย potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate 3.6 g ใน H_2O ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O
- 5.2.2 Carrez II: ละลาย zinc sulfate heptahydrate 7.2 g ใน H_2O ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

- 5.3.1 สารมาตรฐาน กาเฟอีน ความบริสุทธิ์ $\geq 99.5\%$
- 5.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - 5.3.2.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 500 $\mu g/ml$: ชั่งสารมาตรฐาน 0.0250 g ละลายด้วยน้ำร้อน ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 50 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C อายุการเก็บ 6 เดือน
 - 5.3.2.2 Working standard solution ความเข้มข้น 2, 10, 30, 50 และ 100 $\mu g/ml$: ปิ่เปิด stock standard solution ปริมาตร 0.04, 0.2, 0.6, 1.0 และ 2.0 ml แยกใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O เตรียมใหม่ทุกครั้ง

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 เครื่องคั้นผง

- 6.1.1 สุ่มตัวอย่างให้ได้ 100-200 g บดตัวอย่างให้ละเอียดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดอาหาร
- 6.1.2 เครื่องคั้นผงชนิดที่ไม่ละลายน้ำ หลังจากบดละเอียดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้แรงผ่าน sieve โดย ชาและกาแฟคั่วบด ผ่าน sieve No. 30 กาแฟดิบ (green coffee) เตรียมผ่าน sieve No. 40

6.2 เครื่องคั้นชนิดเหลว เช้าตัวอย่างให้ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน สุ่มตัวอย่างให้ได้ 200-500 ml ถ้าตัวอย่างมีแก๊ส ต้อง degas ก่อนนำไปวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 เครื่องคั้นผง

- 7.1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5-5.0 g ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 0.0001 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ถ่ายใส่ Erlenmeyer flask เติมน้ำร้อน 100 ml ตั้งบน steam bath นาน 30 min และเขย่าทุก 5 min ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 200 ml
- 7.1.2 เคี้ยวสารละลาย Carrez I และ Carrez II ชนิดละ 1-2 ml เขย่าทุกครั้งที่เติม แล้วปรับปริมาตรด้วย H₂O ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน กรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 และ membrane filter ชนิด cellulose acetate ขนาด 0.45 μ m, diam 13 mm ตามลำดับ
- 7.1.3 จี๊ดสารละลายตัวอย่าง เข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

7.2 เครื่องคั้นชนิดเหลว

- 7.2.1 ปิเปตตัวอย่าง 10 ml หรือในปริมาณที่เหมาะสม (บันทึกปริมาณที่แน่นอน) ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml เติม H₂O ประมาณ 40 ml เขย่าให้เข้ากัน วิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน 7.1.2

7.3 การหาปริมาณด้วยเครื่องมือ HPLC-UV detector

analytical column: Hypersil Gold C₁₈ (4.6 mm x 250 mm, 5 μ m) หรือเทียบเท่า
mobile phase: H₂O:MeOH:acetic acid (80:19:1)
flow rate: 1.0 ml/min
detector: UV 276 nm
injection volume: 20 μ l

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 เครื่องดื่มผง

$$\text{ปริมาณกาเฟอีน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{C \times D}{W \times 10^4}$$

8.2 เครื่องดื่มชนิดเหลว

$$\text{ปริมาณกาเฟอีน (mg/100 ml)} = \frac{C \times D \times 100}{V \times 10^3}$$

เมื่อ

C คือ ปริมาณกาเฟอีนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)

D คือ dilution volume (ml)

V คือ ปริมาตรตัวอย่าง (ml)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

8.3 การรายงานผล ปริมาณกาเฟอีน หน่วยเป็นร้อยละ โดยน้ำหนัก หรือ มิลลิกรัมต่อ 100 ml หรือ มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ โดยมีเลขนัยสำคัญ 3 ตัว

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ก่อนการใช้งานทุกครั้ง จัดสารมาตรฐาน 1 ระดับความเข้มข้น จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณ

% RSD ของ retention time (RT) และ peak area โดยเกณฑ์ยอมรับของ %RSD

(RT) $\leq 1\%$ และ %RSD (peak area) ≤ 2.5

9.2 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดย R^2 ต้องมากกว่า 0.995

9.3 วิเคราะห์ duplicate sample ทุก 10 ตัวอย่าง โดย % RPD $\leq 5\%$

10. รายละเอียดอื่น

วิธีนี้ค่า Limit of detection (LOD) และค่า Limit of quantitation (LOQ) ดังนี้

ชนิดตัวอย่าง	LOD	LOQ
เครื่องดื่มชนิดเหลว	1 mg/100 ml	5 mg/100 ml
เครื่องดื่มชนิดผง	0.01 g/100 g	0.05 g/100 g

DMSc F 1072: การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหารโดย HPLC

Determination of benzoic acid and sorbic acid in food by HPLC

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหารและเครื่องดื่ม

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 Matissek R, Schnepel FM, Steiner G. Bestimmung von Konservierungsstoffen in fettarmen Lebensmitteln mittels HPLC. Lebensmittel-analytik. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1989. p. 274 -7.
- 2.2 วันทนี ชำเลิศ. การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และซัคคาริน ในผลไม้แปรรูป. ว. กรมวิทย์ พ 2535; 34(1): 31-6.

3. หลักการ (Principle)

กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกถูกสกัดออกจากอาหารด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol และ acetate buffer แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC - UV detector

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง HPLC – UV detector
- 4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.1.3 เครื่อง pH meter
- 4.1.4 เครื่อง ultrasonic bath

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Beaker ขนาด 50, 100 และ 1,000 ml
- 4.2.2 Cylinder ขนาด 500 ml
- 4.2.3 Glass funnel และ กระดาษกรอง Whatman No.1 หรือเทียบเท่า
- 4.2.4 Pipette ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ml
- 4.2.5 Volumetric flask ขนาด 50, 100 และ 1,000 ml
- 4.2.6 Wide neck conical flask ขนาด 150 ml

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 สารเคมี

- 5.1.1 Methanol (MeOH), HPLC grade
- 5.1.2 Glacial acetic acid
- 5.1.3 Ammonium acetate (pH 4.5-4.6), 0.01 M
- 5.1.4 Potassium ferrocyanide
- 5.1.5 Zinc acetate

5.2 การเตรียมสารละลาย

- 5.2.1 Carrez I: ละลาย potassium ferrocyanide 75 g ใน H_2O ถ้วยใส่ volumetric flask ขนาด 500 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O
- 5.2.2 Carrez II: ละลาย zinc acetate 115 g ใน H_2O ถ้วยใส่ volumetric flask ขนาด 500 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O
- 5.2.3 0.01 M ammonium acetate: ละลาย ammonium acetate 0.7708 g ใน H_2O ถ้วยใส่ volumetric flask ขนาด 1 L แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O ถ้วยสารละลายที่ได้ลงใน beaker ขนาด 1 L ปรับ pH ให้ได้ 4.5-4.6 ด้วย Glacial acetic acid
- 5.2.4 Extracting solution - 0.01M ammonium acetate:MeOH (60:40)

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

- 5.3.1 กรดเบนโซอิก ความบริสุทธิ์มากกว่า 99 %
- 5.3.2 กรดซอร์บิก ความบริสุทธิ์มากกว่า 98 %

5.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- 5.4.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$: ชั่งสารมาตรฐานกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก ชนิดละประมาณ 0.10 g บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ละลายด้วย MeOH เล็กน้อย ผสมรวมกันใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วย extracting solution เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ ไม่เกิน 5 วัน

5.4.2 Working standard solution ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 50 $\mu\text{g/ml}$: ปิเปต stock standard solution ปริมาตร 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วย extracting solution

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 อาหารที่มีลักษณะเป็นของแข็ง: สับและบดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วผสมตัวอย่างจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2 อาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว: เขย่าตัวอย่างจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

- 7.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 g ลงใน beaker (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน)
- 7.2 ตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง: เติม extracting solution 20 ml ถ้ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ล้าง beaker ด้วย extracting solution ถ้ายใส่ volumetric flask ขนาดเดิม เขย่าด้วยเครื่องเขย่า หรือ ultrasonic bath ประมาณ 10 min
- 7.3 ตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลวหรือ เครื่องดื่ม: ถ้ายใส่ volumetric flask ขนาด 50 ml เติม extracting solution 20 ml ล้าง beaker ด้วย extracting solution ถ้ายใส่ volumetric flask ขนาดเดิม เขย่าด้วยเครื่องเขย่า หรือ ultrasonic bath ประมาณ 10 min
- 7.4 เติมสารละลาย Carrez I และ Carrez II ชนิดละ 1 ml ตามลำดับ (เขย่าทุกครั้งที่เติม)
- 7.5 ปรับปริมาตรให้ครบด้วย extracting solution เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 min
- 7.6 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำไปกรองผ่าน syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.45 μm
- 7.7 การตรวจวัดด้วย HPLC-UV detector
column: Hypersil C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm) หรือเทียบเท่า
detector: UV detector 235 nm
injection volume: 20 μl
mobile phase: 0.01 M ammonium acetate:MeOH (60:40)
flow rate: 1.2 ml/min

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

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

เมื่อ C = ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

V = dilution volume (ml)

8.2 การรายงานผล (Test report)

รายงานผลปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) โดยมีเลขนัยสำคัญ 3 ตัว

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ก่อนการใช้งานทุกครั้ง จัดสารมาตรฐาน 1 ระดับความเข้มข้น จำนวน 5 จ้ำ ทำนวม % RSD ของ retention time (RT) และ peak area โดยเกณฑ์ยอมรับของ %RSD (RT) $\leq 1\%$ และ %RSD (peak area) ≤ 2.5

9.2 เตรียมกราฟมาตรฐานก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดย R^2 ต้องมากกว่า 0.995

9.3 วิเคราะห์ duplicate sample ทุก 10 ตัวอย่าง โดย % RPD $\leq 5\%$

10. รายละเอียดอื่น

วิธีมีค่า Limit of detection (LOD) เท่ากับ 5.0 mg/kg และ Limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 20.0 mg/kg

DMSc F 1073: การวิเคราะห์ออฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในนม โดย HPLC

Determination of aflatoxin M₁ in milk by HPLC

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ aflatoxin M₁ ในนม ด้วยเครื่อง HPLC – Fluorescence detector โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.008 µg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.01 µg/kg

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 2000.08 Aflatoxin M₁ in liquid milk; Immunoaffinity Column by Liquid Chromatography

3. หลักการ (Principle)

aflatoxin M₁ ในตัวอย่างถูกสกัดโดยผ่าน immunoaffinity column ที่มี antibody ที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงในการจับสาร aflatoxin M₁ ส่วนตัวรบกวนอื่นๆออกด้วยน้ำ แล้วชะ aflatoxin M₁ จากคอลัมน์ด้วย acetonitrile จากนั้นนำไปให้แห้งระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน และนำมาละลายด้วยสารละลายผสม 25 % acetonitrile ได้ปริมาณความเข้มข้นของ aflatoxin M₁ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ fluorescence detector ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm และ emission 435 nm

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 HPLC-Fluorescence detector
- 4.1.2 UV-VIS spectrophotometer
- 4.1.3 เครื่องชั่งอ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g
- 4.1.4 อ่างน้ำร้อน (Water bath) แบบควบคุมอุณหภูมิได้
- 4.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- 4.1.6 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 4.1.7 Vacuum manifold
- 4.1.8 Vacuum pump

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Affinity column: Afla M1 test (VICAM)
- 4.2.2 Beaker ขนาด 50, 100 และ 250 ml
- 4.2.3 Cylinder ขนาด 100 ml
- 4.2.4 Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 ml
- 4.2.5 Glass funnel และกระดาษกรองเบอร์ 4
- 4.2.6 Glass syringe luer lock
- 4.2.7 Syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.45 μm
- 4.2.8 Vial ขนาด 1 และ 5 ml
- 4.2.9 Volumetric flask ขนาด 5, 10, 100 ml

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 Acetonitrile (CH_3CN), HPLC grade

5.2 วิธีเตรียมสารละลาย

- 5.2.1 10 % CH_3CN : เตรียมโดยผสม CH_3CN ปริมาตร 10 ml และ H_2O ปริมาตร 90 ml เขย่าให้เข้ากัน
- 5.2.2 25 % CH_3CN : เตรียมโดยผสม CH_3CN ปริมาตร 25 ml และ H_2O ปริมาตร 75 ml เขย่าให้เข้ากัน

5.3 สารมาตรฐาน (Standards): aflatoxin M_1

- 5.3.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$: ละลายสารมาตรฐาน aflatoxin M_1 50 μg ด้วย CH_3CN ใน volumetric flask ขนาด 50 ml และปรับให้ครบปริมาตร นำสารละลายมาตรฐานไปวัดค่า absorbance ที่ช่วงความยาวคลื่น 330 – 370 nm ใช้ค่า maximum absorbance ที่ความยาวคลื่นใกล้ 365 nm คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจากสมการ

$$\text{aflatoxin } M_1 (\mu\text{g/ml}) = \frac{100AM}{\epsilon}$$

เมื่อ A = ค่า maximum absorbance ที่ความยาวคลื่นใกล้ 365 nm

M = มวลโมเลกุล (328 g/mol)

ϵ = absorptivity coefficient in CH_3CN ($1985 \text{ m}^2/\text{mol}$)

- 5.3.2 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น $0.1 \mu\text{g/ml}$: ปิเปตสารละลายปริมาตร ขึ้นกับความเข้มข้นที่แน่นอนจากการคำนวณ ลงใน volumetric flask ขนาด 5 ml นำไประเหยให้แห้ง ปริมาตรด้วย CH_3CN เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 4°C (มีอายุการใช้งาน 1 เดือน)
- 5.3.3 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น $0.01 \mu\text{g/ml}$: ปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้น $0.1 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย 25 % CH_3CN (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- 5.3.4 สารละลายมาตรฐานเพื่อสร้าง calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 ng/ml : ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น $0.01 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 50, 250, 500, 1000 และ 2500 μL ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 5 ml ปรับปริมาตรด้วย 25 % CH_3CN (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สูบตัวอย่างนม มาประมาณ 2-3 หน่วย เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด ให้ได้ปริมาตรรวม ประมาณ 200-300 ml คนหรือกวนหรือเทกลับไปมาให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด (extraction)

- 7.1.1 อุ่นตัวอย่างนมใน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 37°C ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- 7.1.2 ถ่ายตัวอย่างนมลงในขวด centrifuge ขนาด 250 ml นำไป centrifuge ใช้ความเร็วที่ $2,000 \times g$ เป็นเวลา 15 min ทิ้งส่วนชั้นไขมัน

7.1.3 นำตัวอย่างส่วนที่เป็นของเหลวไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ให้ได้อย่างน้อย 50 ml

7.1.4 ชั่งตัวอย่างที่กรองได้ 50 ± 0.01 g นำไปผ่าน immunoaffinity column ให้ตัวอย่างผ่าน column ด้วย flow rate ประมาณ 2-3 ml/min แล้วล้าง immunoaffinity column ด้วย H_2O 20 ml แล้วทำ immunoaffinity column ให้แห้งโดยใช้ vacuum pump

7.1.5 สะสารออฟลาทอกซิน M_1 โดยผ่าน CH_3CN ปริมาตร 4 ml ลงใน vial ขนาด 5 ml นำไปประเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำไปเติมสารละลายผสม 25% CH_3CN ปริมาตร 1 ml ผสมด้วย vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วยตัวกรองชนิด nylon ขนาด $0.45 \mu m$ นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

7.2 การหาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะเครื่องมือ (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

analytical column: C_{18} $5 \mu m$, 250×4.6 mm id

mobile phase: $CH_3CN - H_2O$ (25+75)

flow rate: 1 ml/min

injection volume: 50 μl

detector: Fluorescence, Ex 365 nm, Em 435 nm

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของ อฟลาทอกซิน } M_1 (\mu g/kg) = \frac{C \times I}{W}$$

โดย C = ความเข้มข้น ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/ml)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

8.2 การรายงานผล

8.2.1 รายงานปริมาณที่ตรวจพบของออฟลาทอกซิน M_1 (Aflatoxin M_1) มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu g/kg$) ทศนิยม 3 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 ทดสอบประสิทธิภาพของ Immunoaffinity column ก่อนใช้งานทุก Lot โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น $0.1 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ละลายด้วย H_2O ปริมาตร 50 ml นำมาผ่าน immunoaffinity column แล้วทำการทดสอบเช่นเดียวกับตัวอย่าง คำนวณค่า % recovery ต้องไม่น้อยกว่า 80 %
- 9.2 ทุกการวิเคราะห์ สร้างกราฟมาตรฐานอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น โดยค่า R^2 มากกว่าหรือเท่ากับ 0.995
- 9.3 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกตัวอย่าง กรณีตรวจพบให้คำนวณ % RPD (เกณฑ์ยอมรับ 20 %)
- 9.3 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น $0.05 \mu\text{g/kg}$ เพื่อประเมิน % recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ (เกณฑ์ยอมรับ 60-115 %)

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 Accuracy และ Precision ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน aflatoxin M_1 ที่ระดับความเข้มข้น $0.01 \mu\text{g/kg}$ ลงในตัวอย่างนม (ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ)

สารมาตรฐาน	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	% Recovery		% RSD
		ค่าต่ำสุด – ค่าสูงสุด	Mean $\pm$ SD	
aflatoxin M_1	0.01	77 - 89	85 ± 4.2	4.9
	0.05	89 - 97	93 ± 2.7	2.9
	0.10	86 - 92	89 ± 2.8	3.1

DMSc F 1074: การวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ในอาหารโดย LC/MS-MS

Determination of acrylamide in food by LC-MS/MS

1. ขอบข่าย (Scope)

เพื่ออธิบายวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ (acrylamide, AA) ในอาหารจำพวกพืชที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนต่างๆ เช่น ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ มันฝรั่งและผลิตภัณฑ์ ขนมปัง และกาแฟ เป็นต้น โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.02 mg/kg และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.04 mg/kg

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 Gökmen V and Senyuva H Z. A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. J. Chromatogr. A. 1120 (2006); 194-198.
- 2.2 Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical method and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities 2002.

3. หลักการ (Principle)

สารอะคริลาไมด์ (acrylamide, AA) จัดเป็นสารก่อมะเร็ง (probable human carcinogen) การวิเคราะห์ AA จากอาหาร (โดยเฉพาะอาหารที่มีปริมาณแป้งมาก) ด้วยสารละลายผสม 70% MeOH-H₂O แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลาย Carrez I และ Carrez II กำจัดชั้น MeOH ออกจากสารละลายตัวอย่างโดยการระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วเก็บในชั้น H₂O นำมาวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์ด้วยเครื่องมือ liquid chromatograph - tandem mass spectrometer (LC/MS-MS)

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง LC/MS-MS
- 4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g
- 4.1.3 Centrifuge สามารถทำความเร็วได้ 3,500 rpm
- 4.1.4 Shaker
- 4.1.5 Vortex mixer
- 4.1.6 Zymark TurboVap[®]



4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 HPLC vial สีชา ขนาด 2 ml
- 4.2.2 nylon syringe filter ขนาด od 13 mm, 0.45 μ m
- 4.2.3 nylon membrane filter ขนาด od 47 mm, 0.45 μ m
- 4.2.4 Oasis MCX 3 cc (60 mg) extraction cartridges (Waters Corp., Part No. 186000254) หรือเทียบเท่า
- 4.2.5 Volumetric flask ขนาด 5, 25 และ 50 ml
- 4.2.6 Plastic syringe ขนาด 1 ml
- 4.2.7 Screw cap centrifuge tube ขนาด 4 และ 50 ml

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า Resistivity ≥ 18 m Ω /cm
 - 5.1.1 Methanol, MeOH (HPLC grade หรือเทียบเท่า)
 - 5.1.2 Acetic acid, CH_3COOH
 - 5.1.3 Potassium hexacyanoferrate, $K_3Fe(CN)_6$
 - 5.1.4 Zinc sulfate, $ZnSO_4$
- 5.2 วิธีเตรียมสารละลาย
 - 5.2.1 Carrez I: ชั่ง $K_3Fe(CN)_6$ 15 g ละลายด้วย H_2O ปริมาตร 100 ml
 - 5.2.2 Carrez II: ชั่ง $ZnSO_4$ 30 g ละลายด้วยละลายด้วย H_2O ปริมาตร 100 ml
 - 5.2.3 70 % MeOH/ H_2O : ตวง MeOH ปริมาตร 70 ml ผสมลงใน H_2O 30 ml
 - 5.2.4 0.1% CH_3COOH (mobile phase): ปิเปต CH_3COOH ปริมาตร 1 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1 L
- 5.3 สารมาตรฐาน
 - 5.3.1 acrylamide (C_3H_5NO) ผลิตภัณฑ์ของ SIGMA-ALDRICH ความบริสุทธิ์ 99.0%
 - 5.3.2 2d_5 -acrylamide (C_3D_5NO) ผลิตภัณฑ์ของ SIGMA-ALDRICH ใช้เป็น internal standard (IS)

5.4 การเตรียมสารมาตรฐาน

- 5.4.1 acrylamide stock standard solution ความเข้มข้น 500 µg/ml: ชั่งสารมาตรฐาน 25 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย H₂O เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 °C อายุการใช้งาน 1 ปี
- 5.4.2 acrylamide working standard solution ความเข้มข้น 10 µg/ml: ปิเปิด stock standard solution ความเข้มข้น 500 µg/ml ปริมาตร 100 µl ลงใน volumetric flask ขนาด 5 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย H₂O (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
- 5.4.3 ²d₃-acrylamide stock internal standard solution ความเข้มข้น 500 µg/ml: ชั่งสารมาตรฐาน ²d₃-acrylamide 25 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย H₂O (²d₃-acrylamide เปลี่ยนเป็น ²d₃-acrylamide อย่างรวดเร็วเมื่อละลายน้ำ) เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 °C อายุการใช้งาน 1 ปี
- 5.4.4 ²d₃-acrylamide working internal standard solution ความเข้มข้น 10 µg/ml: ปิเปิด stock internal standard solution ความเข้มข้น 500 µg/ml ปริมาตร 100 µl ลงใน volumetric flask ขนาด 5 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย H₂O (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 อาหารที่มีลักษณะเป็นของแข็ง บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2 อาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด คนหรือกวนจนตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

- 7.1 ชั่งตัวอย่าง 1 g ด้วยเครื่องชั่งละเอียด ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 4 ml บันทึกรหัสที่แน่นอน (blank ใช้ H₂O แทนตัวอย่าง)
- 7.2 ปิเปิด ²d₃-acrylamide (internal standard) ความเข้มข้น 10 µg/ml ปริมาตร 40 µl ลงในตัวอย่าง
- 7.3 ปิเปิด 70 % MeOH/H₂O ปริมาตร 10 ml ลงในตัวอย่าง ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min

- 7.4 เติมน Carrez I ปริมาตร 100 μ l เขย่าด้วยมือ และ เติมน Carrez II ปริมาตร 100 μ l เขย่าด้วยมืออีกครั้ง เพื่อช่วยตกตะกอนโปรตีน นำไปเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 30 min
- 7.5 นำมาปั่นแยกด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 30 min (หรือจนได้สารละลายส่วนใส)
- 7.6 ปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใสปริมาตร 700 μ l ลงใน centrifuge tube ลดปริมาตรด้วยเครื่อง Zymark TurboVap[®] ที่อุณหภูมิห้อง ความดันประมาณ 3 psi ทันทีที่แห้ง ให้เติมน H_2O 700 μ l ปิดฝาและปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min กรองสารละลายที่ได้ผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.45 μ m ไมครอน ลงใน vial สีชา ขนาด 2 ml และตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS
- 7.7 กรณีตัวอย่างที่สกัดและตรวจวัดด้วย LC-MS/MS แล้ว พบว่ามีสัญญาณรบกวน (ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นกับ matrix มันฝรั่งและผลิตภัณฑ์) ให้เพิ่มขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวนด้วย SPE Oasis MCX 3 cc (60 mg) extraction cartridge หรือเทียบเท่า โดยต้องปรับสภาพ SPE ด้วย MeOH ปริมาตร 2 ml และ H_2O ปริมาตร 2 ml ปิเปตสารละลายตัวอย่างส่วนที่ใส (ข้อ 7.5) ปริมาตร 2 ml ผ่าน Oasis MCX ทั้ง eluate ประมาณ 5 หยดแรก จากนั้นเก็บ eluate แล้วทำตามขั้นตอน ข้อ 7.6
- 7.8 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, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน acrylamide ความเข้มข้น 10 μ g/ml ปริมาตร 0, 5, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 μ l ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ตามลำดับ และปิเปต internal standard d_3 -acrylamide ความเข้มข้น 10 μ g/ml ปริมาตร 100 μ l ลงใน volumetric flask ทุกขวด และปรับปริมาตรด้วย H_2O (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

7.9 การหาปริมาณด้วยเครื่องมือ LC/MS-MS

7.9.1 สภาวะเครื่องมือ LC

analytical column: Luna Su C18 (250 mm × 2 mm × 5 μm)

mobile phase: 0.1% CH₃COOH/MeOH (97:3) isocratic

flow rate: 0.25 ml/min

column temperature: 30 °C

injection volume: 20 μl

7.9.2 สภาวะเครื่องมือ MS

ionization mode: ESI (turbo spary) positive

scan type: MRM

ion spray voltage 5500 eV

temperature 450 °C

collision gas: nitrogen 6 psig

curtain gas: 20 psig

ion spray nebulizer gas (GS-1) 50 psig

TIS heater gas 2 (GS-2) 50 psig

entrance potential (EP) 10 eV

MS/MS fragmentation condition

^a product ion m/z 55 ใช้ในการคำนวณ (quantification)

^b product ion m/z 44 และ 72 ใช้ในการยืนยัน (confirmation)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่สารตรวจพบจาก calibration curve

$$\text{ปริมาณ acrylamide, } C_A \text{ (mg/kg)} = \frac{(Y-b)}{a} \times C_{IS}$$

เมื่อ dilution factor เท่ากับ 10

8.2 รายงานปริมาณ acrylamide ที่พบในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 เตรียม calibration curve ใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ 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 ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์
- 9.3 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 5 % ของตัวอย่าง จำนวน % RPD (เกณฑ์ยอมรับ 20 %)
- 9.4 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 5 % ของตัวอย่าง จำนวน % recovery (เกณฑ์ยอมรับ 70-120 %)
- 9.5 ยืนยันผลการตรวจพบ acrylamide ด้วย ion intensity ratio โดยเปรียบเทียบค่า ion ratio ของ acrylamide ที่พบในตัวอย่าง กับ ion ratio เฉลี่ยของสารมาตรฐานทุกระดับ ความเข้มข้นใน 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

วิธีมีค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ดังนี้

ชนิดตัวอย่าง	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
ข้าว ข้าวโพด	0.008	0.02
มันฝรั่ง กาแฟ	0.007	0.02
ขนมปัง	0.006	0.02
กล้วย	0.001	0.02
ถั่ว	0.014	0.04

DMSc F 1075: การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้:

กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์

Determination of pesticide residues in vegetables and fruits:

Organochlorines, Organophosphorus and Synthetic pyrethroids

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้โดยวิธี modified QuEChERS ครอบคลุม สารเคมีฯ ดังนี้

- กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorines; OCs) จำนวน 21 สาร: aldrin, α -BHC, γ -BHC, cis-chlordane, trans-chlordane, oxy-chlordane, chlorothalonil, p,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'-TDE, dicofol, dieldrin, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate, endrin, heptachlor, trans-heptachlor epoxide, hexachlorobenzene, methoxychlor และ tetradifon
- กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (Organophosphorus; OPs) จำนวน 24 สาร: acephate, azinphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, fenitrothion, malathion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, parathion-methyl, phosalone, pirimiphos-methyl, profenofos, propargite, prothiophos, และ triazophos
- กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Synthetic pyrethroids; SPs) จำนวน 8 สาร: bifenthrin, cyfluthrin, λ -cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate และ permethrin

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
- 2.2 CAC/GL 41-1993 (Amendment 2010) Portion of commodities to which maximum residue limits applied and which is analyzed.
- 2.3 กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สามเจริญพาณิชย์; 2545.

3. หลักการ (Principle)

วิธี QuEChERS เป็นวิธีวิเคราะห์สารตกค้างจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบ multi-residues method โดยตัวอย่างจะถูกนำมาสกัดด้วย acetonitrile (CH_3CN) แล้วนำมาขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วยเทคนิค dispersive-SPE ด้วย primary secondary amine (PSA) ผสมกับ magnesium sulfate (MgSO_4) และ graphite carbon black (GCB) สารสกัดที่ได้จะถูกระเหยลดปริมาณแล้วฉีดเข้าเครื่องมือ ทำการวิเคราะห์สารกลุ่ม Organochlorines (OCs) และกลุ่ม Synthetic pyrethroids (SPs) โดยเครื่องมือ Gas Chromatograph – Electron Capture Detector (GC-ECD) และตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม Organophosphorus (OPs) โดยเครื่องมือ Gas Chromatograph – Flame Photometric Detector (GC-FPD)

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง GC-ECD

4.1.2 เครื่อง GC-FPD

4.1.3 เครื่องชั่ง อ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.1.4 เครื่องปั่นตกตะกอน (Centrifuge) ความเร็วรอบ 3,500-4,000 rpm

4.1.5 ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ

4.1.6 เครื่องระเหยสารละลาย แบบ heating box และใช้แก๊สไนโตรเจนในการระเหยสารสกัด

4.1.7 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (Vortex mixer)

4.1.8 ตู้อบร้อน (Hot air oven)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Amber vial ขนาด 4 ml

4.2.2 Centrifuge tube ขนาด 50 ml และ 15 ml

4.2.3 Chromatographic column: 11 mm id $\times$ 300 mm, Teflon stopcock, coarse porosity fritted disc

4.2.4 Graduated tube ขนาด 10 ml

4.2.5 Micropipette ขนาด 2-20 μ l, 20-200 μ l และ 100-1,000 μ l

4.2.6 Round-bottomed flask ขนาด 250 ml

4.2.7 Pasteur pipette

4.2.8 Volumetric flask ขนาด 250 ml

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 Acetonitrile (CH_3CN) Pesticide Reagent Grade

5.2 Dichloromethane (CH_2Cl_2) HPLC Grade

5.3 Glacial acetic acid (CH_3COOH)

5.4 n-hexane Pesticide Reagent Grade

5.5 Ethyl acetate

5.6 Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$)

5.7 Sodium acetate ($NaOAc$)

5.8 Sodium sulfate (Na_2SO_4)

5.9 $MgSO_4$ 150 mg + primary secondary amine (PSA) 50 mg + graphite carbon black (GCB) 50 mg

5.10 $MgSO_4$ 150 mg + primary secondary amine (PSA) 50 mg + graphite carbon black (GCB) 50 mg + C18 EC 50 mg

5.11 CH_3CN + 1 % CH_3COOH : ตวง CH_3CN ประมาณ 200 ml เติม CH_3COOH ปริมาตร 2.5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย CH_3COOH จนครบ 250 ml ใน volumetric flask

5.12 CH_2Cl_2 + CH_3CN + n-hexane (50%+0.35%+49.65%) ปริมาตร 50 ml

5.13 สารมาตรฐาน (Standards)

5.13.1 Organochlorine compounds (OCs) จำนวน 21 สาร

Stock standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด เตรียมที่ความเข้มข้นประมาณ 200 $\mu g/ml$ ใน n-hexane แล้วนำมาผสมเป็น Intermediate

standard solution ที่เป็นสารละลายผสมของสารมาตรฐานทั้ง 21 ชนิด ใน n-hexane ความเข้มข้น 10 µg/ml และนำมาเจือจางเตรียมเป็น Working standard solution ในช่วงความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.25 และ 1.0 µg/ml ใน n-hexane โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq 10^{\circ}\text{C}$

5.13.2 Organophosphorus compounds (OPs) จำนวน 24 สาร

Stock standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด เตรียมที่ความเข้มข้น ประมาณ 200 µg/ml ใน acetone แล้วนำมาผสมเป็น Intermediate standard solution ที่เป็นสารละลายผสมของสารมาตรฐานทั้ง 24 ชนิด ใน acetone ความเข้มข้น 10 µg/ml และนำมาเจือจางเตรียมเป็น Working standard solution ในช่วงความเข้มข้น 0.05, 0.2, 0.8 และ 2 µg/ml ใน matrix extract (คือสารสกัดตัวอย่างจากผักที่ตรวจไม่พบสาร organophosphorus compounds) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq 10^{\circ}\text{C}$

5.13.3 Synthetic pyrethroids (SPs) จำนวน 8 สาร

Stock standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดความเข้มข้นประมาณ 200 µg/ml ใน n-hexane แล้วนำมาผสมเป็น Intermediate standard solution ที่เป็นสารละลายผสมของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด ใน n-hexane ความเข้มข้น 10 µg/ml และนำมาเจือจางเตรียมเป็น Working solution ในช่วงความเข้มข้น 0.05, 0.2, 0.8 และ 2 µg/ml ใน n-hexane โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq 10^{\circ}\text{C}$

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 นำตัวอย่าง ผักสด ผลไม้สด อย่างน้อย 1 kg สุ่มเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ส่วนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ของตัวอย่างแต่ละชนิด อ้างอิงตาม CAC/GL 41-1993 (Amendment 2010) นำมาหั่น บดปั่นด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมและสะอาด ตัวอย่างที่บดปั่นแล้ว ต้องมีความละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด

6.2 สุ่มตัวอย่างที่บดปั่นแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อใช้เป็น analytical portion และแบ่งเก็บเป็น reserved portion เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -15^{\circ}\text{C}$ เมื่อไม่ได้วิเคราะห์ทันที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด (extraction)

7.1.1 ผักผลไม้ที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง: ชั่งตัวอย่าง น้ำหนัก 10.0 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile + 1% acetic acid 10 ml เขย่าอย่างแรง 1 min เติม $MgSO_4$ 4 g และ NaOAc 1 g แล้วเขย่า 1 min นำไปปั่นตกตะกอน (centrifuge) ด้วยความเร็วประมาณ 3,500-4,000 rpm นาน 5 min แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ 5 ml ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml แล้วนำไป clean up โดยการเติม $MgSO_4$ +PSA+GCB (150 mg+50 mg+50 mg) เขย่า 1 min นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500-4,000 rpm นาน 10 min แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ 2 ml ใส่ใน amber vial ขนาด 4 ml นำไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม n-hexane:ethyl acetate (3:1) จนครบ 2 ml หรือปรับให้ได้ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 1 g/ml นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง GC

7.1.2 ผักผลไม้ที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์หรือรงควัตถุสูง: ชั่งตัวอย่าง น้ำหนัก 10.0 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile+1% acetic acid 10 ml เขย่าอย่างแรง 1 min เติม $MgSO_4$ 4 g และ NaOAc 1 g แล้วเขย่า 1 min นำไปปั่นตกตะกอน (centrifuge) ด้วยความเร็วประมาณ 3,500-4,000 rpm นาน 5 min แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ 5 ml ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml แล้วนำไป clean up โดยการเติม $MgSO_4$ +PSA+GCB+C18 (150 mg+50 mg+50 mg+50 mg) เขย่า 1 min นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500-4,000 rpm นาน 10 min แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ 2 ml ใส่ใน amber vial ขนาด 4 ml นำไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม n-hexane:ethyl acetate (3:1) จนครบ 2 ml หรือปรับให้ได้ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 1 g/ml นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง GC

7.1.3 ผักผลไม้ที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำหรือไม่มีคลอโรฟิลล์: ชั่งตัวอย่าง น้ำหนัก 10.0 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile+1% acetic acid 10 ml เขย่าอย่างแรง 1 min เติม $MgSO_4$ 4 g และ NaOAc 1g แล้วเขย่า 1 min นำไปปั่นตกตะกอน (centrifuge) ด้วยความเร็วประมาณ 3,500-4,000 rpm นาน 5 min แบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ 2 ml ใส่ใน amber vial ขนาด 4 ml นำไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วย

สารละลายผสม n-hexane:ethyl acetate (3:1) จนครบ 2 ml หรือปรับให้ได้ความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับ 1 g/ml นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง GC

7.2 การหาปริมาณ

7.2.1 การวิเคราะห์ OCs และ SPs: ใช้เครื่องมือ GC-ECD โดยมีสภาวะเครื่องมือ ดังนี้ (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

column: DB-5MS, 30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness

inlet temperature: 200 °C, splitless mode

oven temperature: initial 80 °C hold 1 min, rate 15 °C /min to 180°C,

rate 3°C /min to 205 °C hold 5 min,

rate 40°C /min to final 260 °C hold 20 min

detector temperature: 300 °C

flow rate: helium (constant flow) 1.5 ml/min, nitrogen (make up) 60 ml/min

injection volume: 1 μ l

ก่อนใช้งาน - จัดสารมาตรฐาน แล้วปรับช่วงสัญญาณให้เห็นความสูงของสาร heptachlor epoxide ความเข้มข้น 0.005 μ g/ml ให้ได้ความสูงไม่น้อยกว่า 30% Full Scale Deflection (FSD) และสาร cypermethrin I ความเข้มข้น 0.05 μ g/ml ให้ได้ความสูงไม่น้อยกว่า 10% FSD

7.2.2 การวิเคราะห์ OPs: ใช้เครื่องมือ GC-FPD โดยมีสภาวะเครื่องมือ ดังนี้ (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

column: DB-1701, 30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness

inlet temperature: 200 °C, pulsed splitless mode

oven temperature: initial 80 °C hold 1 min, rate 15°C/min to 180°C,

rate 3°C/min to 205 °C hold 5 min,

rate 40 °C /min to final 260 °C hold 20 min

detector temperature: 220 °C

flow rate: helium (constant flow) 1.5 ml/min, nitrogen (make up) 60 ml/min

hydrogen 75 ml/min, air 100 ml/min

injection volume: 2 μ l

ก่อนใช้งาน - จัดสารมาตรฐาน แล้วปรับช่วงสัญญาณให้เห็นความสูงของสาร

chlorpyrifos ความเข้มข้น 0.2 μ g/ml ให้ได้ความสูงไม่น้อยกว่า 50 % FSD

7.3 การตรวจยืนยัน (confirmation)

7.3.1 การยืนยันชนิดสารที่ตรวจพบ ให้ดำเนินการดังนี้

- เติมสารมาตรฐานลงในหลอดสารสกัด โดยต้องเติมให้ได้ peak height ของสารที่พบใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน หากพบ peak มียอด (apex) เดียว แสดงว่าสารที่พบเป็นชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน แต่หากพบ peak มี 2 ยอด แสดงว่าสารที่พบไม่เป็นชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน หรือ
- จัดตัวอย่างซ้ำ โดยใช้ column ที่มี stationary phase แตกต่างไป เช่น OCs และ SPs อาจใช้ RTX[®]-CIPesticide หรือ DB-XLB สำหรับ OPs อาจใช้ DB-35MS
- จัดตัวอย่างซ้ำ เข้า Gas Chromatograph/Mass Spectrometer (GC/MS) เพื่อยืนยันชนิดสารที่ตรวจพบ

7.3.2 การยืนยันปริมาณที่ตรวจพบ – กรณีนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ดำเนินการตามกฎหมาย หากตรวจพบสารที่ไม่มีค่า MRLs กำหนด หรือตรวจพบสารที่มีปริมาณมากกว่า 50% ของค่า MRLs ต้องทำการทดสอบตัวอย่างใหม่ (retest) โดยทำ duplicate test

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ โดยใช้เทคนิค external calibration เปรียบเทียบกับ calibration curve (ความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับ) โดยจากสมการเส้นตรง ดังนี้

$$\text{สมการ } Y = aX + b$$

8.2 รายงานปริมาณสารที่ตรวจพบ ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ method blank โดยต้องไม่พบการปนเปื้อน
- 9.2 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 5% ของตัวอย่าง จำนวน % recovery (เกณฑ์ยอมรับ 60-120 %)
- 9.3 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 5% ของตัวอย่าง จำนวน % RPD (เกณฑ์ยอมรับ 25 %)

10. รายละเอียดอื่น

วิธีนี้ใช้ค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ดังนี้

Pesticides	Sample injected (g/ml)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
กลุ่ม Organochlorines	1.0	0.02	0.05
กลุ่ม Organophosphorus	1.0	0.02	0.05
กลุ่ม Synthetic pyrethroids	1.0	0.03	0.05

**DMSc F 1076: การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้:
กลุ่มคาร์บาเมต
Determination of pesticide residues in vegetables and fruits:
Carbamate**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamates) จำนวน 7 สาร ได้แก่ aldicarb, carbaryl, carbofuran, 3-OH carbofuran, methiocarb, methomyl และ oxamyl ในผักและผลไม้

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 จิตผกา สันต์ครบ และ กนกพร อธิสุข. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม fungicide ในผักและผลไม้. ว. กรมวิทย์ พ 2548; 47 (1) : 26-36.
- 2.2 CAC/GL 41-1993 (Amendment 2010) Portion of commodities to which maximum residue limits applied and which is analyzed.

3. หลักการ (Principle)

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมตที่ตกค้างถูกสกัดออกจากตัวอย่างผักและผลไม้ด้วยสารผสมระหว่าง methanol กับ phosphate buffer สารที่สกัดได้นำมาแยกโดยใช้เทคนิค solid – liquid partition ตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วย HPLC – post column derivatization และ fluorescence detector

4.0 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 HPLC post column derivatization และ fluorescence detector
- 4.1.2 เครื่องชั่ง อ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g
- 4.1.3 เครื่องบดปั่นความเร็วสูง (Ultra – Turrax homogenizer)
- 4.1.4 ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ
- 4.1.5 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (Vortex mixer)

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Amber glass vial ขนาด 2 ml

4.2.2 Beaker ขนาด 250 ml

4.2.3 Büchner funnel และกระดาษกรอง Whatman No.1, 110 mm diam หรือ
เทียบเท่า

4.2.4 Column พลาสติกสำหรับบรรจุ extrelute

4.2.5 Cylinder ขนาด 100 ml

4.2.6 Filter flask ขนาด 500 ml

4.2.7 Glass funnel ขนาด 75 mm id

4.2.8 Glass syringe ขนาด 10 และ 25 ml

4.2.9 Mixing cylinder ขนาด 100 และ 250 ml

4.2.10 Round-bottomed flask ขนาด 50, 250 และ 500 ml

4.2.11 Volumetric flask ขนาด 1 L

4.2.12 Volumetric pipette ขนาด 20 ml

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 Acetonitrile (CH_3CN), HPLC grade

5.2 Dichloromethane (CH_2Cl_2), HPLC grade

5.3 Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)

5.4 Extrelut NT20 refill pack (Merck, cat. No. 1.15093.0001)

5.5 95% hexane, HPLC grade

5.6 Methanol ($MeOH$), HPLC grade

5.7 2-mercaptoethanol

5.8 o-phthaldehyde

5.9 Sodium dihydrogen phosphate anhydrous (NaH_2PO_4)

5.10 Sodium hydroxide ($NaOH$)

5.11 Sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)

5.12 การเตรียมสารละลาย

- 0.2 M phosphate buffer:

ชั่ง NaH_2PO_4 น้ำหนัก 24.00 g ละลายใน H_2O ปริมาตรเป็น 1 L

ชั่ง Na_2HPO_4 น้ำหนัก 28.39 g ละลายใน H_2O ปริมาตรเป็น 1 L

ผสมสารละลาย NaH_2PO_4 กับสารละลาย Na_2HPO_4 ในอัตราส่วน 7:3 เขย่าให้เข้ากัน

- 0.05 N NaOH: เตรียม supernate NaOH โดยใช้ NaOH 1 ส่วน ละลายด้วย H_2O ที่ดื่มไล่ CO_2 แล้ว 1 ส่วน เก็บในขวดแก้วที่มีฝาปิด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 วัน เพื่อให้ NaCO_3 ตกตะกอนจนหมด จากนั้นเตรียม 5 N NaOH โดยเปิดส่วนใน ปริมาตร 27 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม H_2O จนครบปริมาตร แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเปิด 5 N NaOH ปริมาตร 10 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 L เติม H_2O จนครบปริมาตรแล้วผสมให้เข้ากัน
- 0.05 M sodium borate buffer solution: ชั่ง $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 19.1 g ละลายด้วย H_2O ประมาณ 500 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 L ใช้ ultrasonic bath ช่วย ในการละลายแล้วเติม H_2O จนครบปริมาตรผสมให้เข้ากัน
- reaction solution: ชั่ง o-phthalaldehyde 100 mg ละลายด้วย MeOH ปริมาตร 10 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 L ที่มี 0.05 M sodium borate buffer solution ประมาณ 500 ml เติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 1 ml ปรับปริมาตรให้ครบด้วย 0.05 M sodium borate buffer solution ผสมให้เข้ากัน

5.13 สารมาตรฐาน จำนวน 7 สาร ได้แก่ aldicarb, carbaryl, carbofuran, 3-OH carbofuran, methiocarb, methomyl และ oxamyl

5.14 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock standard solution ความเข้มข้นประมาณ 1 mg/ml เตรียมใน MeOH เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 °C มีอายุการใช้งาน 1 ปี

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

- 6.1 นำตัวอย่าง ผักสด ผลไม้สด อย่างน้อย 1 kg สุ่มเตรียมตัวอย่างเพื่อได้ส่วนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ของตัวอย่างแต่ละชนิด อ้างอิงตาม CAC/GL 41-1993 (Amendment 2010) นำมาหั่น บดปั่นด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมและสะอาด ตัวอย่างที่บดปั่นแล้ว ต้องมีความละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด
- 6.2 สุ่มตัวอย่างที่บดปั่นแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อให้เป็น analytical portion และแบ่งเก็บเป็น reserved portion เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -15^{\circ}\text{C}$ เมื่อไม่ได้วิเคราะห์ทันที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

เครื่องแก้วที่ใช้ทั้งหมดรวมทั้งกระดามกรองให้ rinse ด้วย MeOH แล้วทิ้งให้แห้งก่อนใช้งาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่จะมารบกวนการวิเคราะห์

- 7.1.1 ชั่งตัวอย่าง 20.0 g ใส่ใน beaker ขนาด 250 ml เติม MeOH:phosphate buffer (1:1) ปริมาตร 100 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง Ultra – Turrax homogenizer นาน 2 min กรองด้วยวิธี suction ปั่นล้างตะกอนอีกครั้งด้วย MeOH:phosphate buffer (1:1) ปริมาตร 50 ml
- 7.1.2 รวมสารสกัดที่กรองได้ใส่ round-bottomed flask ขนาด 500 ml นำไประเหยลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนเหลือปริมาตรประมาณ 75 ml เทสารละลายใส่ใน mixing cylinder ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย 0.2 M phosphate buffer
- 7.1.3 เตรียม extrelut column โดยบรรจุ extrelut 20 NT (refill pack 1 ซอง) ลงใน column พลาสติก นำไปปั่นบนเครื่อง Vortex mixer เพื่อให้ extrelut 20 NT เรียงตัวสม่ำเสมอและแน่นยิ่งขึ้น
- 7.1.4 เปิดสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 7.1.2) ปริมาตร 20 ml ใส่ลงใน extrelut column (7.1.3) ตั้งทิ้งไว้ 10 min แล้ว elute ด้วย CH_2Cl_2 :hexane (1:1) ปริมาตร 100 ml ใส่ใน round - bottomed flask ขนาด 250 ml นำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง

7.1.5 เติม MeOH 10 ml ระเหยต่อไปจนแห้ง แล้วเติม MeOH อีก 2 ml เพื่อละลายสารที่เหลือทั้งหมดทันที แล้วกรองผ่าน syringe filter PTFE, 13 mm, 0.20 μm ใส่ใน vial

7.1.6 นำไปตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC – post column derivatization และ fluorescence detector

7.2 การตรวจวัดชนิดและปริมาณ โดย เครื่องมือ HPLC (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

7.2.1 เครื่องมือ HPLC มีสภาวะเครื่องมือ ดังนี้

analytical column: Zorbax C₈ 5 μm , size 25 cm $\times$ 4.6 mm id หรือเทียบเท่า
mobile phase: programmable HPLC gradient system

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

flow rate: 1.0 ml/min

column oven: 35 °C

injection volume: 20 μl

fluorescence detector: Ex 345 nm, Em 455 nm

7.2.2 สภาวะของ post-column derivatization

flow rate: reaction solution by pass 1 (NaOH) และ by pass 2 (OPA) 0.3 ml/min

reactor temperature: 100 °C

ก่อนใช้งาน - จัดสารมาตรฐาน carbofuran ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ แล้วปรับช่วงสัญญาณ ให้ได้ peak height ไม่น้อยกว่า 50% Full Scale Deflection (FSD)

7.3 การตรวจยืนยัน (confirmation)

7.3.1 การยืนยันชนิดสารที่ตรวจพบ

- เมื่อตรวจพบสารที่มี retention time ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ให้เติมสารมาตรฐานลงในหลอดสารสกัด โดยต้องเติมสารมาตรฐานให้ได้ peak height สูงเท่ากับของสารที่พบ ถ้าพบ peak มียอด (apex) เดียว แสดงว่าสารที่พบเป็นชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน แต่หากพบ peak มี 2 ยอด แสดงว่าสารที่พบไม่เป็นชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน หรือ
- ปิด reaction solution ของ post – column derivatization instrument ถ้าพบว่ามี peak เกิดขึ้น แสดงว่าสารที่พบไม่ใช่สารคาร์บาเมต ยกเว้นสารมาตรฐาน carbaryl

7.3.2 การยืนยันปริมาณที่ตรวจพบ กรณีนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ดำเนินการตามกฎหมาย หากตรวจพบสารที่ไม่มีค่า MRLs กำหนด หรือตรวจพบสารที่มีปริมาณมากกว่า 50% ของค่า MRLs ต้องทำการทดสอบตัวอย่างใหม่ (retest)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 ใช้ single-point calibration เทียบกับสารมาตรฐาน โดยพื้นที่ของสารมาตรฐานและพื้นที่ของสารที่พบในตัวอย่างต้องมีความแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 25\%$ และคำนวณปริมาณที่พบโดยใช้สูตรดังนี้

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

- 8.2 รายงานผลปริมาณที่พบใช้หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 10 % ของตัวอย่าง ที่ระดับ 5 เท่าของ LOQ
คำนวณ % recovery (เกณฑ์ ขอมรับ 70-120 %)
- 9.2 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 10 % ของตัวอย่าง คำนวณ % RPD (เกณฑ์ ขอมรับ 25%)

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.005 mg/kg และ ค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.01 mg/kg

10.2 ข้อมูล Method validation โดยห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์
ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ดำเนินการปีงบประมาณ 2555

10.2.1 ข้อมูล % mean recovery ที่ระดับ LOQ (0.01 mg/kg) วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

Pesticides	ผักกาดขาว		ผักคะน้า		ถั่วฝักยาว		สาหร่าย	
	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %
aldicarb	85.7	14.0	100.6	9.3	94.9	11.8	82.5	20.8
carbaryl	96.1	13.4	82.3	13.6	97.3	15.0	95.5	11.2
3-OH carbofuran	78.9	9.6	91.6	12.6	79.9	12.2	104.5	20.4
carbofuran	94.2	13.1	94.8	11.2	83.4	12.7	104.6	11.8
methiocarb	85.6	11.7	105.7	8.0	92.8	15.2	95.6	11.6
methomyl	82.7	11.1	92.6	12.7	91.4	15.7	95.5	8.7
oxamyl	90.6	12.7	87.6	15.4	95.8	9.1	89.1	11.8

Pesticides	มะม่วง		สตอเบอรี่		องุ่น		แตงกวา	
	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %
aldicarb	104.4	6.7	92.6	14.1	105.0	15.9	82.2	15.9
carbaryl	100.0	9.3	86.6	13.7	92.8	8.8	88.1	11.2
3-OH carbofuran	93.0	14.4	86.3	10.9	91.4	10.6	80.5	12.2
carbofuran	91.1	11.7	96.5	15.9	93.0	13.4	97.2	11.4
methiocarb	83.2	13.1	100.6	5.4	100.2	8.1	92.0	16.0
methomyl	80.9	10.2	89.8	9.5	101.1	9.1	106.4	7.6
oxamyl	93.1	9.4	83.0	9.2	95.8	17.4	90.2	12.6

10.2.2 ข้อมูล % mean recovery ที่ระดับ 5 เท่าของ LOQ (0.05 mg/kg) วิเคราะห์ 10 ชั่วโมง

Pesticides	ผักกาดขาว		ผักคะน้า		ถั่วฝักยาว		สาธิต	
	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %
aldicarb	84.9	5.5	88.3	10.5	89.2	6.5	104.5	6.7
carbaryl	91.8	5.5	82.3	7.9	94.4	6.3	103.6	7.6
3-OH carbofuran	87.2	9.5	94.5	11.4	80.6	9.0	103.5	7.4
carbofuran	86.2	9.5	87.9	5.8	86.6	6.6	107.1	7.9
methiocarb	90.3	8.0	96.6	4.9	88.1	8.3	102.1	9.3
methomyl	84.3	7.7	84.5	9.6	94.5	8.0	110.6	6.7
oxamyl	86.7	8.9	90.6	8.2	94.4	7.0	97.5	6.1

Pesticides	มะม่วง		สตรอเบอรี่		องุ่น		แครอท	
	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %	Rec, %	RSD, %
aldicarb	80.2	13.0	89.2	7.8	97.0	9.0	91.5	7.8
carbaryl	94.2	12.0	82.4	6.0	101.5	9.2	92.1	7.2
3-OH carbofuran	88.5	13.4	75.3	4.9	103.0	7.7	79.9	7.8
carbofuran	98.7	7.9	81.0	5.0	96.3	6.1	91.4	7.6
methiocarb	97.3	12.1	83.7	6.7	89.3	9.2	91.4	9.1
methomyl	100.6	7.6	84.8	6.8	90.8	10.0	95.4	4.2
oxamyl	97.0	12.2	86.5	12.4	101.1	12.8	91.7	9.5

DMSc F 1077: การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราตกค้างในผักและผลไม้

Determination of fungicide residues in vegetables and fruits

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ carbendazim และ thiabendazole ในผักและผลไม้

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 จิตผกา สัมภัตรบ และ กนกพร อธิสุข. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม fungicide ในผักและผลไม้. ว. กรมวิทย์ พ 2548; 47 (1): 26-36.
- 2.2 CAC/GL 41-1993 (Amendment 2010) Portion of commodities to which maximum residue limits applied and which is analyzed.

3. หลักการ (Principle)

สารป้องกันกำจัดเชื้อราถูกสกัดออกจากตัวอย่างผักและผลไม้ ด้วยสารผสมระหว่าง methanol กับ phosphate buffer สารที่สกัดได้นำมาแยกโดยใช้เทคนิค solid – liquid partition และทำให้บริสุทธิ์โดย alumina sep-pak ตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วย HPLC – UV และ fluorescence detector

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง HPLC – UV detector และ fluorescence detector
- 4.1.2 เครื่องชั่ง อ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g
- 4.1.3 เครื่องบดปั่นความเร็วสูง (Ultra – Turrax homogenizer)
- 4.1.4 ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ
- 4.1.5 เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (Vortex mixer)



4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Amber glass vial ขนาด 2 ml
- 4.2.2 Beaker ขนาด 250 ml
- 4.2.3 Büchner funnel และกระดาษกรอง Whatman No.1, 110 mm diam หรือเทียบเท่า
- 4.2.4 Column พลาสติกสำหรับบรรจุ extrelute
- 4.2.5 Cylinder ขนาด 100 ml
- 4.2.6 Filter flask ขนาด 500 ml
- 4.2.7 Glass funnel ขนาด 75 mm id
- 4.2.8 Glass syringe ขนาด 10 และ 25 ml
- 4.2.9 Mixing cylinder ขนาด 100 และ 250 ml
- 4.2.10 Round-bottomed flask ขนาด 50, 250 และ 500 ml
- 4.2.11 Volumetric flask ขนาด 1 L
- 4.2.12 Volumetric pipette ขนาด 20 ml

5. สารเคมี (Reagent)

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

- 5.1 Acetonitrile (CH_3CN), HPLC grade
- 5.2 Dichloromethane (CH_2Cl_2), HPLC grade
- 5.3 Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)
- 5.4 Ethyl acetate, HPLC grade
- 5.5 Extrelut NT20 refill pack (Merck, cat. No. 1.15093.0001)
- 5.6 95% hexane, HPLC grade
- 5.7 Methanol (MeOH), HPLC grade
- 5.8 Potassium phosphate anhydrous
- 5.9 Sodium dihydrogen phosphate anhydrous (NaH_2PO_4)
- 5.10 Sep - pak alumina N plus (Water, cat. No. WAT 020510)

5.15 การเตรียมสารละลาย

- 0.2 M phosphate buffer:
ชั่ง NaH_2PO_4 น้ำหนัก 24.00 g ละลายใน H_2O ปริมาตรเป็น 1 L
ชั่ง Na_2HPO_4 น้ำหนัก 28.39 g ละลายใน H_2O ปริมาตรเป็น 1 L
ผสมสารละลาย NaH_2PO_4 กับสารละลาย Na_2HPO_4 ในอัตราส่วน 7:3 เขย่าให้เข้ากัน
- 0.01 M KH_2PO_4 : ชั่ง KH_2PO_4 น้ำหนัก 1.36 g ละลายใน H_2O ปริมาตรเป็น 1 L

5.16 สารมาตรฐาน (Standards)

- สารมาตรฐาน carbendazim ความบริสุทธิ์ $\geq 95\%$ หรือเทียบเท่า เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- สารมาตรฐาน thiabendazole ความบริสุทธิ์ $\geq 95\%$ หรือเทียบเท่า เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 1 mg/ml

6. การเตรียมตัวอย่าง

- 6.1 นำตัวอย่าง ผักสด ผลไม้สด อย่างน้อย 1 kg สุ่มเตรียมตัวอย่างเพื่อได้ส่วนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ของตัวอย่างแต่ละชนิด อ้างอิงตาม CAC/GL 41-1993 (Amendment 2010) นำมาหั่น บดปั่นด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมและสะอาด ตัวอย่างที่บดปั่นแล้ว ต้องมีความละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด
- 6.2 สุ่มตัวอย่างที่บดปั่นแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อใช้เป็น analytical portion และแบ่งเก็บเป็น reserved portion เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -15^\circ\text{C}$ เมื่อไม่ได้วิเคราะห์ทันที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

เครื่องแก้วที่ใช้ทั้งหมดรวมทั้งกระดวยกรองให้ rinse ด้วย MeOH แล้วทิ้งให้แห้งก่อนใช้งาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนรบกวนการวิเคราะห์

7.1 การสกัด (extraction)

- 7.1.1 ชั่งตัวอย่าง 20.0 g ใส่ใน beaker ขนาด 250 ml เติม MeOH:phosphate buffer (1:1) ปริมาตร 100 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง Ultra – Turrax homogenizer นาน 2 min กรองด้วยวิธี suction ปั่นล้างตะกอนอีกครั้งด้วย MeOH:phosphate buffer (1:1) ปริมาตร 50 ml

7.1.2 รวมสารสกัดที่กรองได้ใส่ round-bottomed flask ขนาด 500 ml นำไประเหยลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จนเหลือปริมาตรประมาณ 75 ml เทสารละลายใส่ใน mixing cylinder ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย 0.2 M phosphate buffer

7.1.3 เตรียม extrelut column โดยบรรจุ extrelut 20 NT (refill pack 1 ซอง) ลงใน column พลาสติก นำไปปั่นบนเครื่อง Vortex mixer เพื่อให้ extrelut 20 NT เรียงตัวสม่ำเสมอและแน่นยิ่งขึ้น

7.1.4 เปิดสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 7.1.2) ปริมาตร 20 ml ใส่ลงใน extrelut column (7.1.3) ตั้งทิ้งไว้ 10 min แล้ว elute ด้วย CH_2Cl_2 :hexane (1:1) ปริมาตร 100 ml ใส่ใน round - bottomed flask ขนาด 250 ml นำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง เติม ethyl acetate ปริมาตร 5 ml

7.2 SPE clean up

7.2.1 เตรียม sep-pak alumina N plus โดย pre-washed ด้วย ethyl acetate ปริมาตร 5 ml

7.2.2 ถ่ายสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด (7.1.4) ลงใน sep-pak ทั้งสารละลายส่วนที่ผ่านออกมา

7.2.3 elute ด้วย MeOH ปริมาตร 15 ml ลงใน round - bottomed flask ขนาด 50 ml นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนแห้ง เติม MeOH ปริมาตร 2 ml กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.20 μm , 13 mm id โดยทั้งสารละลายที่กรองได้ประมาณ 3 หยด แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ใน amber glass vial ขนาด 2 ml

7.2.4 นำไปตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC – UV และ Fluorescence detector

7.3 การตรวจวัดชนิดและปริมาณ โดย เครื่อง HPLC

7.3.1 ในการวิเคราะห์ชนิดของสาร carbendazim และ thiabendazole ต้องตรวจพบสัญญาณของสารทั้ง UV และ fluorescence detector

7.3.2 ในการหาปริมาณของสาร carbendazim และ thiabendazole ให้ใช้ค่าที่ได้จากสัญญาณของ fluorescence detector

7.3.3 สภาวะเครื่องมือ ประกอบด้วย (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

Analytical column: Ultracarb C₈, 5 µm, 150 mm × 4.6 mm id

Mobile phase: 0.01 M KH₂PO₄:CH₃CN (75:25)

Flow rate: 1 ml/min

Column oven: 40 °C

Injection volume: 20 µL

Detector: UV 230 nm และ Fluorescence Ex 285 nm, Em 315 nm

ก่อนใช้งาน – ทดสอบมาตรฐาน carbendazim และ thiabendazole ความเข้มข้นประมาณ 1.0 µg/ml จำนวนอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณ % RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์ยอมรับของ % RSD (peak area) ≤ 5% และ %RSD (RT) ≤ 2%

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 สร้าง calibration curve ทดสอบมาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 µg/ml

โดยสร้าง calibration curve ด้วยสัญญาณที่อ่านได้จาก fluorescence detector

8.2 คำนวณปริมาณที่ตรวจพบโดยใช้สมการเส้นตรง

$$\text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ (mg/kg)} = \frac{\text{Co (µg/ml)} \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (ml)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} \times \text{df}}$$

โดย Co = ค่าที่อ่านได้จาก calibration curve

df = 0.2 (ปิปต 20 ml จาก 100 ml)

8.3 การรายงานผลปริมาณที่พบให้หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ spiked sample อย่างน้อย 10 % ของตัวอย่าง ที่ระดับ 5 เท่าของ LOQ หรือระดับอื่นที่เหมาะสม คำนวณ % recovery (เกณฑ์ยอมรับ 70 – 130 %)
- 9.2 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 10 % ของตัวอย่าง คำนวณ %RPD (เกณฑ์ยอมรับ 25%)

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 วิธีนี้ค่า Limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.03 mg/kg และค่า Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.10 mg/kg

- 10.2 ข้อมูล Method validation (จากเอกสารอ้างอิง) ปรากฏในตาราง

ตัวอย่าง	Spiked level (mg/kg)	Carbendazim		Thiabendazole	
		mean Recovery (%)	% RSD	mean Recovery (%)	% RSD
มะเขือเทศ	0.1	82.9	6.4	99.1	4.9
	0.2	85.0	2.7	83.4	7.5
	0.3	89.0	2.4	82.4	5.1
	0.5	95.4	3.8	91.6	7.4
	1.0	85.4	7.4	86.0	9.3
แครอท	0.1	77.4	3.6	77.5	7.9
	0.5	80.8	6.3	81.3	5.8
องุ่น	0.1	96.0	5.5	87.4	6.2
	0.5	83.0	8.7	87.9	8.3
ศตรอบเบอร์รี่	0.1	91.8	11.8	82.0	12.0
	0.5	82.2	5.5	78.1	8.7
ถั่วฝักยาว	0.1	79.0	6.0	76.9	6.4
	0.5	80.0	4.8	86.7	4.8
มะม่วง	0.1	77.1	9.5	79.9	9.0
	0.5	87.2	8.0	73.9	3.1

หมายเหตุ ทุกตัวอย่างวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ ยกเว้นตัวอย่างมะเขือเทศวิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ

DMSc F 1078: การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแคดเมียมในพลาสติกและยาง โดย AAS

Determination of lead and cadmium in plastics and rubbers by AAS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ในพลาสติกและยาง โดยเทคนิค Flame AAS

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Japan External Trade Organization. Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents 2008. Japan: JETRO Overseas Research Department; 2009. p.116.

3. หลักการ (Principle)

เผาตัวอย่างให้หลอมละลายในภาชนะที่มี H_2SO_4 เข้มข้น จนหมดควันและเป็นถ่านดำ นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูง ที่อุณหภูมิ $450^\circ C$ เป็นเวลา 3 hr จนได้เถ้าขาว ละลายเถ้าด้วยสารละลาย HCl ระเหยสารละลายบนอ่างน้ำร้อนจนแห้ง ละลายด้วย 1% HNO_3 นำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Pb และ Cd ด้วยเทคนิค atomic absorption spectrometry ระบบ flame (Flame AAS) กำหนดปริมาณ Pb และ Cd เทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 Flame AAS, พร้อม hollow cathode lamp ของ Pb และ Cd

4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.3 เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) ควบคุมอุณหภูมิได้คงที่ $450 \pm 25^\circ C$

4.1.4 Hot plate

4.1.5 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Auto pipette ขนาด 10-100 และ 100-1,000 μ l
- 4.2.2 Porcelain crucible
- 4.2.3 Volumetric flask ขนาด 20, 100 และ 250 ml
- 4.2.4 ขวดพลาสติกฝาเกลียว
- 4.2.5 กระดาษกรอง Whatman No. 2 หรือ เทียบเท่า

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 สารเคมี

- 5.1.1 1% HNO_3 : เจือจาง HNO_3 เข้มข้น (69-70% w/w) ปริมาตร 2.5 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 250 ml
- 5.1.2 HCl (1:1): เจือจาง HCl เข้มข้น (37% w/w) ปริมาตร 50 ml ใน H_2O ปริมาตร 50 ml
- 5.1.3 H_2SO_4 95-97% (w/w)

5.2 สารมาตรฐาน (Standards)

- 5.2.1 สารละลายมาตรฐาน Pb 1,000 mg/L
- 5.2.2 สารละลายมาตรฐาน Cd 1,000 mg/L

5.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- 5.3.1 สารละลายมาตรฐาน Pb 100 mg/L: เจือจางสารละลายมาตรฐาน Pb 1,000 mg/l ลง 10 เท่า ด้วย 1% HNO_3
- 5.3.2 สารละลายมาตรฐาน Pb เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)
 - การวิเคราะห์พลาสติก เตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 และ 3.50 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน Pb 100 mg/L ปริมาตร 0.0, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 และ 3.50 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย 1% HNO_3

- การวิเคราะห์แบบ เครื่องกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 และ 0.60 mg/L: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Pb 100 mg/L ปริมาตร 0.0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 และ 0.60 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย 1% HNO₃

5.3.3 สารละลายมาตรฐาน Cd 100 mg/L: เจือจางสารละลายมาตรฐาน Cd 1,000 mg/l ลง 10 เท่า ด้วย 1% HNO₃

5.3.4 สารละลายมาตรฐาน Cd เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

- การวิเคราะห์พลาสมิก เครื่องกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70 และ 0.80 mg/L: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Cd 100 mg/L ปริมาตร 0.0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70 และ 0.80 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย 1% HNO₃

- การวิเคราะห์แบบ เครื่องกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 และ 0.60 mg/L: ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Cd 100 mg/L ปริมาตร 0.0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 และ 0.60 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml แต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย 1% HNO₃

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ใช้เฉพาะส่วนของพลาสติก หรือยางที่ต้องการวิเคราะห์ ตัดให้ละเอียดขนาดไม่เกิน 0.5 cm²

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียม test portion

7.1.1 ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ 0.500 g ใส่ใน porcelain crucible

7.1.2 ใส่ H₂SO₄ ปริมาตร 1-3 ml ให้ตัวอย่างเปียกชุ่ม เติมนบน hot plate ที่ความร้อนต่ำๆ จนตัวอย่างหลอมละลาย แล้วค่อยๆ เพิ่มความร้อน จนกระทั่งเป็นอานดำและหมดควัน

- 7.1.3 นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูงที่ 450 °C เป็นเวลา 3 hr จนกระทั่งเป็นเถ้าขาว
ทิ้งไว้ให้เย็น
- 7.1.4 ละลายเถ้าด้วย HCl (1:1) 2.5 ml แล้วระเหยบนอ่างน้ำร้อนจนแห้ง
- 7.1.5 ละลายสิ่งที่เหลืออยู่ใน porcelain crucible ด้วย 1% HNO₃ วางทิ้งไว้ประมาณ
10 min กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่กรองได้ใน
volumetric flask ขนาด 10 ml ล้างกระดาษกรอง และปรับปริมาตรด้วย 1%
HNO₃
- 7.2 การเตรียม blank ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง โดยไม่ใส่ตัวอย่างใน porcelain
crucible
- 7.3 การวิเคราะห์
- 7.3.1 Instrument parameter
- วิเคราะห์ Pb ในพลาสติก ความยาวคลื่น 283.3 nm
 - วิเคราะห์ Pb ในยาง ความยาวคลื่น 217.0 nm
 - วิเคราะห์ Cd ความยาวคลื่น 228.8 nm
- 7.3.2 สร้างกราฟมาตรฐานของ Pb และ Cd ค่า R² ต้อง ≥ 0.995
- 7.3.3 วัดปริมาณ Pb และ Cd อ่านค่าเทียบกับกราฟมาตรฐาน
- 7.3.4 กรณีที่ปริมาณ Pb หรือ Cd สูงกว่ากราฟมาตรฐาน ให้เจือจางด้วย 1% HNO₃
จนสามารถวัดปริมาณในช่วงกราฟมาตรฐานได้

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณตะกั่วหรือแคดเมียม (mg/kg)} = \frac{(a-b) \times V \times F}{W}$$

เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของตะกั่วหรือแคดเมียมใน test solution (mg/kg)

b คือ ความเข้มข้นของตะกั่วหรือแคดเมียมใน blank (mg/kg)

V คือ ปริมาตรของ 1%HNO₃ ที่ใช้ละลายตัวอย่าง (ml)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

F คือ dilution factor

8.2 การรายงาน

รายงานปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ต้องตรวจไม่พบ หรือพบน้อยกว่า Limit of detection
- 9.2 วิเคราะห์ spiked sample ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้นช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน และ recovery ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 80-110 %
- 9.3 วิเคราะห์ duplicate sample อย่างน้อย 10 % ของจำนวนตัวอย่าง และ $RPD \leq 20 \%$

10. รายละเอียดอื่น

ค่า Limit of detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์

โลหะ	LOD (mg/kg)		LOQ (mg/kg)	
	พลาสติก	ยาง	พลาสติก	ยาง
Pb	1.0	0.12	5.0	1.0
Cd	0.5	0.04	2.0	0.5

DMSc F 1079: การตรวจเอกลักษณ์ชนิดพลาสติกโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer
Identity test of plastic type by Fourier Transform Infrared Spectrometer

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้สำหรับตรวจเอกลักษณ์ชนิดพลาสติกโดยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ยืนยันชนิดพลาสติกโดยการเปรียบเทียบ infrared spectrum ของตัวอย่างกับ infrared spectrum ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 656-2556 วิธีวิเคราะห์พลาสติกที่สัมผัสอาหาร
ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 50 ง (วันที่ 22 เมษายน 2556)

3. หลักการ (Principle)

วิเคราะห์ functional group ในโมเลกุลของพลาสติก ด้วยเทคนิค FT-IR โดย operating modes ต่างๆ เช่น transmission mode และ reflectance mode การเตรียมตัวอย่าง (sampling techniques) ต้องเหมาะสมกับชนิดของพลาสติก ตัวอย่างประเภท thermo plastic ใช้การวัดแบบ transmission ส่วนตัวอย่างประเภท thermoset plastic ให้วัดแบบ diffuse reflection การประเมินชนิดของพลาสติกนำ IR spectrum ของตัวอย่างมา เปรียบเทียบกับ IR spectrum ในฐานข้อมูล (library) อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม Euclidean Search ประเมินความใกล้เคียงของ IR spectrum ระหว่างตัวอย่างกับ IR spectrum ของชนิดพลาสติกที่มีใน library

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 FT-IR พร้อมอุปกรณ์ประกอบ หน่วยประมวลผลและเครื่องพิมพ์ผล
- 4.1.2 Diffuse reflectance พร้อมด้วยอุปกรณ์ประกอบ
- 4.1.3 Fixed angle specular reflectance พร้อมด้วยอุปกรณ์ประกอบ
- 4.1.4 Hot plate

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 แผ่นเหล็กกล้าและแผ่นกระจก

4.2.2 Magnetic film holders

4.2.3 Infrared Spectrophotometer Polystyrene Calibration Film (PS film)

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade

5.1 Xylene, C_8H_{10}

5.2 N-hexane, C_6H_{14}

5.3 N,N dimethylacetamide, C_4H_9NO

5.4 Tetrahydrofuran, C_4H_8O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ใช้เฉพาะส่วนพลาสติกที่ไม่มีหมึกพิมพ์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสร้าง IR spectrum ของตัวอย่าง

7.1.1 ตัวอย่างแผ่นฟิล์มชั้นเดียว บาง และแสงผ่านได้

ตัดตัวอย่างให้มีขนาดพอเหมาะกับขนาดของ magnetic film holder นำไปวางบนแผ่นรองของ magnetic film holder ที่ตำแหน่งช่องแสง (window) แล้ววางวงแหวนแม่เหล็กทับ ดึงแผ่นฟิล์มให้ตึงใส่ magnetic film holder บรรจุตัวอย่าง ลงในช่องใส่ตัวอย่าง (sample slide) ในเครื่อง FT-IR ทำการ scan เพื่อบันทึก IR spectrum ของตัวอย่าง

7.1.2 ตัวอย่างที่แสงผ่านไม่ได้ และเป็น thermo plastic ซึ่งสามารถหลอมให้อ่อนตัว และกลับคืนสภาพเดิมได้ เมื่อเย็น เช่น PE, PP เป็นต้น

7.1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

วิธี hot pressing: วางชิ้นตัวอย่างที่ตัดให้มีขนาดเล็กบนแผ่นเหล็กกล้า นำไปวางบน hot plate ให้ความร้อนจนตัวอย่างเริ่ม

อ่อนตัว ใช้ spatula กดตัวอย่างที่อ่อนตัวแล้วรีดเป็นแผ่นฟิล์มบางให้แสงสามารถผ่านได้ ขนาดประมาณช่องแสงของ magnetic film holder นำแผ่นเหล็กกล้าออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิต้องจนเย็น ท่อขุกลอกแผ่นฟิล์มออก ระวังอย่าให้แผ่นฟิล์มขาด

วิธีละลายตัวอย่าง: เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับชนิดของพลาสติก แล้วนำมาละลายชั้นตัวอย่างให้บางลงจนแสงสามารถผ่านได้ หรือละลายจนหมด แล้วนำสารละลายมาหยดลงบนแผ่นกระจกระเหยสารละลายจนหมด เหลือแผ่นฟิล์มที่แห้งแล้วบนกระจก ลอกแผ่นฟิล์มออก ระวังอย่าให้แผ่นฟิล์มขาด

7.1.2.2 การวิเคราะห์

นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมไว้ตามข้อ 7.1.2.1 วางบนแผ่นรองของ magnetic film holder ที่ตำแหน่งช่องแสง แล้ววางวงแหวนแม่เหล็กทับคิงแผ่นฟิล์มให้ตึง ใส่ magnetic film holder ที่บรรจุตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่างในเครื่อง FT-IR ทำการ scan เพื่อบันทึก IR spectrum ของตัวอย่าง

7.1.3 ตัวอย่างที่เคลือบบนวัสดุสะท้อนแสง เช่น ฟิล์มพลาสติกเคลือบบนแผ่นเพลวอลูมิเนียม หรือเคลือบบนแผ่นโลหะ หรือเคลือบบนกระดาษมัน วิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ fixed angle specular reflectance

7.1.3.1 ประกอบอุปกรณ์ fixed angle specular reflectance เข้ากับเครื่อง FT-IR ปรับแต่งอุปกรณ์ให้เหมาะสมต่อการวัด

7.1.3.2 คัดตัวอย่างให้มีขนาดพอเหมาะแล้วนำไปวางบน aperture mask ของอุปกรณ์ โดยคว่ำตัวอย่างด้านที่ต้องการวัดลงบริเวณกลางช่องแสง แล้ววางแผ่น reference mirror ทับบนตัวอย่าง ทำการ scan เพื่อบันทึก IR spectrum ของตัวอย่าง

7.1.4 ตัวอย่างที่ประกอบด้วยวัสดุต่างชนิด ประกอบกันหลายชั้น เช่น ฟิล์มพลาสติกประกบกับฟิล์มพลาสติก หรือฟิล์มพลาสติกประกบกับวัสดุอื่น ใช้วิธีเตรียมดังนี้

- 7.1.4.1 ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับชนิดของพลาสติก ละลายตัวอย่าง เฉพาะด้านที่สัมผัสอาหาร แล้วนำสารละลายมาหยดลงบนแผ่น กระชก ระเหยสารละลายจนหมด เหลือแผ่นฟิล์มที่แห้งแล้วบน กระชก ลอกแผ่นฟิล์มออก ระวังอย่าให้แผ่นฟิล์มขาด
- 7.1.4.2 ดึงตัวอย่างให้ยืดบาง จนสามารถแยกชั้นที่ต้องการวิเคราะห์ออกมา หรือแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายที่เหมาะสมกับชนิดของพลาสติก เพื่อให้ตัวอย่างอ่อนตัว แล้วดึงแยกชั้นที่ต้องการวิเคราะห์ออกมา
- 7.1.4.3 วิธี hot pressing โดยวางชิ้นตัวอย่างด้านที่ต้องการวิเคราะห์คว่ำลง บนแผ่นเหล็กกล้านำไปวางบน hot plate ให้ความร้อนจนตัวอย่าง เริ่มอ่อนตัว ใช้ spatula รีดบนตัวอย่าง เพื่อให้พลาสติกละลายติดอยู่บนแผ่นเหล็กกล้า แผ่นฟิล์มต้องบางให้แสงสามารถผ่านได้ ขนาด ประมาณช่องแสงของ magnetic film holder นำแผ่นเหล็กกล้า ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น ลอกแผ่นฟิล์มออก
- 7.1.4.4 นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมไว้ วางบนแผ่นรองของ magnetic film holder ที่ ตำแหน่งช่องแสง แล้ววางวงแหวนแม่เหล็กทับดึงแผ่นฟิล์มให้ตึง ใส่ในเครื่อง FT-IR แล้วทำการ scan เพื่อบันทึก IR spectrum ของ ตัวอย่าง
- 7.1.5 Thermoset plastics วิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ diffuse reflectance
- 7.1.5.1 ใช้ abrasive pad (กระดาษซิลิกอนคาร์ไบด์ กระดาษกากเพชร หรือ กระดาษเกลือบไลหะ) ขูดผิวตัวอย่าง จนกระทั่งผิวดตัวอย่างเกาะ กระจายเต็มแผ่นกระดาษ
- 7.1.5.2 นำแผ่นกระดาษที่เตรียมไว้ตามข้อ 7.1.5.1 ไปติดบน sample holder นำไปใส่ใน diffuse reflectance ซึ่งติดตั้งในเครื่อง FT-IR และ ปรับแต่งให้พร้อมใช้งานแล้ว ทำการ scan เพื่อบันทึก IR spectrum ของตัวอย่าง

7.2 การวิเคราะห์ชนิดของตัวอย่าง

7.2.1 ภาวะของเครื่อง FT-IR scan parameter: range start 4000.0 cm^{-1} end 400 cm^{-1}
number of scans 10, resolution 4.0 cm^{-1} , interval 2.0 cm^{-1} , units: %T

7.2.2 scan ตัวอย่างและบันทึก IR spectrum

7.2.3 เปรียบเทียบ IR spectrum ของตัวอย่างกับ IR spectrum ของพลาสติกที่มีในฐานข้อมูล ด้วยตาเปล่าและใช้ โปรแกรม Euclidean Search

7.2.4 ประเมินผลชนิดพลาสติกของตัวอย่างจากลำดับและค่าของ score ที่แสดงใน Euclidean Search Hit List ตัวอย่างเป็นพลาสติกชนิดที่ลำดับ score ลำดับแรก ค่า score ไม่น้อยกว่า 0.8 และ ต้องพิจารณาจากรูปลักษณะของ IR spectrum ที่ปรากฏประกอบด้วย

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

รายงานชนิดของพลาสติกที่ประเมินได้ตามข้อ 7.2.4

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่อง FT-IR ทุกครั้งก่อนใช้งานตามข้อกำหนดของเครื่องมือ หรือโดยการวัด PS film เทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด

9.2 กรณีที่เกิดความสงสัย ให้วิเคราะห์ตัวอย่าง อย่างน้อย 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง อาจจะใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ ต่างกันเพื่อยืนยันผล

10. รายละเอียดอื่น

สารเคมีที่ใช้ละลาย หรือทำให้พลาสติกอ่อนตัวลง

ชนิดพลาสติก	ตัวทำละลาย
PE	Xylene (hot)
PP	Xylene (hot)
PVC	Tetrahydrofuran, N,N dimethylformamide
PS	Xylene, Chloroform, Tetrahydrofuran, N,N dimethylformamide
PET	Dichloromethane, Dioxane
PC	Chloroform, Dichloromethane

DMSc F 1080: การวิเคราะห์ปริมาณสารระเหยได้ใน Polystyrene

Determination of volatile substances in polystyrene

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารระเหยได้ (Volatile substances; VS) 5 ชนิดคือ toluene, ethyl benzene, isopropyl benzene, propyl benzene และ styrene ที่ตกค้างอยู่ในเนื้อพลาสติกชนิด Polystyrene (PS) ประเภท homopolymer หรือ copolymer

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Japan External Trade Organization. Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents 2008. Japan: JETRO Overseas Research Department; 2009. p.100-101, 119.

3. หลักการ (Principle)

ละลายตัวอย่างด้วย tetrahydrofuran และเติม diethyl benzene เป็น internal standard วางไว้ในตู้เย็นจนตัวอย่าง ละลายหมด กรองแยกสารละลายจากตะกอน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ VS ด้วยเทคนิค GC-FID และคำนวณปริมาณ VS ทั้ง 5 ชนิดคือ toluene, ethyl benzene, isopropyl benzene, propyl benzene และ styrene เทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 Gas Chromatograph - Flame ionization detector (FID)

4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Autopipette ขนาด 0.01-0.1 ml และ 0.1-1 ml

4.2.2 Erlenmeyer flask ที่มีฝาปิดขนาด 50, 125 และ 250 ml

4.2.3 Volumetric flask ขนาด 5, 10, 25, 50 และ 100 ml

4.2.4 ขวดแก้วสีชาชนิด ground glass stopper

4.2.5 กระดาษกรอง Whatman No. 2 หรือ เทียบเท่า

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade

5.1 Tetrahydrofuran; C_4H_8O

5.2 สารมาตรฐาน ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.0

5.1.1 Toluene, C_7H_8

5.1.2 Ethylbenzene, C_8H_{10}

5.1.3 Isopropyl benzene, C_9H_{12}

5.1.4 Propyl benzene, C_9H_{12}

5.1.5 Styrene, C_8H_8

5.1.6 Diethylbenzene, $C_{10}H_{14}$ (internal standard)

5.3 สารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 2,000 mg/L: ชั่งสารมาตรฐาน แต่ละชนิด น้ำหนัก 0.0500 g ละลายด้วย C_4H_8O ปริมาตรเป็น 25 ml ถ่ายใส่ขวดแก้วสีชา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า $10^\circ C$ สามารถใช้ได้ 6 เดือน

5.4 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 250 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2,000 mg/L ชนิดละ 6.25 ml ใส่รวมกันใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย C_4H_8O ถ่ายใส่ขวดแก้วสีชาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า $10^\circ C$ สามารถใช้ได้ 3 เดือน

5.5 สารละลาย internal standard ความเข้มข้น 100 mg/L: ชั่ง $C_{10}H_{14}$ น้ำหนัก 0.0500 g ละลายด้วย C_4H_8O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ปิ่เปิดมา 10 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย C_4H_8O ถ่ายใส่ขวดแก้วสีชาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำกว่า $10^\circ C$ สามารถใช้ได้ 3 เดือน

5.6 สารละลายมาตรฐาน VS เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 mg/L: ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 250 mg/L ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml แยกกันแต่ละขวด ใส่ internal standard ความเข้มข้น 100 mg/L ขวดละ 0.5 ml ปรับปริมาตรด้วย C_4H_8O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ใช้เฉพาะส่วนของพลาสติก ที่ต้องการวิเคราะห์ คัดให้ละเอียดขนาดไม่เกิน 0.5 cm^2

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียม test portion

7.1.1 ชั่งตัวอย่างที่ตัดเตรียมไว้ 0.500 g ใส่ใน Erlenmeyer flask ที่มีฝาปิดจำนวน 2 ชุด ใส่สารละลาย internal standard (5.5) ปริมาตร 1.0 ml เดิม C_4H_8O ปริมาตร 19 ml ปิดฝาเขย่าให้ตัวอย่างละลายวางไว้ในตู้เย็นทิ้งค้างคืนเพื่อให้ตกตะกอน

7.1.2 กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรองเก็บสารละลายที่กรองได้ในขวดแก้วสีชา ที่มีฝาปิด

7.2 การตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง GC-FID

7.2.1 สภาวะเครื่องมือ ประกอบด้วย (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

column: crosslinked polyethylene glycol 0.32 mm id $\times$ 30 m $\times$ 0.5 μ m

temperature program: column oven 50 °C hold 1 min, 4 °C/min to 100 °C hold 1 min, 30 °C/min to 200 °C hold 3 min

Carrier gas: He

inlet temperature: 250 °C

injection volume: 1 μ l

split ratio: 1:1

FID: temperature 250 °C ใช้ก๊าซ H_2 และ air เพื่อจุด flame และปรับอัตรา
การไหลของแก๊สให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ความไวมากที่สุด

7.2.2 การตรวจสอบ system suitability ก่อนการวิเคราะห์ โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นที่ระดับช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ไม่น้อยกว่า 5 ครั้ง คำนวณ %RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์ยอมรับ %RSD (peak area) $\leq$ 5% และ %RSD (RT) $\leq$ 2% และ tailing factor $\leq$ 2

7.2.3 การ verify กราฟมาตรฐานและความพร้อมของเครื่องระหว่างทำการวิเคราะห์ โดยฉีด สารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นระดับช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ไม่น้อยกว่า 1 ครั้ง ก่อนการวิเคราะห์ ทุก 10 % ของการวัดตัวอย่าง และหลังการวิเคราะห์ ปริมาณ VS ที่คำนวณได้ต้องอยู่ในช่วง $\pm$ 5% ของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่ฉีด



- 7.2.4 สร้างกราฟมาตรฐาน VS แต่ละชนิดทั้ง 5 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นตามข้อ 5.6 กับ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารละลายมาตรฐาน ต่อ peak area ของ internal standard และ R^2 ต้อง ≥ 0.995
- 7.2.5 วัดปริมาณ VS แต่ละชนิดโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน
- 7.3 การวิเคราะห์ spiked sample ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติม สารละลายมาตรฐาน VS ลงในตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ VS แต่ละชนิด (mg/kg)} = \frac{A \times V}{W}$$

เมื่อ A (mg/L) คือ ความเข้มข้นของ VS แต่ละชนิด

V (ml) คือ ปริมาตรของสารละลาย C_4H_8O (20 ml)

W (g) คือ น้ำหนักของตัวอย่าง

8.2 การรายงาน

นำปริมาณ VS แต่ละชนิดที่คำนวณได้มารวมกัน รายงานผลเป็น VS ทั้งหมด
รายงานปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ทุกครั้ง
ที่ทำการวิเคราะห์ และ recovery ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 80-110 %
- 9.2 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกตัวอย่าง คำนวณ %RPD ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์
ยอมรับ 20 %

10. รายละเอียดอื่น

วิเคราะห์นี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ของ VS แต่ละชนิด
เท่ากับ 30 mg/kg และ ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation,
LOQ) เท่ากับ 100 mg/kg

DMSc F 1081: การวิเคราะห์ปริมาณ Vinyl chloride monomer ใน Poly(vinyl chloride)
Determination of vinyl chloride monomer in Poly(vinyl chloride)

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณ vinyl chloride monomer (VCM) ที่ตกค้างอยู่ในเนื้อพลาสติกชนิด Poly(vinyl chloride) (PVC) ประเภท homopolymer หรือ copolymer

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 Japan External Trade Organization. Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents 2008. Japan: JETRO Overseas Research Department; 2009. p. 100-101, 119.
- 2.2 ISO/TC 61/SC 5/N1012:2004 ISO/CD 6401. Plastics-Polyvinyl chloride- Determination of residual vinyl chloride monomer- Gas chromatographic method.

3. หลักการ (Principle)

ละลายตัวอย่างด้วย N, N dimethylacetamide แล้วนำไปให้ความร้อนในเครื่องเตรียมตัวอย่างชนิด headspace ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ VCM ด้วยเครื่อง GC/MS และคำนวณปริมาณ VCM เทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 Gas Chromatograph/Mass Spectrometer (GC/MS) พร้อมเครื่องเตรียมตัวอย่าง Headspace sampler
- 4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 อุปกรณ์

- 4.2.1 Auto-pipette ขนาด 1.0-10 ml และ septum ชนิด PTFE/silicone
- 4.2.2 Gas-tight glass syringe ขนาด 10 และ 100 μ l
- 4.2.3 Headspace vial ขนาด 20 ml พร้อมฝาปิดชนิด aluminium caps
- 4.2.4 อุปกรณ์ปิดและเปิดฝาขวด headspace vial (crimper and de-crimper tools)

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดไม่ต่ำกว่าระดับ AR grade

5.1 N,N dimethylacetamide, C_4H_9NO ต้องไม่มีสารรบกวนที่ให้ peak ที่มี Retention time (RT) ตรงกับ VCM ก่อนใช้ให้นำไปแช่ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิต่ำกว่า $-14^{\circ}C$

5.2 Methanol, MeOH

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

5.3.1 สารละลายมาตรฐาน VCM ความเข้มข้น 50 mg/L ก่อนใช้ให้ละลายสารละลายมาตรฐาน ในอ่างน้ำแข็งแห้งที่ผสมกับ MeOH ไม่ต่ำกว่า 2 hr แล้วถ่ายสารละลายมาตรฐานใส่ในขวด headspace vial ปิดด้วยฝาปิดชนิด aluminium caps และ septa ชนิด PTFE/silicone เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-14^{\circ}C$

5.3.2 สารละลายมาตรฐาน VCM เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.100, 0.200 และ 0.400 mg/L

5.3.3 ปิเปต C_4H_9NO (5.1) ใส่ headspace vial ขนาด 20 ml แต่ละขวด ปริมาตร 2.5 ml ใช้ gas-tight glass syringe ปิเปตสารละลายออกปริมาณเท่ากับปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน VCM ที่จะเติม ดังนี้ 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0 μl ตามลำดับ ปิดด้วยฝาปิดชนิด aluminum caps และ septa ชนิด PTFE/silicone

5.3.4 ใช้ gas-tight glass syringe ปิเปตสารละลายมาตรฐาน VCM (5.3.2) ใส่ใน headspace vial ที่เตรียม (5.3.3) ผ่าน septum ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลาย C_4H_9NO ที่ปิเปตออกไปตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ทันที หากยังไม่ใช้ เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิอุณหภูมิต่ำกว่า $-14^{\circ}C$

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ใช้เฉพาะส่วนของพลาสติก ที่ต้องการวิเคราะห์ คัดให้ละเอียดขนาดไม่เกิน 0.5 cm^2

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (test portion)

7.1.1 ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ 0.500 g ใส่ในขวด headspace vial ขนาด 20 ml ใส่ C_4H_9NO ข้อ 5.1 ปริมาตร 2.5 ml ปิดด้วยฝาปิดชนิด aluminium caps และ septum ชนิด PTFE/silicone เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิต่ำกว่า $-14^{\circ}C$ จนกระทั่งตัวอย่างละลาย หรือพองตัวเป็นเนื้อเดียวกัน

7.1.2 เตรียม blank โดยใช้ C_4H_9NO (5.1) ปริมาตร 2.5 ml ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง

7.2 การตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง GC/MS

7.2.1 สภาวะเครื่องมือ ประกอบด้วย (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

column: bonded polystyrene-divinyl benzene, $20\ \mu m \times 0.32\ mm \times 30\ m$

temperature program: $80^{\circ}C$ hold 2 min, $5^{\circ}C/min$ to $170^{\circ}C$ hold 1 min, $20^{\circ}C/min$ to $230^{\circ}C$ hold 7 min

carrier gas: He

inlet temperature: $150^{\circ}C$

split ratio: 2:1

headspace: oven temp $70^{\circ}C$, vial EQ time 30 min, loop $140^{\circ}C$, transfer line $150^{\circ}C$

mass detector: GC interface temperature $230^{\circ}C$

operation mode: selected ion monitoring (SIM)

target ion: 62, Q1: 63.9, Q2: 61

7.2.2 การตรวจสอบ system suitability ก่อนการวิเคราะห์ โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นที่ระดับช่วงกลางของกราฟมาตรฐานไม่น้อยกว่า 5 ครั้ง คำนวณ %RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์ยอมรับ %RSD (peak area) $\leq 10\%$ และ %RSD (RT) $\leq 1\%$ และ tailing factor ≤ 2

- 7.2.3 การ verify กราฟมาตรฐานและความพร้อมของเครื่องระหว่างทำการวิเคราะห์ โดยนิตสารละลาย มาตรฐาน VCM ที่ความเข้มข้นระดับช่วงกลางของกราฟ มาตรฐาน ไม่น้อยกว่า 1 ครั้ง ก่อนการวิเคราะห์ ทุก 10 % ของตัวอย่าง และ หลังการวิเคราะห์ ปริมาณ VCM ที่คำนวณได้ต้องอยู่ในช่วง $\leq 5 \%$ ของ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่ฉีด
- 7.2.4 สร้างกราฟมาตรฐาน VCM ที่ระดับความเข้มข้นตามข้อ 5.3.2, $R^2 \geq 0.995$
- 7.2.5 วัดปริมาณ VCM ในสารละลายตัวอย่างโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน
- 7.3 การวิเคราะห์ spiked sample ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติม สารละลายมาตรฐาน VCM ลงในตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ VCM ในตัวอย่าง (mg/kg)} = \frac{(A-B) \times V}{W}$$

เมื่อ A (mg/L) คือ ความเข้มข้นของ VCM ในสารละลายตัวอย่าง

B (mg/L) คือ ความเข้มข้นของ VCM ในสารละลาย blank

V (ml) คือ ปริมาตรของสารละลาย N,N dimethylacetamide ที่ใช้ละลายตัวอย่าง

W (g) คือ น้ำหนักของตัวอย่าง

8.2 การรายงาน

รายงานปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

- 9.1 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์ และ recovery ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 80-110 %
- 9.2 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกตัวอย่าง และ % RPD ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 20 %

10. รายละเอียดอื่น

วิธีวิเคราะห์นี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.075 mg/kg และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.25 mg/kg

DMSc F 1082: การวิเคราะห์ปริมาณ Tricresyl phosphates ใน Poly(vinyl chloride)
Determination of tricresyl phosphates in Poly(vinyl chloride)

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Tricresyl phosphates (TCP) ที่ตกค้างอยู่ในเนื้อพลาสติกชนิด Poly(vinyl chloride) (PVC) ประเภท homopolymer หรือ copolymer

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Japan External Trade Organization. Specifications, Standards and Testing Methods for Foodstuffs, Implements, Containers and Packaging, Toys, Detergents 2008. Japan: JETRO Overseas Research Department; 2009. p. 94-95, 118.

3. หลักการ (Principle)

สกัด TCP ในตัวอย่างด้วย acetonitrile (CH_3CN) ที่ อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 hr แล้วนำมา clean up โดยผ่าน SPE column ชนิด C18 elute ด้วยสารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1) ตรวจวิเคราะห์ TCP ด้วย HPLC - Photo diode array detector (PDA) คำนวณปริมาณ TCP เทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 HPLC-PDA

4.1.2 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $40 \pm 2^\circ\text{C}$

4.1.3 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 อุปกรณ์

4.2.1 Auto-pipette ขนาด 10-100, 100-1,000 μl และ 1-10 ml

4.2.2 Erlenmeyer flask ขนาด 50 ml พร้อมฝาปิด

4.2.3 Glass pipette ขนาด 25 ml

4.2.4 Volumetric flask ขนาด 10 และ 100 ml

4.2.5 หลอดแก้วพร้อมฝาปิด ขนาด 20 ml

4.2.6 SPE column ชนิด C18: ก่อนใช้งาน ปรับสภาวะด้วย CH_3CN ปริมาตร 5 ml ตามด้วยสารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) ปริมาตร 5 ml ระวังอย่าให้ column แห้งและต้องใช้งานทันที

4.2.7 Regenerated cellulose (RC) syringe filters pore size 0.45 μm

5. สารเคมี (Reagent)

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

5.1 Acetonitrile, CH_3CN

5.1.1 สารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (6:4)

5.1.2 สารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1)

5.1.3 สารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

5.2 สารมาตรฐาน (Standards)

5.2.1 สารมาตรฐาน TCP ความบริสุทธิ์มากกว่า ร้อยละ 99

5.2.2 สารละลายมาตรฐาน TCP ความเข้มข้น 1,000 mg/L : ชั่งสารมาตรฐาน TCP น้ำหนัก 0.1000 g ละลายด้วย CH_3CN และปรับปริมาตรเป็น 100 ml ถ่ายใส่ขวดสีชา ปิดฝา เก็บในตู้เย็น อายุการใช้งานไม่เกิน 3 เดือน

5.2.3 สารละลายมาตรฐาน TCP ความเข้มข้น 100 mg/L : ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน TCP ความเข้มข้น 1,000 mg/L ปริมาตร 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml เติม CH_3CN 5 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O ถ่ายใส่ขวดสีชาปิดฝา เก็บในตู้เย็นอายุการใช้งานไม่เกิน 3 เดือน

5.2.4 สารละลายมาตรฐาน TCP เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 และ 14.0 mg/L : ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน TCP ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 200, 400, 600, 800 μl และ 1, 1.2, 1.4 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (6:4) เตรียมก่อนใช้งาน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ใช้เฉพาะส่วนของพลาสติก ที่ต้องการวิเคราะห์ คัดให้ละเอียด ขนาดไม่เกิน 0.5 cm^2

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่างที่ตัดเตรียมไว้ น้ำหนัก 0.500 g ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 ml เติม CH_3CN ปริมาตร 25 ml ปิดฝา นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ $40 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 24 hr เขย่าเป็นครั้งคราว เมื่อครบเวลาแล้วนำออกมาจากอ่างน้ำร้อน วางไว้ให้เย็น

7.2 การเตรียมสารละลาย test portion

7.2.1 ปิ่เปิดสารละลายตัวอย่าง (7.1) ปริมาตร 5 ml ใส่ในหลอดแก้วเดิม H_2O ปริมาตร 5 ml ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน ถ่ายปริมาตรทั้งหมดลงใน SPE column ที่ปรับสภาวะแล้ว และล้างหลอดแก้วด้วยสารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) ปริมาตร 0.2 ml ใส่ลงไปใน SPE column ปลอ่ยให้สารละลายไหลออกไปจนเกือบหมด ระวังอย่าให้ SPE column แห้ง

7.2.2 elute โดยใส่สารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1) ปริมาตร 10 ml เก็บสารละลายทั้งหมดเป็น test portion

7.2.3 กรอง test portion ด้วยเยื่อกรองชนิด RC pore size $0.45\ \mu\text{m}$

7.3 การตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC-PDA

7.3.1 สภาวะเครื่องมือ ประกอบด้วย (สภาวะเครื่องมือสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม)

analytical column: phenyl silica; $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$ พร้อม guard column

mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (6:4)

flow rate: $1.0\ \text{ml/min}$

injection volume: $50\ \mu\text{l}$

oven temperature: 50°C

PDA mode: Lamp type D2, wavelength $264\ \text{nm}$, bandwidth $4\ \text{nm}$, cell temp 50°C

7.3.2 การตรวจสอบ system suitability ก่อนการวิเคราะห์ โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นที่ระดับช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ไม่น้อยกว่า 5 ครั้ง คำนวณ %RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์ยอมรับ %RSD (peak area) $\leq 5\%$ และ %RSD (RT) $\leq 2\%$ และ tailing factor ≤ 2

7.3.3 การ verify กราฟมาตรฐานและความพร้อมของเครื่องระหว่างทำการวิเคราะห์ โดยฉีดสารละลาย มาตรฐาน TCP ที่ความเข้มข้นระดับช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ไม่น้อยกว่า 1 ครั้ง ก่อนการวิเคราะห์ ทุก 10 % ของตัวอย่าง และ

หลังการวิเคราะห์ ปริมาณ TCP ที่คำนวณได้ต้องอยู่ในช่วง $\leq 5\%$ ของความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่ฉีด

7.3.3 สร้างกราฟมาตรฐาน TCP ที่ระดับความเข้มข้น ตามข้อ 5.2.4 ค่า R^2 ต้อง ≥ 0.995

7.3.4 วัดปริมาณ TCP โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7.3.5 กรณีที่ปริมาณ TCP สูงกว่ากราฟมาตรฐานให้เจือจางสารละลายตัวอย่าง ด้วย CH_3CN แล้วปฏิบัติตามข้อ 7.2 จนสามารถวัดปริมาณ TCP ในช่วงกราฟมาตรฐานได้

7.4 การวิเคราะห์ spiked sample ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเติมสารละลายมาตรฐาน TCP ลงในตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ TCP (mg/kg)} = \frac{A \times V \times F}{W}$$

เมื่อ A (mg/L) คือ ความเข้มข้นของ TCP ที่อ่านได้ใน test portion

V (ml) คือ ปริมาตรของ test portion

F คือ dilution factor (= 5)

W (g) คือ น้ำหนักตัวอย่าง

8.2 การรายงานผล

รายงานปริมาณที่ตรวจพบหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์ และ recovery ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 80-110 %

9.2 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกตัวอย่าง และ % RPD ต้องอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 20 %

10. รายละเอียดอื่น

วิธีวิเคราะห์นี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 75 mg/kg

ขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 200 mg/kg

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. นายทงนงพันธ์ สัจจปาละ | ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต
(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) |
| 2. นางลดาพรรณ แสงกล้า | รักษาการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐาน
ของอาหาร(นักวิทยาศาสตร์การแพทย์) |
| 3. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 4. นางสาวอรุณี ศรีพรหม | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 5. นางสาวมณฑนา พันธุ์บัวหลวง | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 6. นายสมภพ วัฒนมณี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 7. นางสาวกรรณา ศิริสมิทธิ์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 8. นางปิยมาศ แจ่มศรี | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 9. นางสาวปัทมา แดงชาติ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 10. นางนิตยา สุนทรชื่น | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 11. นางศศิธร ฐิติเพชรกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

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

Abbreviation	Word/คำเต็ม
AnO ₂	Anaerobic condition
CFU	colony forming unit
MPN	most probable number

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 2026	อาหาร	<i>Staphylococcus aureus</i>	I	97
DMSc F 2027	น้ำและน้ำแข็ง	<i>Staphylococcus aureus</i>	I	119
DMSc F 2028	น้ำและน้ำแข็ง	fecal enterococci และ fecal streptococci	I	133
DMSc F 2029	นมเปรี้ยว	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> และ <i>Streptococcus thermophilus</i>	I	151

DMSc F 2026: การวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

Analytical method of *Staphylococcus aureus* in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (References)

- 2.1 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001; updated March 2016. Chapter 12 “*Staphylococcus aureus*”. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 19 มกราคม 2560]. เข้าถึงได้ที่
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>.
- 2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2010; updated April 2015, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. [ออนไลน์]. 2010; [สืบค้น 19 มกราคม 2560]. เข้าถึงได้ที่
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- 3.1 Coagulase plasma = Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
- 3.2 *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

4. หลักการ (Principle)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10% สามารถย่อย tellurite, lecithin และสร้าง enzyme coagulase เมื่อเติม pyruvate ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อ *S. aureus* ที่บดเจือปนและแข็งแรงขึ้น

4.1 การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

- 4.1.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth)
- 4.1.2 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar)
- 4.1.3 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันทางชีวเคมี

4.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) มี 2 วิธีคือ

4.2.1 วิธี MPN

นำตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสมอย่างน้อย 3 ระดับ ปิเปิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว ระดับละ 3 หลอด กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นให้ขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งและตรวจยืนยันทางชีวเคมี

4.2.2 วิธี spread plate

นำตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปิดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้งนำไปบ่ม นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันทางชีวเคมี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Baird-Parker medium (BP)
- 5.1.2 Brain heart infusion (BHI) broth
- 5.1.3 Phenol red glucose broth
- 5.1.4 Phenol red mannitol broth
- 5.1.5 Toluidine blue-deoxyribonucleic acid (T-DNA) agar
- 5.1.6 Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

- 5.1.7 Trypticase (tryptic) soy broth containing 10% NaCl and 1% sodium pyruvate (TSB 10% NaCl)
- 5.1.8 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPB)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
- 5.2.2 Gram stain reagents
- 5.2.3 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) $118\pm 3^\circ C$ และ $121\pm 3^\circ C$
- 6.1.2 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)
- 6.1.3 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)
- 6.1.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) $35-37^\circ C$
- 6.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.7 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $44-50^\circ C$

6.2 อุปกรณ์

- 6.2.1 ขวดรูปخمพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว
- 6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.3 แท่งแก้วอ (glass spreader)
- 6.2.4 ห่วงและเข็มเข็มเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.6 ปิเปต (pipette)
- 6.2.7 หลอดทดสอบ (test tube)
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดสอบ (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง คัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวชั้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม (กรณีมีตัวอย่างน้อยกว่า 50 กรัม ให้ใช้ตัวอย่างครึ่งหนึ่ง) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาณเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตามลำดับๆ ละ 10 เท่า (serial ten fold) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจางดังนี้

- 7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร หรือปริมาตร 9 เท่าลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่น 30-60 วินาที หรือเครื่องคั้นผสมอาหาร 2 นาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (initial suspension หรือ primary dilution)
- 7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10
- 7.2.3 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ

7.3 การตรวจหา (detection): ภาควง 2

- 7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ใน TSB 10% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 หลอด
- 7.3.2 บ่มที่ 35-37°C 48±2 ชั่วโมง

7.3.3 กรณีที่พบเชื้อเจริญ(หลอดขุน) ให้ขีดบนจานเพาะเชื้อ BP agar

7.3.4 บ่มที่ 35-37°C 45-48 ชั่วโมง

7.3.5 เชื้อโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยแต่ละลักษณะ
จำนวนมากกว่า 1 โคโลนี ไปตรวจยืนยัน

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ กลม บูน สีเทาถึงสีดำ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร

มีโซนรอบโคโลนี อาจมีโซนใสชั้นนอก

อาหารหลายประเภท และผลิตภัณฑ์นม อาจพบ nonlipolytic strain
ที่ไม่ให้โซนขุน และใสรอบโคโลนี สำหรับอาหารแช่แข็งหรือ
อาหารแห้งที่เก็บไว้นาน พบโคโลนีที่มีสีดำน้อยกว่า อาจมีผิว
ขรุขระและแห้ง

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี MPN: ภาคผนวก 3

7.4.1 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 7.2 ที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ
1:1,000 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม อย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน
ปิเปต 1 มิลลิลิตรลงใน TSB 10% NaCl 10 มิลลิลิตร ระดับความ
เจือจางละ 3 หลอด

7.4.2 เหมือนข้อ 7.3.2-7.3.5

7.5 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 4

7.5.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ
ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้า BP agar จำนวน 3 จาน
เพาะเชื้อ (0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) ต่อระดับความเจือจาง กรณีที่
คาดว่าตัวอย่างมี *S. aureus* จำนวนมาก ปิเปตสารละลายตัวอย่างลงบน
ผิวหน้า BP agar จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ (0.1 และ 0.1 มิลลิลิตร) ใช้
แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง

7.5.2 บ่มที่ 35-37°C 45-48 ชั่วโมง

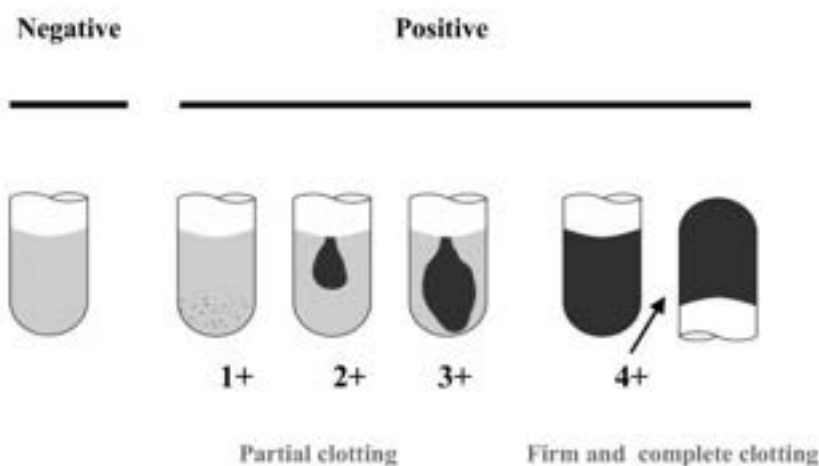
7.5.3 นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ (ข้อ 7.3.5) 20-200 โคโลนี กรณีที่มีโคโลนีหลายลักษณะ ให้นับและบันทึกจำนวนโคโลนีแต่ละลักษณะ

7.5.4 เชียเชื้อจากข้อ 7.5.3 ลักษณะละมากกว่า 1 โคโลนี นำไปตรวจยืนยันต่อไป

7.6 การตรวจยืนยัน

7.6.1 Coagulase test

เชียโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะลงใน BHI 0.2-0.3 มิลลิลิตรและ TSA slant บ่มที่ 35-37°C 18-24 ชั่วโมง (เก็บ TSA slant ที่อุณหภูมิห้องเพื่อตรวจวิเคราะห์เพิ่มหรือทดสอบ coagulase ซ้ำ กรณีผลการทดสอบมีปัญหา) เติม coagulase plasma (rabbit) with EDTA 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 35-37°C สังเกตการจับตัวกันเป็นลิ่ม (clot) ในหลอด (รูปที่ 1) เป็นระยะๆ ภายใน 6 ชั่วโมง ในกรณีที่จับเป็นลิ่มแข็ง คือแข็งหรือคว่ำหลอดแล้วยังอยู่ในสภาพเดิม (4+) สรุปรว่าพบ *S. aureus* แต่กรณีที่จับเป็นลิ่มบางส่วนในระดับ 1+, 2+ และ 3+ ให้ตรวจวิเคราะห์เพิ่มตามรายการในข้อ 7.6.2



รูปที่ 1 แสดงชนิดปฏิกิริยาการจับตัวกันเป็นลิ่มในหลอดของการทดสอบ coagulase

7.6.2 การตรวจวิเคราะห์เพิ่ม (Ancillary tests):

เชื้อเชื้อจาก TSA slant (ข้อ 7.6.1) ทดสอบเพิ่มดังนี้

♦ ย้อมสีแกรม

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปร่างกลม เกาะกันเป็นคู่ หรือเป็นกลุ่มคล้ายรวงงู (ขนาดไม่แน่นอน)

♦ Catalase test

เชื้อเชื้อและบนแผ่นกระຈก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้

♦ Carbohydrate utilization

เชื้อเชื้อลงใน phenol red glucose broth และ phenol red mannitol broth หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่มี glucose และ mannitol ตามความเหมาะสม บ่ม AN_2 ที่ $35-37^{\circ}C$ 5 วัน

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้

♦ Thermostable nuclease production

❖ หยด T-DNA agar 3 มิลลิตร ลงบนผิวหน้าแผ่นกระຈก ปล่อยให้แห้ง เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (10-12 หลุมต่อแผ่น)

❖ เลี้ยงเชื้อใน BHI บ่มที่ $35-37^{\circ}C$ 18-24 ชั่วโมง คัมเดือด 15 นาที

❖ ปิเปตเชื้อ 0.01 มิลลิตร ลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มที่ $35-37^{\circ}C$ 4 ชั่วโมง ใน moist chamber

ผลบวก: เกิดโซนสีชมพูล้อมรอบหลุม

ขนาดกว้างอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร

ผลลบ: ไม่เกิดโซนล้อมรอบหลุม

S. aureus ให้ผลบวก

8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 การคำนวณปริมาณ (MPN)

8.1.1 นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก เปรียบเทียบกับตาราง MPN (ภาคผนวก 5) จะได้ค่า MPN/ กรัม และช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับ 95% (95% confidence intervals)

8.1.2 กรณีจำนวนหลอดบวกไม่เป็นไปตามตาราง MPN ให้ใช้สูตรคำนวณ (Thomas, 1942) ดังนี้

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

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

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

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

ให้เลือกระดับความเชื่อใจสำหรับการคำนวณ โดยเลือกระดับความเชื่อใจต่ำสุด ที่ให้ผลบวกไม่ครบทุกหลอด แล้วเลือกระดับความเชื่อใจสูงสุดที่มีผลบวกอย่างน้อย 1 หลอด จากนั้นเลือกทุกระดับความเชื่อใจที่อยู่ระหว่างสองระดับที่เลือกไว้แล้ว ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่างที่ 1 ระดับความเชื่อใจ 1:1 1:10 1:100 1:1,000 1:10,000

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 5/5 10/10 4/10 2/10 0/5

ในที่นี้ เลือกสองระดับความเชื่อใจ 1:100 และ 1:1,000 จะได้

$$\Sigma g_j = 6$$

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

$$\begin{aligned} \Sigma t_j m_j &= (10 \times 0.01) + (10 \times 0.001) \\ &= 0.11 \end{aligned}$$

แทนค่าในสูตร

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

ตัวอย่างที่ 2 ระดับความเจือจาง 1:10 1:100 1:1,000

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 2/3 0/3 3/3

ในที่นี้ เลือกทั้งสามระดับความเจือจาง จะได้

$$\Sigma g_j = 5$$

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

$$\begin{aligned}\Sigma t_j m_j &= (3 \times 0.1) + (3 \times 0.01) + (3 \times 0.001) \\ &= 0.333\end{aligned}$$

แทนค่าในสูตร

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

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

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

standard error คำนวณได้จาก Excel spreadsheet ตามเอกสารอ้างอิงข้อ 2.2

ตัวอย่าง ระดับความเจือจาง 1:10 1:100 1:1,000

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก 2/3 0/3 3/3

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

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

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

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

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

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

ตัวอย่าง	ระดับความเจือจาง	1: 1,000	1:10,000	1:100,000
	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	3/3	2/3	1/3
	ดังนั้น ค่าที่อ่านได้จากตาราง	= 150		
	ระดับความเจือจางกลาง	= 10,000		
	∴ MPN/ กรัม	= 150 x 10,000		
		100		
		= 15,000		

8.2 การคำนวณปริมาณ (spread plate)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและนำไปตรวจยืนยันปรากฏว่าเป็น *S. aureus* บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น *S. aureus* ไปคูณจำนวนที่นับได้ และคูณด้วย dilution factor

ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ = 65 โคโลนี ที่ระดับการเจือจาง 1:10,000
ตรวจยืนยันพบว่าเป็น *S. aureus* 4 จาก 5 โคโลนี ดังนั้น
S. aureus CFU/ กรัมหรือมิลลิลิตร = 65 x (4/5) x 10,000
= 520,000

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

S. aureus / น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) รายงานเป็น

9.2.1 *S. aureus* MPN/ น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือมิลลิลิตร)

- 9.2.2 จำนวน *S. aureus* CFU/ น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัมหรือ มิลลิลิตร)
- 9.2.3 กรณีไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะหรือยืนยันแล้วไม่ใช่ *S. aureus*
- ◆ ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร
รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ
 - ◆ ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 0.1 มิลลิลิตร
รายงานเป็น น้อยกว่า 1 x ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ x 10

10. รายละเอียดอื่น

- 10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
- 10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *S. aureus* ในอาหาร
- 10.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) *S. aureus* ในอาหาร โดยวิธี MPN
- 10.4 ภาคผนวก 4: แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *S. aureus* ในอาหาร โดยวิธี spread plate
- 10.5 ภาคผนวก 5: ตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์เพิ่ม (Ancillary tests)
ตารางที่ 2 MPN 3-3-3



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Baird-Parker medium (BP)

1.1 Base medium

Tryptone	10 กรัม
Beef extract	5 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
Sodium pyruvate	10 กรัม
Glycine	12 กรัม
Lithium chloride.6H ₂ O	5 กรัม
Agar	20 กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 950 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar

ละลาย นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0±0.2

1.2 Enrichment

1.2.1 1% potassium tellurite solution

potassium tellurite trihydrate	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100 มิลลิลิตร

ละลาย potassium tellurite trihydrate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

1.2.2 Egg yolk emulsion

ล้างเปลือกไข่สดให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol 1 ชั่วโมง ตอกไข่ด้วยวิธี aseptic technique เตรียม egg yolk emulsion ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยนำส่วนของไข่แดงใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ 15 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 35 มิลลิลิตร (ไข่แดง : น้ำเกลือ = 3 : 7) เติม 1% potassium tellurite solution (ข้อ 1.2.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงใน egg yolk emulsion 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

การใช้งาน

เติม warmed enrichment 50 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 1.1) 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ

2. Brain heart infusion (BHI) broth

สูตร 1

Calf brain, infusion from	200	กรัม
Beef heart, infusion from	250	กรัม
Proteose peptone (Difco) or polypeptone (Bioquest)	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C

15 นาที pH 7.4 ± 0.2

สูตร 2

Brain heart-infusion	6	กรัม
Peptic digest of animal tissue	6	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	3	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	14.5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C
15 นาที pH 7.4 ± 0.2

3 Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPB)

3.1 Stock solution

KH_2PO_4	34	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	500	มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร ปรับเป็น pH
7.2 ด้วย 1N NaOH (NaOH 40 กรัม ละลายน้ำ และเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร) ปรับ
ปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อ 121°C 15 นาที

3.2 Diluent

ปิเปต stock solution (ข้อ 3.1) 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วย
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปิเปตใส่หลอดทดลองหรือขวดตามปริมาณที่ต้องการและ
นำไปฆ่าเชื้อ 121°C 15 นาที

4. Phenol red glucose broth

Proteose peptone No. 3	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Beef extract (optional)	1	กรัม
Dextrose	5	กรัม
Phenol red (7.2 ml of 0.25% solution)	0.018	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการ นำนึ่งที่ 118°C 10 นาที pH 7.4±0.2

5. Phenol red mannitol broth

Proteose peptone No. 3	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Beef extract (optional)	1	กรัม
Mannitol	5	กรัม
Phenol red (7.2 ml of 0.25% solution)	0.018	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการ นำนึ่งที่ 118°C 10 นาที pH 7.4±0.2

6. Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

Trypticase peptone	15	กรัม
Phytone peptone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

7. Toluidine blue-deoxyribonucleic acid (T-DNA) agar

Deoxyribonucleic acid (DNA)	0.3	กรัม
Agar	10	กรัม
CaCl ₂ (anhydrous)	1.1	มิลลิกรัม
NaCl	10	กรัม
Toluidine blue O	0.083	กรัม
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร pH 9.0 เติมน้ำกลั่น
 ส่วนประกอบอื่นๆ ลงไป ยกเว้น toluidine blue O ให้ความร้อนจน agar ละลาย และ
 ละลาย toluidine blue O ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ หากใช้ทันทีไม่จำเป็นต้อง sterile หาก
 เชื้อสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 4 เดือน

8. Trypticase (tryptic) soy broth containing 10% NaCl and 1% Sodium Pyruvate
(TSB 10% NaCl)

Trypticase or tryptose (pancreatic digest of casein)	17	กรัม
Phytone (papain digest of soya meal)	3	กรัม
NaCl	100	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

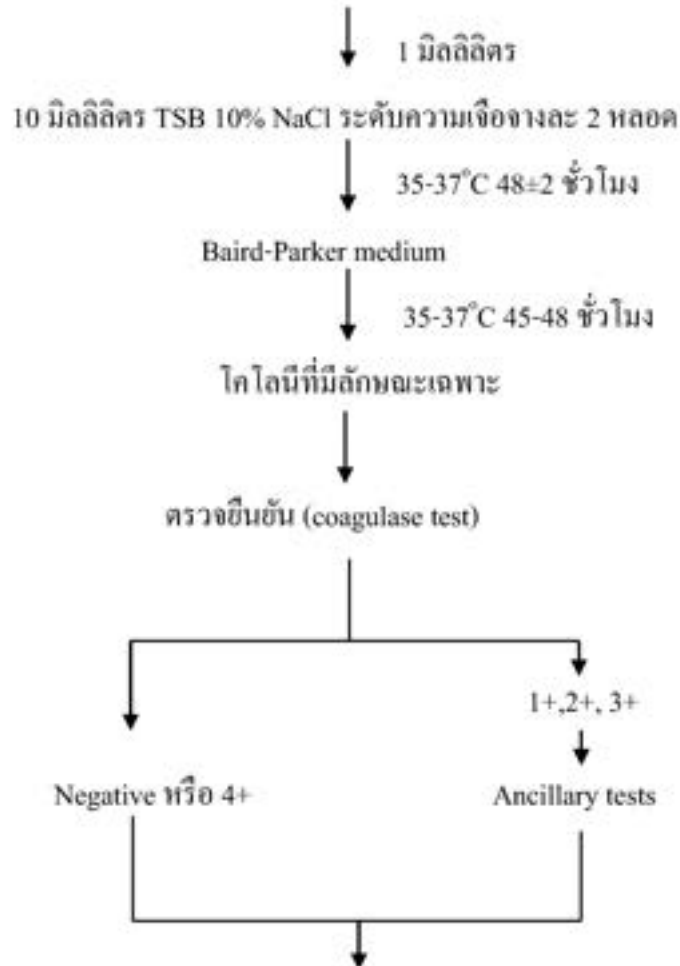
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการ นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3±0.2

สารเคมี

1. Coagulase plasma (rabbit) with EDTA ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป
3. 3 % hydrogen peroxide solution ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2

ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100, ...)



รายงานผล

แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *S. aureus* ในอาหาร

ภาคผนวก 3

ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100,...)

↓ 1 มิลลิลิตร

10 มิลลิลิตร TSB 10% NaCl ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

↓ 35-37°C 48±2 ชั่วโมง

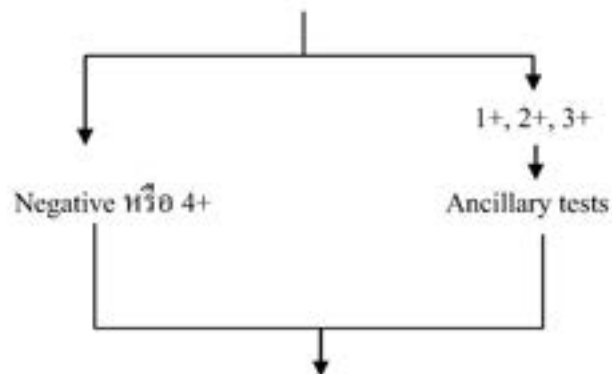
Baird-Parker medium

↓ 35-37°C 45-48 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ



ตรวจยืนยัน (coagulase test)



เปรียบเทียบตาราง MPN

คำนวณและรายงานผล

แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) *S. aureus* ในอาหารโดยวิธี MPN

ภาคผนวก 4

ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100, ...)

0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร

หรือ 0.1, 0.1 มิลลิลิตร

Baird-Parker medium

35-37°C 45-48 ชั่วโมง

นับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ (20-200 โคโลนี)

ตรวจซีเนซัน (coagulase test)

Negative หรือ 4+

1+, 2+, 3+

Ancillary tests

คำนวณและรายงานผล

แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *S. aureus* ในอาหาร โดยวิธี spread plate

ภาคผนวก 5

ตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* เพิ่ม (Ancillary tests)

Tests	Result
Catalase test	+
Anaerobic utilization	
glucose	+
mannitol	+
Thermonuclease production	+



ตารางที่ 2 MPN 3-3-3

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

DMSc F 2027: การวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำและน้ำแข็ง

Analytical method of *Staphylococcus aureus* in water and ice

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในน้ำและน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจหา (detection) ด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน (membrane filtration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative references)

- 2.1 American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington DC.; 2012. 9213 B, p. 9-44 - 9-45.
- 2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001; update March 2016, Chapter 12 “*Staphylococcus aureus*”. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 19 มกราคม 2560]. เข้าถึงได้ที่ <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429>.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- | | | |
|----------------------|---|---|
| 3.1 Coagulase plasma | = | Coagulase plasma (rabbit) with EDTA |
| 3.2 <i>S. aureus</i> | = | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 3.3 μ | = | ไมครอน (micron) หรือ ไมโครเมตร (micrometer) |

4. หลักการ (Principle)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10% สามารถย่อย tellurite, lecithin และสร้าง enzyme coagulase การตรวจหา (detection) ทำได้ 2 วิธี คือ

4.1 วิธี Single-plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 1 ชนิด

เป็นวิธีที่ใช้เทคนิคการกรองตัวอย่างน้ำผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.22 μ (เนื่องจากมีรายงานว่า *S. aureus* ที่เครียด (stress) จากคลอรีนในน้ำอาจหดตัวและสามารถลอดผ่านแผ่นกรองเมมเบรนที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 μ ได้ จึงใช้แผ่นกรองที่มีขนาดเล็กลง) หลังกรองน้ำผ่านแผ่นกรองไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง หลังจากบ่มเพาะเชื้อ นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยัน

4.2 วิธี Two-plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง 2 ชนิด

เป็นขั้นตอนที่ใช้เทคนิคการกรองตัวอย่างน้ำผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.22 μ หลังกรองน้ำผ่านแผ่นกรองเมมเบรนไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่เค็มสารยับยั้ง แล้วบ่มข้ามคืนเพื่อให้ *S. aureus* ที่เครียด (stress) จากคลอรีนฟื้นตัว จากนั้นยกแผ่นกรองเมมเบรนไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง หลังจากบ่มเพาะเชื้อ นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยัน

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Baird-Parker medium (BP)
- 5.1.2 Brain heart infusion (BHI) broth
- 5.1.3 Phenol red glucose broth
- 5.1.4 Phenol red mannitol broth
- 5.1.5 R2A agar
- 5.1.6 Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
- 5.2.2 Gram stain reagents
- 5.2.3 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.1.2 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)
- 6.1.3 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ และ $35-37^{\circ}\text{C}$
- 6.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)
- 6.1.6 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) $44-50^{\circ}\text{C}$
- 6.1.7 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)
- 6.1.8 เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) 220 โวลต์ 50 เฮิร์ตซ์

6.2 เครื่องใช้

- 6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 6.2.2 แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร, pore size $0.22\ \mu$
- 6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)
- 6.2.4 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)
- 6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)
- 6.2.7 forceps ปากแบนและผิวเรียบ
- 6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

- 7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาณเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาณอื่นที่ต้องการทดสอบ
- 7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง เทตัวอย่างจากแต่ละหน่วยภาชนะบรรจุ ใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำให้ตัวอย่างละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาณอื่นที่ต้องการทดสอบ

7.2 การตรวจหา (detection): วิธี Single-plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็ง 1 ชนิด (ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1)

7.2.1 เตรียมชุดกรองเมมเบรน

7.2.2 ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อที่มีรู (pore size) ขนาด $0.22\ \mu$ 1 แผ่นวางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาด วางกรวยกรองรับน้ำ ครอบบนฐาน รองรับกระดาดให้สนิท

7.2.3 เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร (หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ) ลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ แล้วปิดฝาครอบ

7.2.4 เปิดเครื่องดูดสูญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.2.5 ล้างรอบกรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร และปิดฝาครอบ จากนั้นเปิดเครื่องดูดสูญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.2.6 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองเมมเบรนวางบนจานเพาะเชื้อ BP agar ระวังอย่าให้มีอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปหมัก $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 4 ชั่วโมง

7.2.7 เช็ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยแต่ละลักษณะ จำนวนมากกว่า 1 โคโลนี ไปตรวจยืนยัน

- ◆ โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* คือ กลม นูน ผิวเรียบ สีเทาถึงสีดำ *S. aureus* สามารถย่อยไข่แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารวุ้นในบริเวณที่เจริญ สังเกตได้โดยยกแผ่นเมมเบรนขึ้น

7.3 การตรวจหา (detection): วิธี Two-plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็ง 2 ชนิด (ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 2)

7.3.1 เตรียมชุดกรองเมมเบรน

7.3.2 ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนที่มีรู (pore size) ขนาด $0.22\ \mu$ ปราศจากเชื้อ 1 แผ่นมาวางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาด วางกรวยกรองรับน้ำครอบบนฐาน รองรับกระดาดให้สนิท

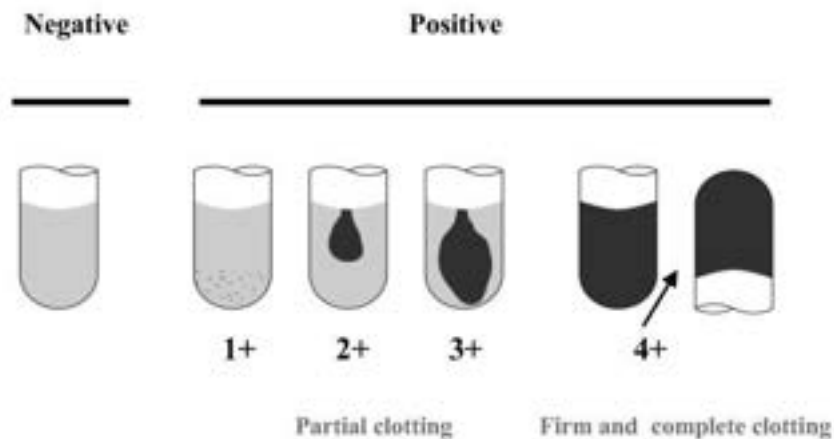
7.3.3 เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร (หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ) ลงในกรวยกรอง โดยวิธีปราศจากเชื้อ แล้วปิดฝาครอบ

- 7.3.4 เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง
- 7.3.5 ล้างรอบกรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่า ประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ และเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง
- 7.3.6 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองเมมเบรนวางบนจานเพาะเชื้อ R2A agar (ระวังอย่าให้มีอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อ) แล้วนำไปบ่มที่ $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ชั่วโมง
- 7.3.7 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองเมมเบรนจากจานเพาะเชื้อ R2A agar มาวางบนจานเพาะเชื้อ BP agar (ระวังอย่าให้มีอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อ) แล้วนำไปบ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ต่ออีก 24 ชั่วโมง
- 7.3.8 เชียโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยจำนวนมากกว่า 1 โคโลนีไปตรวจยืนยัน
- ♦ โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* คือ กลม นูน ผิวเรียบ สีเทาถึงสีดำ
- S. aureus* สามารถย่อยไข่แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารวุ้นในบริเวณที่เจริญ สังเกตได้โดยยกแผ่นเมมเบรนขึ้น

7.4 การตรวจยืนยัน

7.4.1 Coagulase test :

เชียโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะลงใน BHI 0.2-0.3 มิลลิลิตรและ TSA slant บ่มที่ $35-37^{\circ}\text{C}$ 18-24 ชั่วโมง (เก็บ TSA slant ที่อุณหภูมิห้องเพื่อตรวจวิเคราะห์เพิ่มหรือทดสอบ coagulase ซ้ำ) เติม coagulase plasma (rabbit) with EDTA 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ $35-37^{\circ}\text{C}$ สังเกตการจับตัวกันเป็นลิ่ม (clot) ในหลอด (รูปที่ 1) เป็นระยะๆ ภายใน 6 ชั่วโมง ในกรณีที่จับเป็นลิ่มแข็ง คือเอียงหรือคว่ำหลอดแล้วยังอยู่ในสภาพเดิม (4+) สรุปว่าพบ *S. aureus* แต่กรณีที่เป็นลิ่มบางส่วนในระดับ 1+, 2+ และ 3+ ให้ตรวจวิเคราะห์เพิ่มตามรายการในข้อ 7.4.2



รูปที่ 1 แสดงชนิดปฏิกิริยาการจับตัวกันเป็นลิ่มในหลอดของการทดสอบ coagulase

7.4.2 การตรวจวิเคราะห์เพิ่ม (Ancillary tests):

เชื้อเชื้อจาก TSA slant (ข้อ 7.4.1) ทดสอบเพิ่มดังนี้

♦ ย้อมสีแกรม

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปกลม เกาะกันเป็น
คู่หรือเป็นกลุ่มคล้ายรวงอู่น (ขนาดไม่แน่นอน)

♦ Catalase test

เชื้อเชื้อแต่ละบนแผ่นกระจก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่
เกิดขึ้น

ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้

♦ Carbohydrate utilization

เชื้อเชื้อลงใน phenol red glucose broth และ phenol red mannitol
broth หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่มี glucose และ mannitol ตาม
ความเหมาะสม บ่ม AN_2 ที่ $35-37^\circ C$ 5 วัน

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้

8. การคำนวณ (Calculation of results)

-

9. การรายงานผลการทดสอบ (Expression of results)

S. aureus / 100 มิลลิลิตรหรือปริมาตรที่ทดสอบ พบหรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาควิชา 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาควิชา 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *Staphylococcus aureus*
ในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี Single-plate

10.3 ภาควิชา 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) *Staphylococcus aureus*
ในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี Two-plate



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Baird-Parker medium (BP)

1.1 base medium

Tryptone	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Lithium chloride.6H ₂ O	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 950 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar

ละลาย นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0±0.2

1.2 enrichment

1.2.1 1% potassium tellurite solution

potassium tellurite trihydrate	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย potassium tellurite trihydrate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

1.2.2 Egg yolk emulsion

ล้างเปลือกไข่สดให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol 1 ชั่วโมง ตอกไข่ด้วยวิธี aseptic technique เตรียม egg yolk emulsion ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยนำส่วนของไข่แดงใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ 15 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 35 มิลลิลิตร (ไข่แดง : น้ำเกลือ = 3 : 7) เติมน้ำ

1% potassium tellurite solution (ข้อ 1.2.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงใน
egg yolk emulsion 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

การใช้งาน

เติม warmed enrichment 50 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 1.1) 950
มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ

2. Brain heart infusion (BHI) broth

สูตร 1

Calf brain, infusion from	200	กรัม
Beef heart, infusion from	250	กรัม
Proteose peptone (Difco) or polypeptone (Bioquest)	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C

15 นาที pH 7.4 ± 0.2

สูตร 2

Brain heart-infusion	6	กรัม
Peptic digest of animal tissue	6	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	3	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	14.5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C

15 นาที pH 7.4 ± 0.2



3. Phenol red glucose broth

Proteose peptone No. 3	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Beef extract (optional)	1	กรัม
Dextrose	5	กรัม
Phenol red (7.2 ml of 0.25% solution)	0.018	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการ นำเชื้อที่ 118°C 10 นาที pH 7.4±0.2

4. Phenol red mannitol broth

Proteose peptone No. 3	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Beef extract (optional)	1	กรัม
Mannitol	5	กรัม
Phenol red (7.2 ml of 0.25% solution)	0.018	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตาม
ปริมาณที่ต้องการ นำเชื้อที่ 118°C 10 นาที pH 7.4±0.2

5. R2A agar

Yeast extract	0.5	กรัม
Proteose peptone No. 3 or polypeptone	0.5	กรัม
Casamino acid	0.5	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
Soluble starch	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
Sodium pyruvate	0.3	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar
ละลาย นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2±0.2

6. Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

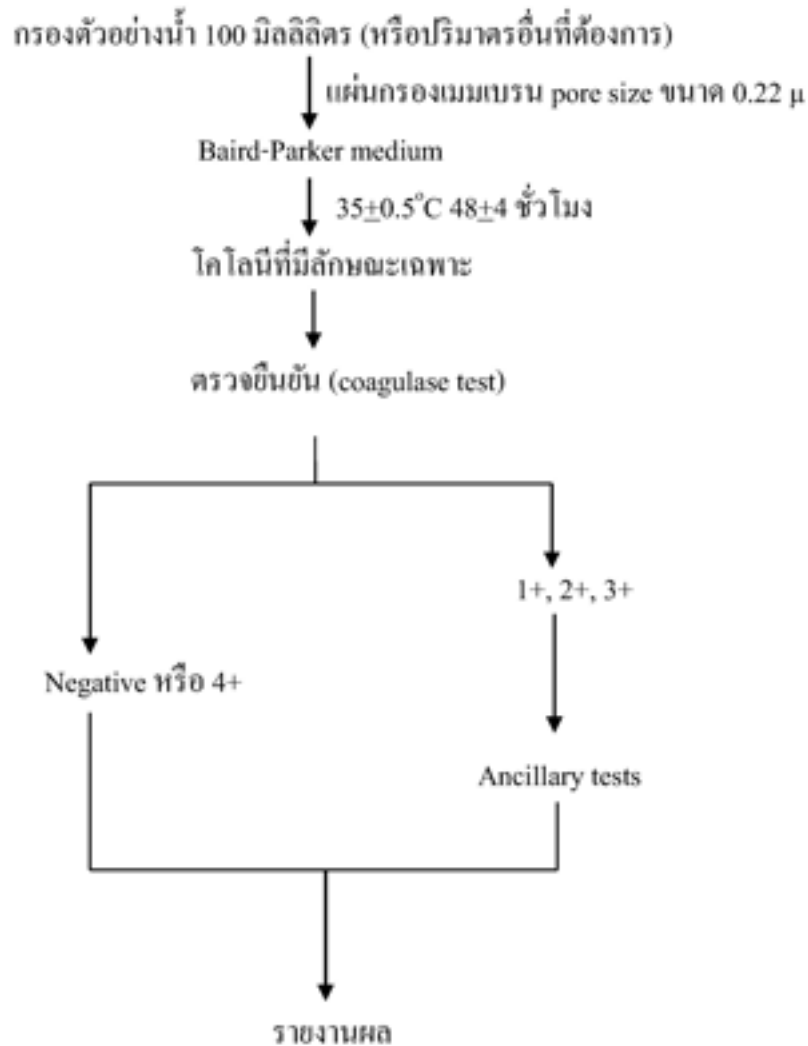
Trypticase peptone	15	กรัม
Phytone peptone	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

สารเคมี

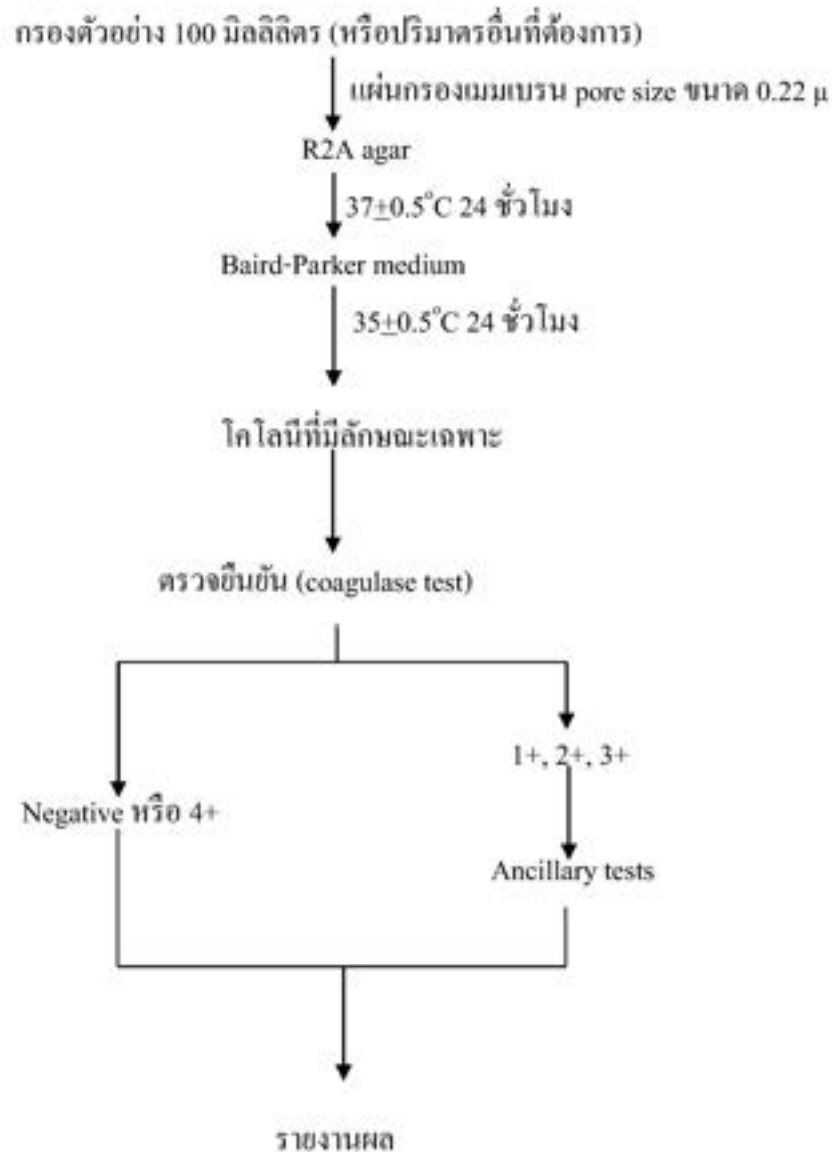
1. Coagulase plasma (rabbit) with EDTA ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. 3 % Hydrogen peroxide solution ใช้ชนิดสำเร็จรูป
3. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *Staphylococcus aureus* ในน้ำและน้ำแข็ง
โดยวิธี Single-plate

ภาคผนวก 3



แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) *Staphylococcus aureus* ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี

Two-plate

**DMSc F 2028: การวิเคราะห์ Fecal enterococcus และ Fecal streptococcus ในน้ำ
และน้ำแข็ง**

**Analytical method of Fecal enterococcus and Fecal streptococcus in
water and ice**

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่ม fecal enterococci และ fecal streptococci ใน
น้ำและน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)
ด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of
Water and Wastewater. 22nd ed. Washington DC; 2012. 9230.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 <i>S. equinus</i>	=	<i>Streptococcus equinus</i>
3.2 <i>S. bovis</i>	=	<i>Streptococcus bovis</i>
3.3 <i>E. columbae</i>	=	<i>Enterococcus columbae</i>
3.4 <i>E. cecorum</i>	=	<i>Enterococcus cecorum</i>
3.5 <i>E. munditii</i>	=	<i>Enterococcus munditii</i>
3.6 <i>E. asini</i>	=	<i>Enterococcus asini</i>

4. หลักการ (Principle)

แบคทีเรียกลุ่ม fecal enterococci และ fecal streptococci เป็นแบคทีเรียที่พบในลำไส้ของ
คนและสัตว์เลือดอุ่น enterococci มีความทนทานต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ เชื้อใน 2 กลุ่มนี้
ติดสีแกรมบวก รูปกลม หรือกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน ส่วนใหญ่อยู่
เป็นคู่ บางครั้งเรียงต่อกันเป็นสายสั้น-ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มี
ออกซิเจน ไม่สร้างเอนไซม์ catalase fecal enterococci และ fecal streptococci เจริญได้ใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี sodium azide ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น และสามารถยีสต์ 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) ให้โคโลนีสีแดงอ่อนถึงสีแดงเข้ม สามารถแยก enterococci จาก streptococci โดยทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดเหลวที่มีเกลือ (NaCl) 6.5% การเจริญที่อุณหภูมิ 10°C บน BHI agar และที่ 45°C ใน BHI broth รวมทั้งบน bile esculin agar ปฏิกริยาการย่อย esculin จะได้ esculetin และ dextrose ซึ่ง esculetin จะไปทำปฏิกิริยากับ ferric citrate ต่อไปเกิดสีน้ำตาลดำหรือสีดำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หมายเหตุ Sodium azide เป็นสารเคมีอันตราย มีความเป็นพิษและเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสสารนี้ azide ยังสามารถสร้างสารประกอบ ที่ระเบิดได้ ถ้าสัมผัสกับท่อโลหะ

การตรวจ fecal enterococci และ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง แบ่งออกเป็น

4.1 การตรวจหา (detection)

โดยนำตัวอย่างเริ่มต้นหรือที่เจือจางตามความเหมาะสม กรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 ไมครอน หลังกรองให้น้ำผ่านกรอง ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง หลังจากบ่มเพาะเชื้อนำโคโลนีที่มี ลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี วิธีนี้ไม่ควรใช้กับตัวอย่างที่มีความขุ่นมาก

4.2 การตรวจปริมาณ (enumeration)

ปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการตรวจหา (detection) แต่นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ และนำไปตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี วิธีนี้ไม่ควรใช้กับตัวอย่างที่มีความขุ่นมาก

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Bile esculin agar

5.1.2 Brain-heart infusion (BHI) agar

5.1.3 Brain-heart infusion (BHI) broth

5.1.4 BHI broth ที่มีเกลือ 6.5% NaCl

5.1.5 EIA medium

5.1.6 mE agar

5.1.7 mEI agar

5.1.8 mEnterococcus agar

5.1.9 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ Buffered water หรือ 0.1% Peptone water

5.2 สารเคมี

5.2.1 Gram stain reagents

5.2.2 3% Hydrogen peroxide

5.2.3 Indoxyl- β -D-glucoside

5.2.4 Nalidixic acid

5.2.5 0.1N NaOH

5.2.6 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

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

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.4 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ และ $45 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

6.1.5 ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (low temperature incubator) อุณหภูมิ $10 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

6.1.6 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)

6.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.9 เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) 220 โวลต์ 50 เฮิร์ตซ์

6.1.10 เครื่องผสม (vortex mixer)

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

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 forceps ปากแบนผิวเรียบ

6.2.4 ห่วงและเข็มเย็บเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร,
pore size 0.45 μm

6.2.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.7 ปิเปต (pipette)

6.2.8 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.9 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน
เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ
ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง สุ่มตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุใส่รวมกัน
ในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำตัวอย่างให้ละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่
น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2. การตรวจหา (detection) และตรวจปริมาณ (enumeration): ภาคผนวก 2

7.2.1 เตรียมตัวอย่างผ่านชุดกรองเมมเบรน

- ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ 1 แผ่นมา
วางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาษ วางกรวยกรองรับน้ำครอบบน
ฐานรองรับกระดาษให้สนิท

- เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาณอื่นที่ต้องการใช้ทดสอบลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ แล้วปิดฝาครอบ
- เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง
- ล้างรอบๆ กรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือน้ำกรองปราศจากเชื้อ ที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ จากนั้นเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด ปิดเครื่อง และนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป โดยเลือกปฏิบัติได้ 3 วิธี ตามข้อ 7.2.2 ถึง 7.2.4 ดังนี้

7.2.2 วิธี mE

- 7.2.2.1 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.1 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mE agar ระวางอย่าให้มีฟองอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่มที่ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 4 ชั่วโมง
- 7.2.2.2 การทดสอบสารตั้งต้น (substrate test) ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.2.1 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง EIA medium บ่มที่ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 20 นาที
- 7.2.2.3 นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-60 โคโลนี โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องตากำลังขยายต่ำ (10-16 เท่า) หรืออุปกรณ์อื่น และส่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาว เพื่อช่วยให้มองเห็นได้ชัดเจน
ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci คือ โคโลนีสีชมพูถึงสีแดง เมื่อยกแผ่นกรองเมมเบรนขึ้นจะพบตะกอนสีดำ หรือสีน้ำตาลแดง ด้านหลังแผ่นกรอง

7.2.3 วิธี mEI

7.2.3.1 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคืบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.1 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mEI agar ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่มที่ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง

7.2.3.2 นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-60 โคโลนี โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องตากำลังขยายต่ำ (10-16 เท่า) หรืออุปกรณ์อื่น และส่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาว เพื่อช่วยให้มองเห็นได้ชัดเจน

ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci คือ โคโลนีมีโซนสีน้ำเงินล้อมรอบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

7.2.4 วิธี m Enterococcus

7.2.4.1 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคืบแผ่นกรองจากข้อ 7.2.1 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง mEnterococcus agar ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ คว่ำจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ 30 นาที คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 4 ชั่วโมง

7.2.4.2 นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-60 โคโลนี โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องตากำลังขยายต่ำ (10-16 เท่า) หรืออุปกรณ์อื่น และส่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาว เพื่อช่วยให้มองเห็นได้ชัดเจน

ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci คือโคโลนีสีแดงอ่อนและสีแดงเข้ม

7.2.5 การตรวจยืนยัน (Verification tests)

เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยันโดยขีดบนจานเพาะเชื้อ BHI agar เพื่อแยกโคโลนี บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง ถึง 48 ± 4 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อโคโลนีเดียวลงใน BHI broth และลงบนแผ่นกระจก (glass slide) 2 แผ่น นำ BHI broth บ่มที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 24 ± 2 ชั่วโมง นำเชือบนแผ่นกระจกทดสอบคอดังนี้

♦ การสร้างเอนไซม์ catalase

เติม 3% hydrogen peroxide 2-3 หยดลงบนเชื้อบนแผ่น
กระจก 1 แผ่น ดูการเกิดฟองก๊าซ

ผลบวก : เกิดฟองก๊าซ

ผลลบ : ไม่เกิดฟองก๊าซไม่ขุ่น

ถ้าการทดสอบให้ผลบวก แสดงว่าไม่ใช่เชื้อใน genus

Enterococcus

ไม่ต้องทดสอบต่อ

ถ้าการทดสอบให้ผลลบ ทำการทดสอบต่อดังนี้

♦ การย้อมสีแกรม

นำเชื้อบนแผ่นกระจกอีก 1 แผ่น ทำการย้อมสีแกรม

fecal enterococci และ fecal streptococci ติดสีแกรมบวก

รูปกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน ส่วน

ใหญ่อยู่เป็นคู่ หรือเรียงคั่นกันเป็นสายสั้น

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่กล่าวมาแล้ว

มาทดสอบดังนี้

♦ การย่อย esculin

เชื้อเชื้อลงบน bile esculin agar บ่มที่ $35\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 48 ± 4

ชั่วโมง

ผลบวก : มีเชื้อเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อ

เปลี่ยนเป็นสีดำอมน้ำตาล มีโซนสีน้ำตาล

ผลลบ : ไม่มีเชื้อเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไม่เปลี่ยนสี

fecal enterococci ให้ผลบวก

fecal streptococci ให้ผลลบ ยกเว้น *S. equinus* และ *S. bovis*

♦ การเจริญที่ 10°C

เชื้อเชื้อลงใน BHI agar บ่มที่ $10\pm1^{\circ}\text{C}$ 48 ± 4 ชั่วโมง

ผลบวก : มีเชื้อเจริญ

ผลลบ : ไม่มีเชื้อเจริญ

fecal enterococci ส่วนใหญ่ให้ผลบวก

fecal streptococci ส่วนใหญ่ให้ผลลบ

♦ การเจริญที่ 45°C

เชื้อเชื้อลงใน BHI broth (pre-warmed ที่อุณหภูมิ 45°C)

บ่มที่ 45±0.5°C 48±4 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

fecal enterococci ให้ผลบวก ยกเว้น *E. columbae*,

E. cecorum, *E. munditii* และ *E. saccharolyticus*

ส่วนใหญ่ให้ผลลบ

fecal streptococci ให้ผลบวก

♦ การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 6.5%

เชื้อเชื้อลงใน BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl) 6.5% บ่มที่

35±0.5°C 48±4 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

fecal enterococci ให้ผลบวก ยกเว้น *E. columbae*,

E. cecorum และ *E. asini*

fecal streptococci ให้ผลลบ

7.2.6 การแปลผล: ภาคผนวก 4

7.2.6.1 พบ fecal enterococci เมื่อผลทดสอบ catalase ให้ผลลบ ย้อมติดสี
แกรมบวก รูปกลมหรือกลมรี เจริญบน bile esculin agar และส่วน
ใหญ่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl) 6.5%
รวมทั้งส่วนใหญ่เจริญที่ 10°C บน BHI agar และที่ 45°C ใน BHI
broth

7.2.6.2 พบ fecal streptococci เมื่อผลทดสอบ catalase ให้ผลลบ ย้อมติดสี
แกรมบวก รูปกลมหรือกลมรี ส่วนใหญ่ไม่เจริญบน bile esculin
agar และไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl)

6.5% แต่เจริญได้ที่ 45°C ใน BHI broth และส่วนใหญ่ไม่เจริญที่ 10°C บน BHI agar

หมายเหตุ การใช้วิธี mEI ทดสอบตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล อาจพบ non-*Enterococcus* species สูงถึง 26% จึงควรเพิ่มรายการทดสอบ เช่น การเจริญใน BHI broth ที่ 45°C การตรวจหาเอนไซม์ pyroglutamate aminidase (PYR) และการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP) โดยใช้ชุดทดสอบเพื่อยืนยัน genus *Enterococcus* โดยมีความแม่นยำในระดับที่ยอมรับได้ ($\geq 90\%$)

8. การคำนวณ (Calculation of results)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันพบว่าเป็น fecal enterococci หรือ fecal streptococci บางโคโลนีให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น fecal enterococci หรือ fecal streptococci ไปคูณจำนวนที่นับได้ ตัวอย่างเช่น ผลรวมของโคโลนีที่นับได้เท่ากับ 45 โคโลนี เมื่อสุ่ม 5 โคโลนีไปตรวจยืนยัน แล้วพบว่าเป็น fecal enterococci หรือ fecal streptococci 3 โคโลนี ดังนั้นสัดส่วนเท่ากับ 3/5

จำนวน fecal enterococci หรือ fecal streptococci CFU/100 มิลลิลิตร หรือ ปริมาตรที่ทดสอบ

$$\begin{aligned} &= \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{สัดส่วน} \\ &= 45 \times 3/5 = 27 \end{aligned}$$

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 การตรวจหา (detection)

รายงานผล fecal enterococci หรือ fecal streptococci /100 มิลลิลิตรหรือปริมาตรที่ทดสอบ พบหรือไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration)

9.2.1 กรณีตรวจพบโคโลนี fecal enterococci หรือ fecal streptococci

รายงานผล fecal enterococci หรือ fecal streptococci CFU/100 มิลลิลิตรหรือ
ปริมาณที่ทดสอบ = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x สัดส่วนที่ตรวจยืนยันแล้ว

9.2.2 กรณีตรวจไม่พบโคโลนี fecal enterococci หรือ fecal streptococci

รายงานผล fecal enterococci หรือ fecal streptococci CFU/100 มิลลิลิตร
หรือปริมาณที่ทดสอบ = น้อยกว่า 1

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) และตรวจปริมาณ
(enumeration) fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำ
และน้ำแข็งโดยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter)

10.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจยืนยัน fecal enterococci หรือ
fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง

10.4 ภาคผนวก 4: ตารางที่ 1 แสดงคุณลักษณะของ *Enterococcus* และ
Streptococcus sp. ที่แยกจากอุจจาระ

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Bile esculin agar

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Oxgall	40 กรัม
Esculin	1 กรัม
Ferric citrate	0.5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่ง 8-10 มิลลิลิตร ใส่หลอด หรือปริมาณที่เหมาะสมใส่ขวดสำหรับเตาใส่จานเพาะเชื้อ นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.6±0.2 เอียงหลอด หรือเตาใส่จานเพาะเชื้อขนาด 15x100 มิลลิเมตร 15 มิลลิลิตร และปล่อยให้เย็นแข็ง

2. Brain-heart infusion (BHI) agar

Infusion of calf brain	200 กรัม
Infusion of beef heart	250 กรัม
Proteose peptone	10 กรัม
Glucose	2 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2.5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4±0.2



3. Brain-heart infusion (BHI) broth

Infusion of calf brain	200 กรัม
Infusion of beef heart	250 กรัม
Proteose peptone	10 กรัม
Glucose	2 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2.5 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

4. Brain-heart infusion (BHI) broth ที่มีเกลือ 6.5% NaCl

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth สำเร็จรูป หรือเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ตามสูตรข้อ 5 แล้วเติม NaCl 60 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร

5. EIA medium

Esculin	1 กรัม
Ferric citrate	0.5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.1 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9×50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิลิตร) เก็บในที่มืด $2-10^\circ\text{C}$ ได้ไม่เกิน 14 วัน

6. mE agar

6.1 base medium

Peptone	10 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	15 กรัม
Yeast extract	30 กรัม
Esculin	1 กรัม

Cycloheximide	0.05 กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.15 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.1 ± 0.2

6.2 Nalidixic acid-NaOH solution

ผสม Nalidixic acid 0.24 กรัม ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 5 มิลลิลิตร เติมน้ำ 0.1N NaOH 2-3 หยด (ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร) เพื่อละลาย Nalidixic acid แล้วกรองผ่านเมมเบรน $0.45 \mu\text{m}$ เก็บที่ $2-10^\circ\text{C}$ ได้ไม่เกิน 14 วัน

การใช้งาน

เติมน้ำผสมข้อ 6.2 ลงใน base medium ข้อ 6.1 ที่ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ $44-46^\circ\text{C}$ แล้วเติม 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.15 กรัม ผสมกันให้ละลาย เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9×50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิลิตร) เก็บในที่มืด $2-10^\circ\text{C}$ ได้ไม่เกิน 14 วัน

หมายเหตุ Cycloheximide เป็นสารพิษ เมื่อรับประทานหรือดูดซึมผ่านผิวหนัง จะเป็นพิษรุนแรง

7. mEI agar

7.1 base medium

Peptone	10 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	15 กรัม
Yeast extract	30 กรัม
Esculin	1 กรัม
Cycloheximide	0.05 กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.15 กรัม
Indoxyl- β -D-glucoside	0.75 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.1 ± 0.2



7.2 Nalidixic acid-NaOH solution เหมือนข้อ 6.2

การใช้งาน

เติมส่วนผสมข้อ 7.2 ลงใน base medium ข้อ 7.1 ที่ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 44-46°C แล้วเติม 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.02 กรัม ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9x50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิตร) เก็บในที่มืด 2-10°C ได้ไม่เกิน 14 วัน

8. mEnterococcus agar

Tryptose	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	2	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	4	กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.4	กรัม
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	0.1	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิตร ให้ความร้อนจนละลาย เทใส่จานเพาะเชื้อขนาด 9x50 มิลลิเมตร ให้มีความหนา 4-5 มิลลิเมตร (ประมาณ 4-6 มิลลิตร) pH 7.2±0.2

9. Buffered water

9.1 stock phosphate buffer solution

Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	34	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิตร

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

9.2 magnesium chloride stock solution

magnesium chloride ($MgCl_2$ หรือ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	38 หรือ 81.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิตร

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

9.3 working solution

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

10. 0.1% Peptone water

Peptone	1 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

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

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

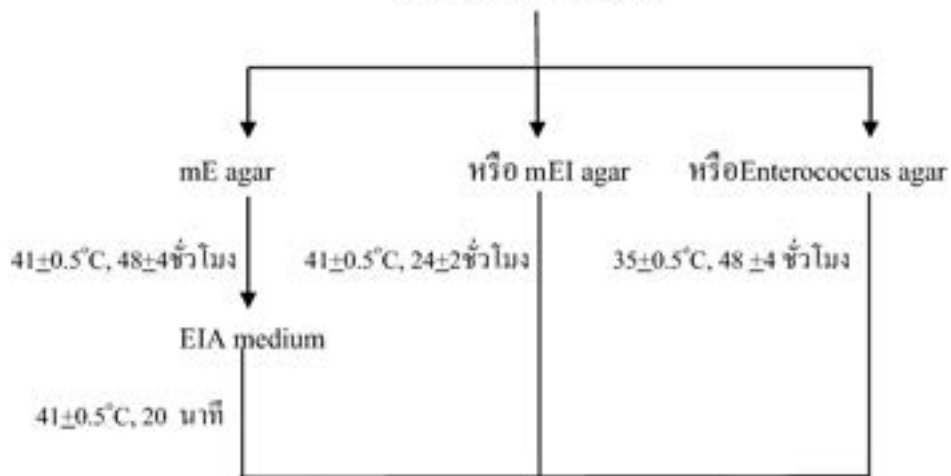
1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

นำ 10% hydrogen peroxide ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันหรือเปอร์เซ็นต์อื่นๆ โดยปรับให้เป็น 3% หรือใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2

กรองตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร หรือปริมาณที่ต้องการทดสอบ

นำกระดามกรองวางบน

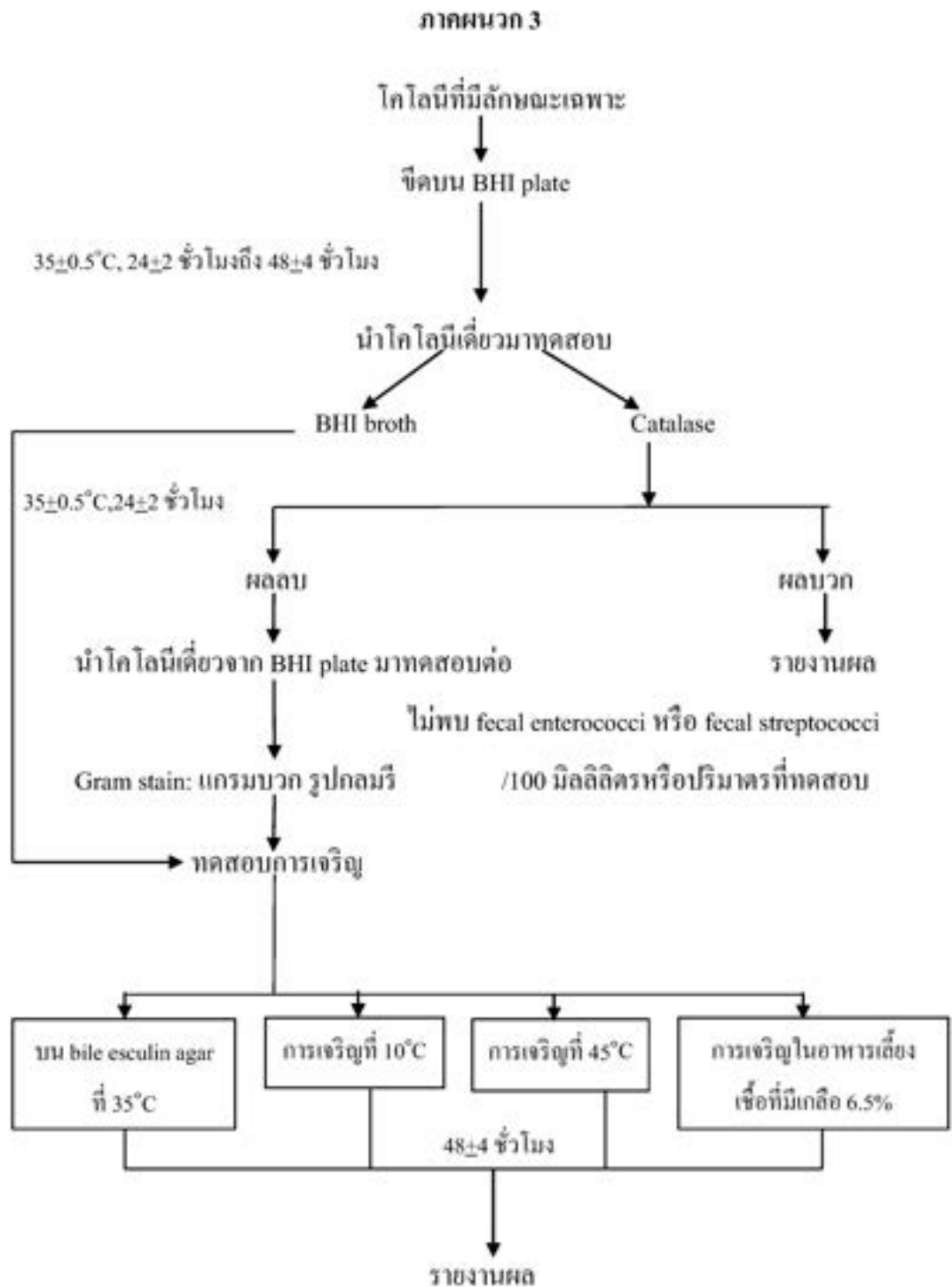


นับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ (20-60 โคโลนี)

- EIA medium: โคโลนีสีชมพูถึงสีแดงพบตะกอนสีดำหรือสีน้ำตาลแดง
ด้านหลังแผ่นกรอง
- mEI agar: โคโลนีมีโซนสีน้ำเงินล้อมรอบ
- mEnterococcus agar: โคโลนีสีแดงอ่อนและสีแดงเข้ม

↓
ตรวจยืนยัน

แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) และตรวจปริมาณ (enumeration) fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธีกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter)



แผนภูมิที่ 2 การตรวจยืนยัน fecal enterococci หรือ fecal streptococci ในน้ำและน้ำแข็ง

ภาคผนวก 4

ตารางที่ 1 แสดงคุณลักษณะของ *Enterococcus* และ *Streptococcus* sp. ที่แยกจากอุจจาระ

สปีชีส์	จาก อุจจาระ	Bile-esculin agar	การเจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีเกลือ 6.5%	การเจริญบน อาหารเลี้ยง เชื้อที่ $10\pm 1^{\circ}\text{C}$	การเจริญ บนอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ $45\pm 1^{\circ}\text{C}$
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. columbae</i>	+	+	-	-/+	-/+
<i>E. cecorum</i>	+	+	-	-/+	-/+
<i>E. durans</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. avium</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. munditii</i>	+	+	+	+/-	-/+
<i>E. dispar</i>	+	+	+	+/+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	+	+/+	-/+
<i>E. asini</i>	+	+	-	+/+	+
<i>S. hyointestinalis</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. bovis</i>	+	+	-	-/+	+
<i>S. intestinalis</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. suis</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. alactolyticus</i>	+	-	-	-/+	+
<i>S. equinus</i>	+	+	-	-/+	+

DMSc F 2029: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในนมเปรี้ยว โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 37°C
Analytical method of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in yogurt - Colony-count technique at 37°C

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลักษณะเฉพาะในนมเปรี้ยวคือ

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ที่มีชีวิต โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 37°C

2. เอกสารอ้างอิง (reference)

ISO 7889:2003/IDF 117:2003 Yogurt—Enumeration of characteristic Microorganisms Colony - count technique at 37 °C

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

- 3.1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* เป็นจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง acidified MRS บ่มที่ 37°C 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจนจะให้โคโลนีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วแดง คมชัด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นรูปท่อนสั้น แต่บางครั้งเป็นรูปท่อนยาว ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างเอนไซม์ catalase
- 3.2 *Streptococcus thermophilus* เป็นจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง M17 บ่มที่ 37°C 72 ชั่วโมง จะให้โคโลนีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วแดง ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นรูปกลมหรือรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-0.9 ไมโครเมตร เป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายยาว ย้อมติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์ catalase

4. หลักการ (Principle)

4.1 เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ๆ ละ 10 เท่า จนถึงระดับการเจือจางตามต้องการ ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อลักษณะเฉพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* โดยใช้อาหาร เลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดข้างต่อไปนี้

4.1.1 acidified MRS (pH 5.4) บ่มที่ 37°C 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน
สำหรับ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

4.1.2 M17 บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง ในสภาวะปกติ สำหรับ *Streptococcus thermophilus*

4.2 นับจำนวนโคโลนีและตรวจยืนยัน

4.3 คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ลักษณะเฉพาะ (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ/หรือ *S. thermophilus*) CFU/กรัม และรายงานผล

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Acidified MRS medium (MRS)

5.1.2 M17 medium (M17)

5.1.3 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent): peptone salt solution

5.2 สารเคมี

5.2.1 Gram stain reagents

5.2.2 3% Hydrogen peroxide

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

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

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony-counter)

6.1.5 ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ และตู้บเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic incubator) $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ หรือ anaerobic jar

6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.8 เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.9 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.10 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44°C - 47°C , $45^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ และสามารถปรับอุณหภูมิได้ถึงจุดเดือด

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วผ่าเกลียว

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 เข็มเย็บเย็บ (needle)

6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.6 ปิเปต (pipette)

6.2.7 ไม้พาย (spatula) ชนิดแก้วหรือโลหะที่ปราศจากเชื้อ

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นโยเกิร์ตที่ไม่เติมผลไม้ (Non-fruit yogurts) ใช้ไม้พาย (spatula) ที่ปราศจากเชื้อ คนผสมตัวอย่างให้เข้ากัน แต่กรณีที่ตัวอย่างเป็นโยเกิร์ตผสมผลไม้ (Fruit yogurts) นำตัวอย่างทั้งหมดมาบดเป็น นาน 1 นาที สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการอย่างน้อย 10 ± 0.1 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปต ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาณเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากัน สุ่มตัวอย่างปริมาณที่ต้องการอย่างน้อย 10 ± 0.1 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

ดักแบ่งตัวอย่างนมเปรี้ยวปริมาณเล็กน้อย นำมาเกลี่ย (smear) ลงบนแผ่นกระจก
ย้อมด้วยสีเมธิลีนบลู จากนั้นทำการตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดย
ส่องดูหลายๆ บริเวณ เพื่อประมาณความหนาแน่นของแบคทีเรียรูปกลมและรูป
ท่อน และเพื่อเลือกช่วงระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการนับจำนวน
เชื้อแต่ละรูปร่าง

7.3 การเตรียมตัวอย่างเจือจางเริ่มต้น (Preparation of primary dilution)

เทสารละลายสำหรับเจือจางลงใน ข้อ 7.1.1 หรือ 7.1.2 จนได้น้ำหนัก 100 กรัม ผสม
ให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องบดปั่นหรือเครื่องตีผสมอาหาร 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง
1:10 (primary dilution)

7.4 การเตรียมตัวอย่างเจือจางตามลำดับ ๆ ละ 10 เท่า (Preparation of decimal dilutions)

เปิดตัวอย่างเจือจาง 1:10 จากข้อ 7.3 ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจางปริมาตร
9 เท่า เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้
เรื่อยไปจนได้ตัวอย่างเจือจางตามที่ต้องการ

7.5 การตรวจปริมาณ โดยวิธี Pour plate : ภาคผนวก 2

7.5.1 เปิดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อ 2 จาน (duplicate) จำนวน 2 ชุด
(สำหรับตรวจปริมาณเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ
S. thermophilus อย่างละ 1 ชุด)

7.5.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในแต่ละจานเพาะเชื้อ โดยเท MRS 15 มิลลิลิตร (ควบคุม
อุณหภูมิ 45°C) สำหรับนับ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และเท M17
15 มิลลิลิตร (ควบคุมอุณหภูมิ 44-47°C) สำหรับนับ *S. thermophilus* ผสมให้
เข้ากัน ปั่นให้เข้ากัน

7.5.3 คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่ม MRS ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C 72 ชั่วโมง ส่วน
M17 บ่มในสภาวะปกติที่ 37°C 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ ขณะบ่ม วางจานเพาะเชื้อซ้อนกันได้ไม่เกิน 6 จาน โดยต้องไม่วางชิดผนัง
ด้านข้างและด้านบนของตู้บ่มเพาะเชื้อ

7.5.4 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ ช่วง 15-300 โคโลนี
ลักษณะเฉพาะของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ
Streptococcus thermophilus ตามข้อ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

หมายเหตุ กรณีมีปัญหาการนับจำนวน *Lactobacillus delbrueckii* subsp.
bulgaricus เมื่อใช้ MRS อาจเปลี่ยนมาใช้ LBA medium ที่ถูกพัฒนาโดย NIZO
Food Research, Kemhemseweg 2, Postbus 20 6710 BA, Ede, The Netherlands.

7.5.5 ตรวจสอบ โดยเลือกโคโลนีมาย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้าง catalase
กับ 3% hydrogen peroxide (จำนวนโคโลนีที่เลือก คำนวณจากรากที่สองของ
จำนวนโคโลนีทั้งหมดใน จานเพาะเชื้อที่นำมานับจำนวน)

กรณีเชื้อที่เจริญบน MRS (ตรวจ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) มักพบเชื้อรูปท่อน
ดิดส์ แกรมบวก (ม่วงอมน้ำเงิน) ไม่สร้างสปอร์ และ catalase ลบ (ไม่เกิดฟองก๊าซ)
กรณีเชื้อที่เจริญบน M17 (ตรวจ *S. thermophilus*) มักพบเชื้อรูปกลม เรียงค่อนเป็นสาย
หรือเป็นคู่ ดิดส์แกรมบวก และ catalase ลบ

8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 นำค่าจำนวนนับ จากจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ ช่วง 15-300 โคโลนี มาคำนวณ
จำนวนจุลินทรีย์ลักษณะเฉพาะแต่ละชนิด โดยใช้สูตร

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

N = จำนวนจุลินทรีย์ลักษณะเฉพาะ ต่อกรัม

$\sum C$ = ผลรวมของจำนวนโคโลนีจากทุกจานเพาะเชื้อที่นำมานับ

n_1 = จำนวนของจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางแรก que เลือก

n_2 = จำนวนของจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางที่ 2 ที่เลือก

d = ระดับการเจือจางแรก que เลือก

ในกรณีที่นับจำนวนโคโลนีได้ใน 3 ระดับการเจือจาง ให้ใช้สูตร

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1 n_2 + 0.01 n_3) d}$$

n_j = จำนวนของจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางที่ 3 ที่เลือก

ตัวอย่าง : *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

ที่ความเจือจาง 10^{-5} นับจำนวนเชื้อได้ 295, 245 โคโลนี

ที่ความเจือจาง 10^{-6} นับจำนวนเชื้อได้ 33, 40 โคโลนี

$$\begin{aligned} \text{จำนวน } L. delbrueckii \text{ subsp. } bulgaricus \text{ CFU/กรัม} &= \frac{295+245+33+40}{(2+0.1 \times 2) 10^{-5}} \\ &= \frac{613}{2.2 \times 10^{-5}} \\ &= 278.6 \times 10^5 \\ &= 280 \times 10^5 \\ &= 2.8 \times 10^7 (N_L) \end{aligned}$$

ตัวอย่าง : *S. thermophilus* (คำนวณในทำนองเดียวกัน)

$$\text{จำนวน } S. thermophilus \text{ CFU/กรัม} = 4.9 \times 10^8 (N_S)$$

8.2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คำนวณจากสูตร $N = N_L + N_S$

N_L = จำนวน *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFU/ กรัม

N_S = จำนวน *S. thermophilus* CFU/กรัม

$$\begin{aligned} &= (2.8 \times 10^7) + (4.9 \times 10^8) \\ &= 5.18 \times 10^8 \end{aligned}$$

ดังนั้นรายงาน จำนวนจุลินทรีย์ (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *S. thermophiles*) CFU/กรัม = 5.2×10^8

8.3 กรณีที่ตัวอย่างทุกระดับการเจือจาง นับจำนวนเชื้อได้มากกว่า 300 ให้คำนวณค่าจากจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อใกล้เคียง 300 โคโลนีมากที่สุด แล้วคูณด้วยระดับการเจือจางสูงสุด

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 จำนวนจุลินทรีย์ CFU/กรัม (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ/หรือ *S. thermophilus*)

9.2 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง $1.0 - 9.9 \times$ เลขยกกำลังของ 10 โดยปรับตัวเลขตำแหน่งที่สาม ดังนี้

- ตัวเลขตำแหน่งที่สาม น้อยกว่า 5 ให้ปัดเป็นศูนย์
- ตัวเลขตำแหน่งที่สาม เท่ากับ 5 และเลขตำแหน่งที่ 2 เป็นเลขคู่ ให้ปัดลง
- ตัวเลขตำแหน่งที่สาม เท่ากับ 5 และเลขตำแหน่งที่ 2 เป็นเลขคี่ ให้ปัดขึ้น

ตัวอย่าง : 234 ปัดเป็น 230 235 ปัดเป็น 240

 225 ปัดเป็น 220 245 ปัดเป็น 240

9.3 กรณีที่จำนวนโคโลนี น้อยกว่า 10 ทุกจานเพาะเชื้อ ให้รายงาน น้อยกว่า 10/กรัม

9.4 กรณีที่ตัวอย่างทุกระดับการเจือจาง นับจำนวนเชื้อได้มากกว่า 300 โคโลนี รายงานเป็นค่าประมาณจำนวนต่ำสุดของจุลินทรีย์/กรัม (estimated minimum number of microorganisms per gram)

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาควัสดุ 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาควัสดุ 2: แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ/หรือ *Streptococcus thermophilus*) ในนมเปรี้ยวที่ 37°C

10.3 ภาควัสดุ 3: คำแนะนำเกี่ยวกับขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์



ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Acidified MRS medium (pH 5.4)

Peptone 1 (tryptic digest of casein)	10.0	กรัม
Meat extract	10.0	กรัม
Yeast extract (dried)	5.0	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	20.0	กรัม
Tween 80 (sorbitan mono-oleate)	1.0	มิลลิลิตร
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
Sodium acetate trihydrate ($CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$)	5.0	กรัม
Diammonium citrate [$C_6H_6O_7(NH_4)_2$]	2.0	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
Manganese sulfate tetrahydrate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม
Agar	9.0 – 18.0*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำโดยการต้มเดือด และทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบ
ควบคุมอุณหภูมิที่ $50^\circ C$ ปรับ pH ด้วย acetic acid, 100% (glacial) แบ่งใส่ขวด
ตามปริมาณที่ต้องการ นำเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที pH 5.4 ± 0.1 ปรับอุณหภูมิก่อน
ใช้งาน ประมาณ $47^\circ C$ โดยใช้อ่างน้ำร้อนหรือวิธีอื่นที่เทียบเท่า

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

หมายเหตุ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีความไวมากต่อการให้ความร้อน ซึ่งอาจทำให้เกิดความแตกต่างขึ้นกับหม้อนึ่งความดันที่ใช้

หมายเหตุ 2 จากการทดลองเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการใช้ MRS สำเร็จรูปอาจให้จำนวนนับต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเองตามสูตรในมาตรฐานนี้ ดังนั้น ควรตรวจสอบเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สำเร็จรูป กับสูตรในมาตรฐานนี้ ก่อนนำไปใช้ มิฉะนั้นอาจทำให้เกิดปัญหาสำหรับผู้ผลิตนมเปรี้ยว และหน่วยงานที่ตรวจสอบ เพราะนับเซลล์ได้ต่ำกว่าที่มีอยู่จริง

2. M17 medium

2.1 Basic medium

Peptone 1 (tryptic digest of casein)	2.5	กรัม
Peptone 2 (peptic digest of meat)	2.5	กรัม
Peptone 3 (papain digest of soya)	5.0	กรัม
Yeast extract (dried)	2.5	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
β -Glycerophosphate (disodium salt) ($C_3H_7O_6PNa_2$)	19.0	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.25	กรัม
Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$)	0.50	กรัม
Agar	9.0–18.0	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรองให้ครบ	950	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำโดยการต้มเคี่ยว และทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ $50^\circ C$ ปรับ pH (ให้ค่าสุดท้ายภายหลังฆ่าเชื้อ) 6.8 ± 0.1 แบ่งใส่ขวดตามปริมาณที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที

2.2 Lactose solution

Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	10.0	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรองให้ครบ	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำ ใส่ขวดตามปริมาณที่เตรียม ฆ่าเชื้อที่ $121^\circ C$ 15 นาที



2.3 Complete medium (M17)

Basic medium (2.1)	95.0	มิลลิลิตร
--------------------	------	-----------

Lactose solution (2.2)	5.0	มิลลิลิตร
------------------------	-----	-----------

ก่อนใช้งาน อุ่น Lactose solution ที่ 50°C และเติมลงใน Basic medium (M17) ที่
หลอมละลาย แล้วและมีอุณหภูมิ 50°C ผสมให้เข้ากัน แล้วทำให้เย็นลง 44-47°C
ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อ M17 สามารถใช้แบบสำเร็จรูปได้ แต่ M17 จากต่างผู้ผลิต
อาจให้ผลที่แตกต่างกันไป ดังนั้น ควรตรวจสอบเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
สำเร็จรูปกับสูตรในมาตรฐานนี้ก่อนนำไปใช้ มิฉะนั้นอาจทำให้เกิดปัญหาสำหรับผู้ผลิต
นมเปรี้ยวและหน่วยงานที่ตรวจสอบ เพราะนับเซลล์ได้ต่ำกว่าที่มีอยู่จริง

หมายเหตุ ให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ M17 ที่เตรียมใหม่ๆ และต้องไม่สัมผัสกับ
แสงแดดโดยตรง

3. peptone salt solution

peptone (enzymatic digest of casein)	1.0	กรัม
--------------------------------------	-----	------

Sodium chloride (NaCl)	8.5	กรัม
------------------------	-----	------

น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร
---------------------	-------	-----------

ละลายส่วนประกอบในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่
ต้องการ ฆ่าเชื้อ ที่ 121°C 15 นาที pH 7.0±0.2

4. สีย้อมแกรม (Gram stain reagents)

ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. 3% hydrogen peroxide (H₂O₂)

นำ 10% hydrogen peroxide ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้า
กัน หรือเปอร์เซ็นต์อื่นๆ โดยปรับให้เป็น 3% หรือใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) จำนวนจุลินทรีย์ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ/หรือ *Streptococcus thermophilus*) ในนมเปรี้ยวที่ 37°C



ภาคผนวก 3

คำแนะนำเกี่ยวกับขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่แนะนำให้ใช้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ acidified MRS และ M17 มีความจำเพาะไม่สมบูรณ์

สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *Streptococcus thermophilus* ไม่เจริญให้เห็นเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ acidified MRS ในระดับการเจือจางที่มักใช้นับจำนวน *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* แต่ถ้า lactobacilli ในตัวอย่างนมเปรี้ยวมีจำนวนน้อยกว่า streptococci มาก ให้นับ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ที่ระดับการเจือจางต่ำๆ

ภายใต้สภาวะเดียวกันนี้ *S. thermophilus* บางสายพันธุ์ อาจเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ acidified MRS แต่มีขนาดโคโลนีเล็กมากหรือเป็นจุด (pinpoint) ซึ่งเห็นความแตกต่างได้ง่ายจาก *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และสามารถตรวจสอบเพิ่มเติมได้โดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* บางสายพันธุ์อาจเจริญไม่ดีหรือไม่เจริญบน MRS ทำให้แยกความแตกต่างจาก *S. thermophilus* ได้ยาก

สายพันธุ์ของ *S. thermophilus* ที่เจริญช้ามากหรือไม่เจริญ แนะนำให้ใช้สภาวะพิเศษบางอย่าง เช่น

- บ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น (39 - 42°C และ 45°C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะปกติ)
- ลดปริมาณ β -glycerophosphate
- คัดแปลงค่า pH
- เพิ่มความระมัดระวังในการเขย่าผสม

สายพันธุ์ของ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ที่เจริญช้ามากหรือไม่เจริญ แนะนำให้ใช้สภาวะพิเศษบางอย่าง เช่น

- บ่มให้มากกว่า 3 วัน อาจบ่มถึง 5 หรือ 6 วันก็ได้
- บ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น (40-42 °C และ 45 °C นาน 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน)
- คัดแปลงค่า pH
- เพิ่มความระมัดระวังในการเขย่าผสม
- สภาวะแวดล้อมที่มีก๊าซ (CO₂ enrichment, CO₂ ฯลฯ)

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* เมื่อเจริญในนมเปรี้ยวในสภาวะไร้ออกซิเจน จะไม่สามารถเจริญได้ใน MRS แต่อาจแก้ปัญหาโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LBA แทน MRS และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ นาน 72 ชั่วโมง

ในทางตรงกันข้าม สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ไม่เจริญให้เห็นเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 ในระดับการเจือจางที่มักใช้นับจำนวน *S. thermophilus* แต่บางสายพันธุ์อาจเจริญเป็นโคโลนีที่เป็นจุดขนาดเล็ก (small pinpoint) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างนมเปรี้ยวที่มี lactobacilli ในจำนวนที่สูงกว่า streptococci มาก โดยมีลักษณะโคโลนีเล็ก หยิบ และมักจะเป็นปุย ซึ่งมองเห็นความแตกต่างได้ง่ายจาก *S. thermophilus* ที่โคโลนีมีขนาดใหญ่กว่า และขอบเรียบ อาจใช้แว่นขยายช่วยในการดูลักษณะโคโลนี และสามารถตรวจสอบเพิ่มเติมโดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการบ่ม และการนับจำนวน เป็นส่วนที่สำคัญมากของการทดสอบ เมื่อนักวิเคราะห์คุ้นเคยกับวิธี จะทำให้ผลวิเคราะห์มีความแม่นยำยิ่งขึ้น

ยิ่งไปกว่านั้น ไม่มีสายพันธุ์ทดสอบที่เหมาะสม เพื่อนำมาทดสอบความจำเพาะของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เพราะเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตนมเปรี้ยวมีความหลากหลายและมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ทดสอบ ดังนั้นบางสายพันธุ์ของเชื้อ เช่น *S. thermophilus* จึงสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะสำหรับเชื้อชนิดอื่น เช่น *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ได้

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

- | | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| 1. นางนิตยา พันธุ์บัว | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ |
| 2. นางปวีณา พานิชกุล | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |
| 3. นางสาวสีแพร ชูชีวา | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ |



วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 4015	ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MIR604	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MIR604	-	167
DMSc F 4016	ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON863	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event MON863	-	173
DMSc F 4017	ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด NK603	Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of maize event NK603	-	179

**DMSc F 4015: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for
detection of maize event MIR604**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชนิด MIR604 (ของบริษัท Syngenta) ที่ตัดแปรโดยใส่ยีน *Cry3A* เพื่อดำเนินการหาหาเจาะรากข้าวโพด ใน ตัวอย่างอาหารที่มีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบโดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 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, 2010
- 2.5 Mazzara M., Munaro B., Foti N., Savini C., Van Den Eede G.; "Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MIR604 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol - Maize Seeds Sampling and DNA Extraction" Online Publication (2007)

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

CT, CP, Cq: threshold cycles

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

Real-time PCR ใช้หลักการของ fluorescent labeled probe ที่ทำปฏิกิริยากับ PCR product ระหว่าง primer 1 คู่ โดยปริมาณของ fluorescence ที่วัดได้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้น

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 5' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชนิด MIR604

- 4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด MIR604 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง MIR604 และข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่แม่นยำๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Water, Realtime-PCR grade
- 5.2 RealTime-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า
- 5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 76 bp
- 5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด MIR604-f: 5' – GCG CAC GCA ATT CAA CAG – 3'
- 5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของอินดัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด MIR604-r: 5' - GGT CAT AAC GTG ACT CCC TTA ATT CT – 3'
- 5.4 Thermostable DNA polymerase
- 5.5 Realtime PCR probe:
- MIR604 Probe: 5' - FAM-AGG CGG GAA ACG ACA ATC TGA TCA TG-TAMRA – 3'

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา (setup)
- เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตาราง MIR604_1

ตาราง MIR604_1

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Nuclease-free Water		8.5
JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	1 x	12.5
Primer MIR604-f, 10 µmol/l	0.3 µmol/l	0.75
Primer MIR604-r, 10 µmol/l	0.3 µmol/l	0.75
Probe MIR604, 10 µmol/l	0.2 µmol/l	0.5
Template DNA	Maximum 200 ng	2

7.2 สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls ใช้ 0.1% CRM MIR604 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง MIR604_2

ตาราง MIR604_2

Stage	Temperature	Time	No Cycles
Decontamination (UNG)	50°C	120 s	1
Activation/ Initial Denaturation	95°C	600 s	1
Denaturation	95°	15 s	40
Annealing & Extension	60°C	60 s	

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

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

8.2 กำหนดค่า baseline ให้น้อยกว่าค่า threshold line

8.3 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้ามี amplification curve เกิดขึ้น และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MIR604 (MIR604 maize) พบ/ detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MIR604 (MIR604 maize) ไม่พบ/ not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

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 4016: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of
maize event MON863**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON863 ที่ดัดแปรเพื่อให้สร้างโปรตีนจากยีน *Cry3Bb1* (จาก *Bacillus thuringiensis* (subsp. *kumamotoensis*)) ที่ใส่เข้าไปด้วยวิธี particle acceleration เพื่อต้านทานหนอนเจาะรากข้าวโพด (CRW; *Diabrotica* sp.) ในตัวอย่างอาหารที่มีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบโดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 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, 2010
- 2.5 Mazzara M., Foti N., Price S., Paoletti C., Van Den Eede G.; "Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line MON 863 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication (2005)

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

CT, CP, Cq: threshold cycles

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจสอบลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำซ้ำในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อนคือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
 - 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
 - 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
 - 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล
Real-time PCR ใช้หลักการของ fluorescent labeled probe ที่ทำปฏิกิริยากับ PCR product ระหว่าง primer 1 คู่ โดยปริมาณของ fluorescence ที่วัดได้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้น
- 4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 5' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON863
- 4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด MON863 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง MON863 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, Realtime-PCR grade

5.2 Realtime-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า

5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product
ขนาด 84 bp

5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด

MON863-f: 5'- GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C - 3'

5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนตัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด

MON863-r: 5' - TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT - 3'

5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ Realtime-PCR)

5.5 Realtime-PCR probe:

MIR863 Probe: FAM -TGA ACA CCC ATC CGA ACA AGT AGG GTC
A -TAMRA

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมปฏิกิริยา (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตาราง MON863_1

ตาราง MON863_1

Reagent	Final concentration	Volume per sample (μl)
Nuclease-free Water		18.25
TaqMan® Universal PCR Master Mix	1 x	25
Primer MON863-f, 10 μmol/l	0.15 μmol/l	0.75
Primer MON863-r, 10 μmol/l	0.15 μmol/l	0.75
Probe MON863, 10 μmol/l	0.050 μmol/l	0.25
Template DNA	Maximum 280 ng	5

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM MON863 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุในตาราง MON863_2

ตาราง MON863_2

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

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

- 8.1 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 และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ
- 8.4 การสรุปผล:
 - 8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9
 - 8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ
- 8.5 การรายงาน
 - 8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MON863 (MON863 maize) พบ/ detected
 - 8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด MON863 (MON863 maize) ไม่พบ/ not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ดีว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

- 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

**DMSc F 4017: Qualitative Polymerase Chain Reaction method for detection of
maize event NK603**

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชนิด NK603 ในตัวอย่างอาหารที่มีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ โดยวิธี Realtime - Polymerase Chain Reaction

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 2.1 ISO 24276:2006(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions
- 2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods
- 2.3 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, 2010
- 2.5 Mazzara M., Paoletti C., Puumalaainen J., Rasulo D., Van Den Eede G.; "Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line NK603 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol" Online Publication (2005)

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates
CT, CP, Cq: threshold cycles

4. หลักการ (Principle)

- 4.1 ทัวไป: การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
- 4.2 PCR amplification เป็นการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนสายของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ร่วมกับ primer และ deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) ใน buffer เป็นการทำให้ในหลอดทดสอบ และมีสิ่งที่เป็นเงื่อนไขที่ต้องทำก่อน คือในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ต้องไม่มี inhibitors
ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณมี 3 ขั้นตอนคือ
 - 4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน
 - 4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย
 - 4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม
- 4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล
Real-time PCR ใช้หลักการของ fluorescent labeled probe ที่ทำปฏิกิริยากับ PCR product ระหว่าง primer 1 คู่ โดยปริมาณของ fluorescence ที่วัดได้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR product ที่เพิ่มขึ้น
- 4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณ 5' integration border region (IBR) ที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีนที่มีการใส่เข้าไปต่อกับตำแหน่งของยีนที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด NK603
NK603 เป็นข้าวโพดที่ดัดแปรโดยการใส่ยีนที่ทำให้ข้าวโพดสามารถทนกับยาปราบวัชพืชชนิด glyphosate ยีนนี้ได้มาจาก *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 ซึ่งให้เอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase หรือ EPSPS ได้

- 4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด NK603 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง NK603 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

- 5.1 Water, Realtime-PCR grade
- 5.2 Realtime-PCR buffer ความเข้มข้น 2 เท่า
- 5.3 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μ M ให้ PCR-product ขนาด 108 bp
- 5.3.1 Forward primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสที่อยู่บนจีโนมของข้าวโพด NK603-f: 5'- ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA- 3'
- 5.3.2 Reverse primer: ซึ่งสามารถจับได้กับลำดับเบสของยีนดัดแปรที่มีการใส่เข้าไปในข้าวโพด NK603-r: 5' - AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T- 3'
- 5.4 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ Realtime-PCR)
- 5.5 Realtime-PCR probe:
NK603 Probe: FAM-TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC-TAMRA

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

- 6.1 Real-time PCR machine

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา Realtime-PCR (setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตาราง NK603_1

ตาราง NK603_1

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Nuclease-free Water		18.25
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	1 x	25
Primer NK603-f, 10 µmol/l	0.15 µmol/l	0.75
Primer NK603-r, 10 µmol/l	0.15 µmol/l	0.75
Probe NK603, 10 µmol/l	0.050 µmol/l	0.25
Template DNA	Maximum 300 ng	5

7.2 สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM NK603 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme): ตามระบุใน ตาราง

NK603_2

ตาราง NK603_2

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

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 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 และสามารถอ่านค่า CT ได้ ในกรณีไม่มีค่า CT แสดงว่าผลเป็นลบ

8.4 การสรุปผล:

8.4.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.4.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 sub-sample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.5 การรายงาน

8.5.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด NK603 (NK603 maize) พบ/ detected

8.5.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิด NK603 (NK603 maize) ไม่พบ/ not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุม โดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

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

ภาคผนวก
รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ ๕
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	การวิเคราะห์เนื้อมันรวมไขมันในนมพร้อมดื่มและนมแปลงไขมัน
10	DMSc F 1010	การวิเคราะห์เนื้อมันรวมไขมันในนมข้นไม่หวานและนมข้นแปลงไขมันไม่หวาน
11	DMSc F 1011	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชา
12	DMSc F 1012	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในกาแฟ
13	DMSc F 1013	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในโกโก้ผง
14	DMSc F 1014	การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาสมุนไพร
15	DMSc F 1015	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในชา
16	DMSc F 1016	การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในกาแฟคั่ว
17	DMSc F 1017	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา
18	DMSc F 1018	การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักผลไม้
19	DMSc F 1019	การวิเคราะห์ปริมาณอะซีลซัลโฟม-ค, แอสพาเทม และซัคคาริน ในอาหาร
20	DMSc F 1020	การวิเคราะห์ปริมาณ โซเดียมซัยคลาเมตในอาหาร
21	DMSc F 1021	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี ในอาหาร
22	DMSc F 1022	การวิเคราะห์ปริมาณดีบุกในอาหารกระป๋อง
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 2 วิธี คือ

1	DMSc F 2006	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในอาหาร
2	DMSc F 2007	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Staphylococcus aureus</i> ในน้ำและน้ำแข็ง

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 และไนเตรด 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	การวิเคราะห์ปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
13	DMSc F 1037	การวิเคราะห์ปริมาณสังกะสี ที่แพร่จากผลิตภัณฑ์ยาง
14	DMSc F 1038	การวิเคราะห์ปริมาณ N-Nitrosamines และ N-Nitrosatable substances ที่แพร่จากหัตถ์ยาง
15	DMSc F 1039	การวิเคราะห์ปริมาณสารที่ระเหยได้ในหัตถ์ยางสังเคราะห์
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	วิธีตรวจวิเคราะห์เชื้อสแตและราในอาหาร โดยวิธี pour plate และ spread plate
2	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio cholerae</i> ในอาหาร
3	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร
4	DMSc F 2012	วิธีตรวจวิเคราะห์ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในอาหาร โดยวิธี MPN
5	DMSc F 2013	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร โดยวิธี pour plate
6	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

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

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 แคดเมียม โครเมียม ทองแดง แมงกานีส นิเกิล สังกะสี และเงินในน้ำ
5	DMSc F 1046	การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ
6	DMSc F 1047	การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดในอาหาร 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

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	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนของตัวอย่างโดย 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	การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในเกลือบริโภคที่เสริมไอโอดีนโดยวิธีไตเตรชัน
10	DMSc F 1064	การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์และดัด โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
11	DMSc F 1065	การตรวจวิเคราะห์เรกโดพามีนในเนื้อสัตว์และดัด โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
12	DMSc F 1066	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอสเทรมฟนิคอลลอก้างในอาหาร โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
13	DMSc F 1067	การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol) ในเนื้อสัตว์และดัด โดยเทคนิค LC-MS/MS
14	DMSc F 1068	การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอสเทรมฟนิคอลลอก้างในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค 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



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

www.dmsc.moph.go.th

