กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
www.dmsc.moph.go.th

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร

Standard Methods for Food Analysis

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 1

Standard Methods for Food Analysis

Volume I

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วิธีมาตรฐาน
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 1

Standard Methods for Food Analysis

Volume I

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

คำปรารภ

บทบาทหน้าที่และภารกิจหนึ่งที่สำคัญยิ่งของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ การวิเคราะห์วิจัยคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเพื่อใช้ในการควบคุมอาหารให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติอาหาร อันเป็นหน้าที่ของกระทรวงสาธารณสุข ที่จะต้องคุ้มครองผู้บริโภคภายในประเทศให้มีสุขภาพที่ดี ได้รับอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและปลอดภัยจากสารอันตรายทั้งที่เป็นสารเคมี และเชื้อโรคต่าง ๆ ทั้งนี้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีห้องปฏิบัติการหลักด้านวิเคราะห์อาหารอยู่ที่ส่วนกลาง คือสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และมีศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อีก 14 แห่ง กระจายอยู่ทุกภูมิภาคทั่วประเทศ เพื่อรองรับการดำเนินการด้านคุ้มครองผู้บริโภคร่วมกับหน่วยงานต่าง ๆ เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและตำรวจ เป็นต้น

คุณภาพและความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนการยอมรับในระดับประเทศและนานาชาติเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเป็นหลักฐานสำคัญที่จะใช้ในการพัฒนา ปรับปรุงคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร รวมทั้งดำเนินการทางกฎหมายที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้การเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) ของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2558 จะมีการนำเข้าและการส่งออกอาหารมากขึ้น จึงจำเป็นต้องมีมาตรฐานที่ดีในด้านการตรวจวิเคราะห์ไว้รองรับ ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้นำระบบมาตรฐานสากลมาใช้ในการดำเนินการทางห้องปฏิบัติการ (ISO/IEC 17025) และการเลือกใช้วิธีมาตรฐานและวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับในระดับนานาชาติเป็นสิ่งที่ปฏิบัติมานานแล้ว

อย่างไรก็ตาม เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์อาหารมีมาตรฐานเดียวกันทั้งกรมฯ จึงได้มอบหมายให้สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ซึ่งมีประสบการณ์ด้านการตรวจวิเคราะห์และพัฒนาวิธีวิเคราะห์อาหารมายาวนาน และมีกิจกรรมการวิเคราะห์อาหารที่ครอบคลุมทุกสาขา ทั้งยังได้รับการยอมรับให้เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับประเทศ ดำเนินการจัดทำคู่มือวิเคราะห์อาหารขึ้น โดยนำวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่มีใช้อยู่เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นวิธีอ้างอิงกรณีเกิดข้อสงสัยหรือโต้แย้งเกี่ยวกับผลวิเคราะห์ หรือเพื่อการควบคุมอาหารตาม

กฎหมาย เป็นต้น มารวบรวมไว้ด้วยกัน และกำหนดหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกวิธีวิเคราะห์เพิ่มเติมสำหรับรายการวิเคราะห์ต่าง ๆ ที่ยังไม่มีวิธีมาตรฐานหรือวิธีอ้างอิง เพื่อกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทั้งทางด้านเคมีและจุลชีววิทยา

หวังว่าเอกสารวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เล่มที่ 1 จัดทำโดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และต่อหน่วยงานอื่น ๆ ที่จะนำไปใช้ในการปฏิบัติและอ้างอิงต่อไป

(นายแพทย์นิพนธ์ โพธิ์พัฒนชัย)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สารบัญ

หน้า

หน้า

เกณฑ์ในการคัดเลือก วิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมี ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)

เกณฑ์ในการคัดเลือกวิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมี ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิง มีหน้าที่ความรับผิดชอบในการวิเคราะห์ วิจัย และเฝ้าระวังคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร ที่ผลิตและจำหน่ายเพื่อการบริโภคภายในประเทศ โดยมีห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง ตั้งอยู่ในส่วนกลางและทุกภูมิภาคทั่วประเทศ ข้อมูลผลการวิเคราะห์ถูกนำไปใช้ในการควบคุมอาหารตามกฎหมาย โดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด รวมทั้งตำรวจนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ ซึ่งได้แก่ การดำเนินคดีในกรณีที่อาหารนั้นมีคุณภาพหรือความปลอดภัยไม่เป็นไปตามมาตรฐานที่กฎหมายกำหนด นอกจากนี้ข้อมูลการวิจัยและเฝ้าระวังถูกนำไปประเมินความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยให้แก่ผู้บริโภคภายในประเทศ และใช้ในการกำหนดมาตรฐานคุณภาพความปลอดภัยอาหาร

การเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงในทางกฎหมาย ทำให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการพัฒนาคุณภาพการตรวจวิเคราะห์อาหารอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่สากลยอมรับเป็นส่วนใหญ่ เช่น วิธีที่ได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการพิจารณามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex: โคเด็กซ์) เพื่อสร้างความเป็นธรรมแก่ทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม วิธีมาตรฐานที่มีอยู่ไม่ครอบคลุมรายการวิเคราะห์ทั้งหมดที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข จำเป็นต้องคัดเลือกวิธีวิเคราะห์จากแหล่งอื่น ๆ มาใช้ด้วย ซึ่งวิธีจากแหล่งอื่น ๆ นี้มีอยู่เป็นจำนวนมาก เพราะในปัจจุบันเทคนิคการตรวจวิเคราะห์อาหารมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วเพื่อให้ทันกับความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการผลิตอาหาร และการบังเกิดขึ้นของสารใหม่ ๆ ที่มีการเติมลงในอาหารด้วยวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน รวมทั้งที่ปนเปื้อนมาในอาหารด้วยวิธีการต่าง ๆ การตัดสินใจเลือกวิธีใด ๆ มาใช้จึงจำเป็นต้องมีเกณฑ์การพิจารณารองรับเพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำผลวิเคราะห์ไปใช้อย่างแท้จริง

ประเภทของวิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมี (Types of methods)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดประเภทวิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมีเป็น 4 ประเภท เพื่อให้สอดคล้องกับ Codex ดังนี้

1. Defining methods (Type I) คือวิธีวิเคราะห์ซึ่งใช้หาค่า (ผลการวิเคราะห์) ซึ่งหาได้ด้วยวิธีนี้เท่านั้น และใช้ในการกำหนดค่ามาตรฐานของอาหาร ผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สอบกลับได้ไปที่วิธีวิเคราะห์นี้ (traceable to the method) ดังนั้นผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีอื่นจึงไม่สามารถนำมา

เปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์จากวิธีนี้ได้ วิธี Defining method นี้โดยทั่วไปนิยมเรียกว่า Empirical method ตัวอย่างเช่น วิธีหาความชื้นในอาหารโดยการอบแห้ง (loss on drying) แล้วคำนวณน้ำหนักที่หายไปเป็นปริมาณความชื้น

2. Reference methods (Type II) คือวิธีวิเคราะห์ซึ่งกำหนดให้เป็นวิธีอ้างอิงในกรณีที่ไม่ได้ใช้วิธี Type I วิธีนี้อาจเลือกมาจากวิธี Type III วิธีอ้างอิงนี้จะใช้ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งเรื่องผลการวิเคราะห์ และในการทดสอบหรือเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการอาจใช้วิธีนี้ตามวัตถุประสงค์อื่นได้ วิธี Type II เป็น Non-empirical method ผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สอบกลับได้ไปที่วัสดุอ้างอิงรับรอง (traceable to the CRM)

3. Alternative Methods (Type III) คือวิธีวิเคราะห์ซึ่งมีคุณลักษณะตามเกณฑ์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กำหนด ควรใช้วิธีนี้ในการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย วิธี Type III เป็น Non-empirical method ผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สอบกลับได้ไปที่วัสดุอ้างอิงรับรอง (traceable to the CRM)

4. Tentative Methods (Type IV) เป็นวิธีวิเคราะห์ซึ่งมีการใช้ต่อ ๆ กันมา หรือเป็นวิธีใหม่ซึ่งยังไม่มีการกำหนดเกณฑ์การยอมรับ วิธี Type IV อาจเป็น Empirical method หรือ Non-empirical method ก็ได้

โดยสรุป รายการวิเคราะห์ใดที่ระบุวิธีวิเคราะห์ซึ่งเป็น Type I จะไม่มีการระบุวิธีอื่นอีก ส่วนรายการวิเคราะห์ที่ใช้วิธีที่เป็น non-empirical นั้น อาจมีการระบุทั้งวิธีที่เป็น Type II และ Type III เพื่อพิจารณาใช้ให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการนำผลไปใช้ อย่างไรก็ตามใน 1 รายการวิเคราะห์จะมีวิธีวิเคราะห์ที่เป็น Type II (ถ้ามี) เพียง 1 วิธี แต่อาจมี Type III ได้หลายวิธี ในกรณีที่รายการวิเคราะห์นั้นยังไม่สามารถกำหนดวิธีทั้ง Type I, Type II หรือ Type III ได้ ก็อาจพิจารณาเลือกใช้วิธีที่เป็น Type VI

เกณฑ์การพิจารณาคัดเลือกวิธีวิเคราะห์ (Criteria for the Selection of Methods of Analysis)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เลือกใช้วิธีวิเคราะห์อาหารทางเคมี โดยจะเลือกวิธีที่เป็นวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดยองค์กรระหว่างประเทศ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สำหรับอาหารหรือกลุ่มอาหารเช่นวิธีที่ Codex ยอมรับ หากไม่มีวิธีมาตรฐานดังกล่าว ก็จะพิจารณาคัดเลือกวิธีจากแหล่งอื่น

สำหรับวิธีที่เป็น non-empirical method เพื่อพิจารณากำหนดเป็นวิธี Type II และ Type III นั้นจะพิจารณาดังต่อไปนี้

1. เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ โดยพิจารณาจากข้อมูลที่เกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะ ดังนี้
   - ช่วงของความเข้มข้น และขอบข่ายของการวิเคราะห์ (applicability)
   - ความเที่ยง (precision) : reproducibility (between laboratories)

- ความแม่น (accuracy)
- ขีดจำกัดของวิธี (limit of detection) และขีดจำกัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation)

ข้อมูลเหล่านี้จะพิจารณาว่าสอดคล้องกับเกณฑ์ที่ได้กำหนดค่าไว้แล้วหรือไม่ ซึ่งรายละเอียดการกำหนดเกณฑ์ที่เป็นค่าต่าง ๆ จะอยู่ในหัวข้อ numeric approach criteria สำหรับคุณลักษณะเฉพาะอื่น ๆ ที่มีการพิจารณาเพิ่มเติม เช่น ความจำเพาะ (selectivity) ความใช้ได้ภายใต้สภาวะปกติ (practicability under normal laboratory conditions) เป็นต้น

2. เป็นวิธีที่สามารถใช้ได้กับงานประจำ (routine use)
3. เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์อาหารตามที่ระบุในประกาศกระทรวงสาธารณสุข
4. เป็นวิธีที่ใช้ได้กับอาหารหลายกลุ่ม มากกว่าที่จะเป็นวิธีเฉพาะสำหรับอาหารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น

การกำหนดเกณฑ์สำหรับประเมินคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม (Numeric approach criteria)

วิธีวิเคราะห์ประเภท Type II และ Type III จัดเป็น Non-empirical method สามารถสอบกลับได้ไปที่วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) วิธีเหล่านี้แม้มีเทคนิคหรือหลักการที่แตกต่างกันแต่มีความเท่าเทียม (equivalent) กันในเรื่องของความถูกต้อง และความน่าเชื่อถือ ซึ่งเป็นที่ยอมรับและใช้กันทั่วไป เกณฑ์การเลือกวิธีวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ จึงสามารถกำหนดเป็นเกณฑ์เชิงปริมาณสำหรับคุณลักษณะเฉพาะต่าง ๆ ที่จำเป็นได้ โดยคำนวณจากความเข้มข้นที่ถูกกำหนดเป็นค่ามาตรฐานตามกฎหมายซึ่งอาจเป็นค่าสูงสุด หรือค่าต่ำสุด หรือช่วง (Maximum และ/หรือ Minimum Limit: ML) เกณฑ์นี้ใช้สำหรับวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบด้วย collaborative study วิธีที่ไม่ผ่าน collaborative study ควรพิจารณาโดยใช้เกณฑ์อื่น

คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถนำมากำหนดเป็นเกณฑ์ได้ ได้แก่ applicability, LOD and LOQ, method precision derived from collaborative method performance studies, recovery, trueness

1. Applicability

วิธีนี้ต้องใช้ได้กับคุณสมบัติของอาหารตามที่ระบุไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ช่วงความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ได้ (the minimum applicable range) จะขึ้นกับ ML โดยอาจกำหนดจากค่า reproducibility standard deviation (s_R) ซึ่ง derived จาก Horwitz's equation สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดอาจพิจารณาจากค่า LOD และ LOQ ก็ได้ โดยเฉพาะในกรณีที่ ML มีค่าต่ำ ๆ

ช่วงความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ได้กำหนดเป็นเกณฑ์ได้ดังนี้

For ML $\geq$ 0.1 mg/kg, [ช่วงความเข้มข้นต่ำสุด คือ ML $\pm$ $3s_R$]

For ML $<$ 0.1 mg/kg, [ช่วงความเข้มข้นต่ำสุด คือ ML $\pm$ $2s_R$]

โดย S_R คือ reproducibility standard deviation ได้จาก

$$S_R = \frac{c \times 2C^{-0.1505}}{100}$$

c คือ ความเข้มข้นของสาร ในที่นี้คือ ML

C เป็นค่าความเข้มข้นที่กำจัดหน่วยแล้ว (dimensionless) เช่น ที่ความเข้มข้น 1 mg/kg, $C = 10^{-6}$ เป็นต้น

ดังนั้น $$S_R = \frac{ML \times 2\, C_{ML}^{\ -0.1505}}{100}$$

2. Limit of detection (LOD)

   For ML ≥ 0.1 mg/kg, LOD ≤ $\frac{1}{10}$ ML

   For ML < 0.1 mg/kg, LOD ≤ $\frac{1}{5}$ ML

3. Limit of quantitation (LOQ):

   For ML ≥ 0.1 mg/kg, LOQ ≤ $\frac{1}{5}$ ML

   For ML < 0.1 mg/kg, LOQ ≤ $\frac{2}{5}$ ML

4. Precision

   For ML ≥ 0.1 mg/kg, $RSD_R \leq 2\ PreSD_R$

   For ML < 0.1 mg/kg, $RSD_R < 22\%$

   RSD_R = relative standard deviation of reproducibility

   $PreSD_R = 2C^{-0.1505}$ (คำนวณจาก Horwitz's Equation)

5. Recovery (R)

   โดยทั่วไปสามารถใช้เกณฑ์สำหรับ recovery ตามตารางที่ 1 ได้

ตารางที่ 1 เกณฑ์ทั่วไปสำหรับ Recovery

Concentration	Ratio	Unit	Recovery (%)
100	1	100% (100 g/100 g)	98-102
≥ 10	10^{-1}	≥ 10% (10 g/100 g)	98-102
≥ 1	10^{-2}	≥ 1% (1 g/100 g)	97-103
≥ 0.1	10^{-3}	≥ 0.1% (0.1 g/100 g)	95-105
0.01	10^{-4}	100 mg/kg	90-107
0.001	10^{-5}	10 mg/kg	80-110
0.0001	10^{-6}	1 mg/kg	80-110
0.00001	10^{-7}	100 μg/kg	80-110
0.000001	10^{-8}	10 μg/kg	60-115
0.0000001	10^{-9}	1 μg/kg	40-120

6. Trueness

ข้อมูลการศึกษา Trueness ของวิธีวิเคราะห์ ควรเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วย CRM Trueness

สำหรับวิธีวิเคราะห์รายการซึ่งมีค่า ML ต่างๆ กัน อาจกำหนดเกณฑ์ไว้เป็นแนวทางดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์การเลือกวิธีวิเคราะห์สำหรับรายการวิเคราะห์ที่มีค่ามาตรฐาน (ML) ต่างๆ

ML unit	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	1 g/kg	10 g/kg
Concentration ratio of ML (C_{ML})	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Min. application range	From 0.0006 to 0.0014	From 0.006 to 0.014	From 0.03 to 0.17	From 0.52 to 1.48	From 6.6 to 13.3	From 76 to 124	From 0.83 to 1.2	From 8.8 to 11
LOD (≤ mg/kg)	0.0002	0.002	0.01	0.1	1	10	100	1000
LOQ (≤ mg/kg)	0.0004	0.004	0.02	0.2	2	20	200	2000
RSD_R (≤ %)	44	44	44	32	22	16	12	8
Recovery (%)*	40-120	60-115	80-110	80-110	80-110	90-107	95-105	97-103

*สำหรับ recovery อาจใช้เกณฑ์อื่นที่มีความเหมาะสมมากกว่า

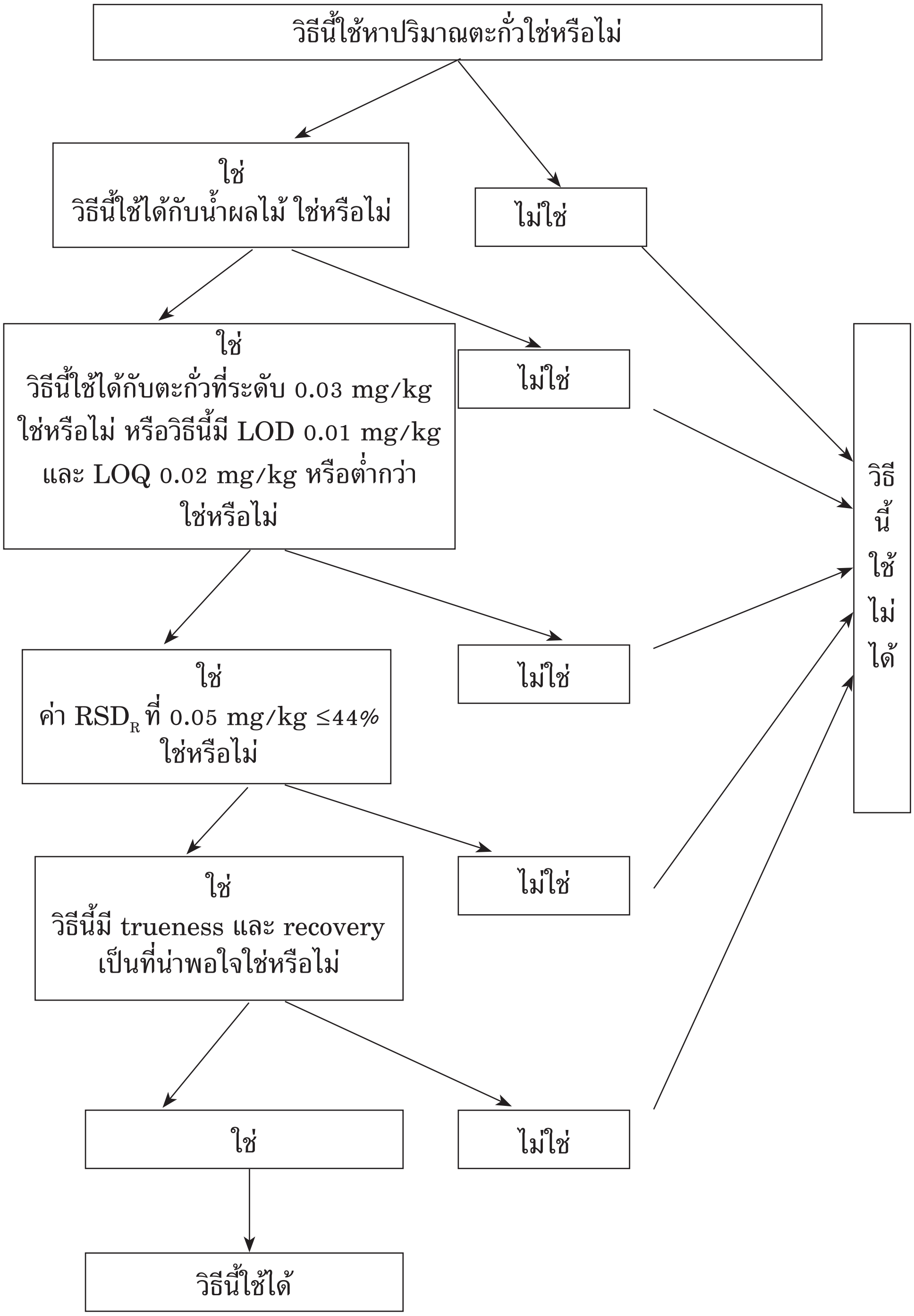
ตัวอย่างของการกำหนดเกณฑ์ที่เป็นค่าตัวเลข

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 (พ.ศ. 2543) กำหนดค่ามาตรฐานสำหรับตะกั่วในน้ำผลไม้ซึ่งจัดเป็นเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ที่ไม่เกิน 0.05 mg/kg (ML = 0.05 mg/kg) สามารถกำหนดเกณฑ์สำหรับใช้เลือกวิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำผลไม้ได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เกณฑ์การเลือกวิธีวิเคราะห์ที่จะใช้หาปริมาณตะกั่วในน้ำผลไม้

Applicability: Analyte **Matrix:** **ML:**	**Lead** **Juice** **0.05 mg/kg**
Lower level of min. application range:	≤ 0.03 mg/kg (= $ML-2s_R$ =0.05 mg/kg −0.44 × 0.05 mg/kg)
LOD:	≤ 0.01 mg/kg (= $\frac{1}{5}$ ML = 0.05 mg/kg × $\frac{1}{5}$)
LOQ:	≤ 0.02 mg/kg (= $\frac{2}{5}$ ML = 0.05 mg/kg × $\frac{2}{5}$
Precision	@0.05 mg/kg, the RSD_R ≤ 44%
Recovery:	The method procedure does not include an extraction step and hence recovery is of no relevant
Trueness	Use of CRM

นั่นคือวิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำผลไม้จะต้องใช้วิธีที่สามารถหาปริมาณตะกั่วได้ต่ำถึง 0.03 mg/kg ด้วยความเที่ยงที่ไม่เกิน 44% ในการประเมินวิธีว่าใช้ได้หรือไม่ควรพิจารณาดังนี้



ภาพที่ 1 การประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตัวอย่างการประเมินวิธีวิเคราะห์

การประเมินวิธีวิเคราะห์สำหรับตะกั่วในน้ำผลไม้จากวิธีที่เสนอเพื่อพิจารณารวม 8 วิธี ซึ่งมีข้อมูลดังตารางที่ 4 (ทุกวิธีผ่านการทดสอบวิธีโดยการทำ collaborative study)

ตารางที่ 4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว ซึ่งผ่านการทำ collaborative study รวม 8 วิธี

Method No.	Applicability	Principle	Assessed level (mg/kg)	LOD (mg/kg)	RSD_R (%)	Applicable Yes/No
1	All foods	Flame AAS	2.2-29		4.9-36	No
2	All foods (chicken, apple)	Anodic stripping voltammetry	0.03-2.8	0.03	17-106	No
3	Sugars	GF-AAS	0.03-0.50		12-30	Yes
4	Fats and oils	GF-AAS	0.018-0.090		5.9-30	No
5	Natural mineral water	AAS	0.0197-0.977	<0.01	2.8-4.2	No
6	All foods	GF-AAS After dry ashing	0.045-0.25	<0.01	26-40	No
7	All foods, except oils, fats and extremely fatty products	AAS after microwave oven digestion under pressure	0.005-1.62	0.014	26-44	Yes
8	All foods	ICP-MS after pressure digestion	0.013-2.45	<0.01	8-47	Yes

การพิจารณาวิธีที่เสนอมา มีการพิจารณาตามตารางที่ 5 ต่อไปนี้คือ

ตารางที่ 5 การพิจารณาความใช้ได้ของวิธีที่เสนอมา

Method No.	Applicable Yes/No	เหตุผล
1	No	Flame AAS ไม่สามารถวิเคราะห์ตะกั่วได้ที่ 0.05 mg/kg
2	No	ค่า RSD_R เท่ากับ 106% ที่ 0.03 mg/kg (สูงกว่า 44%)
3	Yes	ถึงแม้ว่า applicability ไม่ได้ระบุน้ำผลไม้ แต่พิจารณาว่าน้ำผลไม้มีน้ำตาลสูง และค่า RSD_R น่าพอใจ
4	No	applicability ระบุสำหรับน้ำมันและไขมันเท่านั้น

ตารางที่ 5 การพิจารณาความใช้ได้ของวิธีที่เสนอมา (ต่อ)

Method No.	Applicable Yes/No	เหตุผล
5	No	applicability ระบุสำหรับน้ำเท่านั้น
6	No	ระดับความเข้มข้นที่ validate ไม่ต่ำเพียงพอ อย่างไรก็ตาม GF-AAS สามารถวิเคราะห์ได้ที่ 0.03 mg/kg
7	Yes	ระดับความเข้มข้นที่ validate and RSD_R เหมาะสม
8	Yes	ระดับความเข้มข้นที่ validate and RSD_R เหมาะสม สำหรับระดับ 0.03 mg/kg และสูงกว่า

จากการประเมินพบว่าวิธีที่ 3, 7 และ 8 สามารถใช้หาปริมาณตะกั่วในน้ำผลไม้ซึ่งมีค่ามาตรฐานที่ไม่เกิน 0.05 mg/kg

จะเห็นได้ว่าการตัดสินวิธีวิเคราะห์ไม่ควรพิจารณาจากเกณฑ์ numeric approach เพียงอย่างเดียว ต้องพิจารณาโดยอาศัยความรู้ และทักษะเกี่ยวกับเทคนิควิธีวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการปฏิบัติงาน และเครื่องมือเป็นอย่างดีด้วย (Codex Standard 1993-1995, Rev 2-2006, General Standard for contaminants and toxin in food)

เกณฑ์ทั่วไปสำหรับการเลือกวิธีวิเคราะห์ที่มีการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียว (General Criteria for the Selection of Single-Laboratory Validated Methods of Analysis)

มีหลายกรณีที่ไม่สามารถทำการทดสอบวิธีโดย collaborative study ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีที่ใช้หา multi-analyte หรือวิธีที่ใช้หา analyte ใหม่ ๆ จำเป็นต้องยอมรับวิธีที่ผ่านการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการเดียว อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวจะต้องเป็นไปตามเกณฑ์ต่อไปนี้

1. การทดสอบวิธีมีการดำเนินการตาม protocol ที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล ซึ่งได้แก่วิธีการที่ระบุใน The Harmonized IUPAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis
2. การนำวิธีนี้มาใช้จะต้องมีระบบมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 รองรับ

นอกจากนี้ควรมีการดำเนินการต่อไปนี้ควบคู่ไปด้วย

- เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอ (ถ้ามี);
- ทดสอบด้วย CRM (ถ้ามี);
- ควรทวนสอบโดยการเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่ผ่านการทดสอบด้วย collaborative study (ถ้ามี)

วิธีมาตรฐานทางเคมี
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

1.	นางลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์	ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร
2.	นางกนกพร อธิสุข	ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหาร (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)
3.	นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย	ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านความปลอดภัยของอาหาร (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)
4.	นางนิภาภรณ์ ลักษณ์สมยา	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
5.	นางสาวสุวรรณี ธีรภาพธรรมกุล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
6.	นางสาวจิตผกา สันทัดรบ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
7.	นางสาวมยุรี อุรารุ่งโรจน์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. "H_2O" 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_2SO_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_3COOH
Hydrobromic acid	47.0–49.0% HBr
Ammonium hydroxide	28–30% NH_3
Phosphoric acid	≥ 85% H_3PO_4

4. การใช้สัญลักษณ์ (ตัวเลข+ตัวเลข) หลังชื่อของสารเคมี เช่น HCl (1 + 2) หมายถึง สารผสมระหว่าง HCl 1 หน่วยปริมาตร กับ H_2O 2 หน่วยปริมาตร
5. คำย่อที่ใช้ และคำเต็ม แสดงในตาราง

Abbreviation	**Word/คำเต็ม**
AAS	Atomic absorption spectrometer
Ac	acetyl, CH_3CO–
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_3OH
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
MS	Mass spectrometer
MW	molecular weight
N	Normal
ng	nanogram
-OAc	acetate
-OCN	cyanate
od	outer diameter or dimension
ppm	part per million
ppb	part per billion
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
wt	Weight
µg	Microgram (10^{-6} g)
µL	Microliter (10^{-6} L)
µm	Micron, micrometer (10^{-6} m)
/	per
%	percent
>	more than
<	less than
≥	equal to and more than
≤	equal to and less than

วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1001	นมพร้อมดื่ม (น้ำนมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ) นมผง นมข้นไม่หวาน นมแปลงไขมัน นมผงแปลงไขมัน นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน นมข้นแปลงไขมันหวาน นมเปรี้ยว	โปรตีน (protein)	I	19
DMSc F 1002	นมพร้อมดื่ม (น้ำนมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ) นมแปลงไขมัน นมเปรี้ยว	ไขมัน (fat)	I	27
DMSc F 1003	นมผง นมผงแปลงไขมัน	ไขมัน (fat)	I	31
DMSc F 1004	นมข้นไม่หวาน นมข้นหวาน นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน นมข้นแปลงไขมันหวาน	ไขมัน (fat)	I	35
DMSc F 1005	เนยแข็ง	ไขมัน (fat)	I	39
DMSc F 1006	นมพร้อมดื่ม (น้ำนมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ) นมข้นไม่หวาน นมแปลงไขมัน นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน ครีม	ของแข็งทั้งหมด (total solids)	I	43
DMSc F 1007	นมข้นหวาน นมข้นแปลงไขมันหวาน	ของแข็งทั้งหมด (total solids)	I	45
DMSc F 1008	เนยแข็ง	ของแข็งทั้งหมด (total solids)	I	49
DMSc F 1009	นมพร้อมดื่ม (น้ำนมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ) นมแปลงไขมัน	เนื้อนมไม่รวมไขมัน (Milk solids not fat)	I	53
DMSc F 1010	นมข้นไม่หวาน นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน	เนื้อนมไม่รวมไขมัน (Milk solids not fat)	I	55

วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ต่อ)

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
DMSc F 1011	ชา	ความชื้น (moisture)	I	57
DMSc F 1012	กาแฟ	ความชื้น (moisture)	I	59
DMSc F 1013	โกโก้ผง	ความชื้น (moisture)	I	61
DMSc F 1014	ชาสมุนไพร	ความชื้น (moisture)	I	63
DMSc F 1015	ชา	เถ้าทั้งหมด (total ash) เถ้าที่ละลายน้ำได้ (water soluble ash)	I	65
DMSc F 1016	กาแฟที่คั่วแล้ว	เถ้า (ash) เถ้าที่ละลายน้ำได้ (water soluble ash)	I	69
DMSc F 1017	ชา	สารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อน (hot water extract)	I	71
DMSc F 1018	เครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักและผลไม้	แอลกอฮอล์	I	73
DMSc F 1019	อาหาร	Acesulfame K Aspartame	II	77
DMSc F 1020	อาหาร	Cyclamate Saccharin	II	83
DMSc F 1021	อาหาร	ตะกั่ว (lead) แคดเมียม (cadmium) ทองแดง (copper) สังกะสี (zinc) เหล็ก (iron)	II	89
DMSc F 1022	อาหารกระป๋อง	ดีบุก (tin)	II	95
DMSc F 1023	อาหาร	สารหนู (arsenic)	II	99
DMSc F 1024	ข้าวโพด ถั่วลิสง	อะฟลาทอกซิน (aflatoxin B_1, B_2, G_1 & G_2)	II	103

DMSc F 1001: การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดย Kjeldahl method Determination of nitrogen by the Kjeldahl method

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในนมและผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมพร้อมดื่ม (milk) นมผง (milk powder) นมข้นไม่หวาน (Evaporated milk) นมแปลงไขมัน (Blend of skimmed milk and vegetable fat) นมผงแปลงไขมัน (Blend of skimmed milk and vegetable fat in powdered form) นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน (Blend of evaporated skimmed milk and vegetable fat) นมข้นหวาน (Sweetened condensed milk) นมเปรี้ยว (Fermented milk) และนมปรุงแต่ง (Flavor milk)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 991.20 Nitrogen (Total) in Milk. IDF-ISO-AOAC Method

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

2.3 AOAC Official Method 936.15 Standard Solution of Hydrochloric Acid.

3. หลักการ (Principle)

โปรตีนในนมถูกย่อยใน H_2SO_4 ใช้ $CuSO_4.5H_2O$ เป็น catalyst และ K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของ H_2SO_4 ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเกลือแอมโมเนียม เติม NaOH มากเกินพอ และกลั่นด้วยไอน้ำ NH_3 ถูกจับไว้ใน H_3BO_3 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยการไตเตรต ด้วยหลักการเดียวกันสามารถดำเนินการได้ 2 วิธี คือ Traditional method และ Block digestion/Steam distillation method

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

Traditional method

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 Digestion flasks - Kjeldahl flask ขนาด 500 หรือ 800 ml

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

4.4 Digestion/distillation system – Traditional apparatus สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

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

Block digestion/Steam distillation method

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 Digestion block – Aluminium alloy block หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า ที่สามารถปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ พร้อมทั้งอุปกรณ์วัดอุณหภูมิ

4.3 Digestion tubes ขนาด 250 ml

4.4 Distillation unit – ใช้สำหรับ steam distillation สามารถต่อได้กับ digestion tubes ขนาด 250 ml และ distillation titration flasks ขนาด 500 ml

4.5 Distillation titration flask – graduated Erlenmeyer titration flask ขนาด 500 ml

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

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 H_2SO_4 ความเข้มข้น 95-98% Nitrogen free

5.2 Copper catalyst solution - $CuSO_4.5H_2O$ Nitrogen free เตรียมเป็นสารละลาย 0.05 g/ml H_2O

5.3 K_2SO_4 Nitrogen free (หรือใช้ Kjeldahl catalyst tablets สำเร็จรูปแทน catalyst ในข้อ 5.2 และ 5.3)

5.4 Sodium hydroxide solution - 50% (w/w) nitrate free NaOH (ความเข้มข้นและปริมาณเปลี่ยนแปลงได้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต)

5.5 Boiling chips – Mesh size 10

5.6 Methyl red/Bromocresol green indicator solution – ละลาย methyl red 0.2 g ใน 95% ethanol และปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol ครบ 100 ml ละลาย bromocresol green 1 g ใน 95% ethanol และปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol ครบ 500 ml ผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน

5.7 Boric acid solution - 4% with indicator ละลาย H_3BO_3 40 g ด้วยน้ำ เจือจางจนครบปริมาตร 1 L เติม indicator (5.6) 3 ml สารละลายนี้จะมีสีส้มอ่อน (1-4% สำหรับ Block digestion)

5.8 0.1000 M Hydrochloric acid standard solution – เตรียมเอง หรือใช้สารละลายที่มีใบรับรองความเข้มข้น 0.0995-0.1005 M และใช้ค่า 0.1000 M ในการคำนวณ

5.8.1 ปิเปต conc. HCl 8.6 ml ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 1 L ซึ่งมีน้ำอยู่ประมาณ 600 ml ปรับให้ครบปริมาตร 1 L ด้วย H_2O ผสมให้เข้ากัน

5.8.2 standardization 0.1000 M HCl: ชั่ง anh. Na_2CO_3 (อบที่ 120°C เป็นเวลา 3 hr และเก็บใน desiccator) ประมาณ 0.25 g ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วย H_2O (ใช้ H_2O ที่ต้มให้เดือดเพื่อไล่ CO_2 และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง) ประมาณ 80 ml เติม methyl red indicator ประมาณ 5 หยด จะได้สารละลายสีส้มอ่อน นำไปไตเตรตกับ 0.1000 M HCl ที่เตรียมไว้จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีของ reference solution เล็กน้อย (reference solution: H_2O ที่ปราศจาก CO_2 80 ml เติม methyl red indicator 5 หยด) นำไปต้มให้เดือดเบา ๆ บน hot plate นานประมาณ 2 min ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปไตเตรตต่อกับ 0.1000 M HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม บันทึกปริมาตรรวมของ 0.1000 M HCl ที่ใช้ไตเตรต คำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของ 0.1000 M HCl จากสมการ

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

โดย
- M = Molarity ของ HCl (mole/L)
- W = น้ำหนักของ anh. Na_2CO_3 (g)
- V = ปริมาตรของสารละลาย 0.1000 M HCl ที่ใช้ไตเตรต (ml)
- 52.994 = น้ำหนักสมมูลของ Na_2CO_3

5.9 Ammonium sulfate - 99.9% $(NH_4)_2SO_4$

5.10 Tryptophan หรือ lysine hydrochloride - 99% $C_{11}H_{12}N_2O_2$ หรือ $C_6H_{15}ClN_2O_2$

5.11 Sucrose - Nitrogen free

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างที่เป็นผง ให้สุ่มตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของภาชนะบรรจุให้ได้ประมาณ 250 g เก็บในขวดปากกว้าง คนหรือกวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 ตัวอย่างที่เป็นของเหลว สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วย เทผสมลงในภาชนะสะอาด ให้ได้ปริมาตรรวมประมาณ 200-300 ml คนหรือกวนหรือเทกลับไปมา ให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้ามีไขมันหรือครีมจับเป็นก้อนหรือติดที่ภาชนะ ให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 38°C ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

Traditional method

7.1 ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใส่ใน beaker ประมาณ 1-5 g (ปริมาณไนโตรเจน 0.005-0.2 g)

7.2 ถ่ายตัวอย่างลงใน digestion flask ใช้ H_2O ประมาณ 25 ml rinse ตัวอย่างที่ติดอยู่ที่คอขวดลงไปใน flask เติม K_2SO_4 15.00 g, $CuSO_4.5H_2O$ solution 1 ml และ boiling chips 8-10 ชิ้น ลงใน digestion flask แล้วปิดจุก และวิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O แทนตัวอย่าง

7.3 Digestion burner setting – ปรับตั้ง heater โดยใช้ flask ที่มี H_2O ประมาณ 250 ml เติม boiling chips 3-4 ชิ้น ตั้งความร้อนให้สามารถทำให้น้ำเดือดได้ภายในเวลา 5-6 min

7.4 Digestion – ย่อยตัวอย่าง โดยใช้ความร้อนต่ำไม่ให้เกิดฟองล้นออกจากคอของ Kjeldahl flask เป็นเวลาประมาณ 20 min หรือจนกว่ามีควันขาวเกิดขึ้น หลังจากนั้นเพิ่มความร้อนประมาณครึ่งหนึ่งของความร้อนที่ได้ทดลองไว้ในข้อ 7.3 ประมาณ 15 min แล้วเพิ่มความร้อนเท่ากับความร้อนที่ได้ทดลองไว้ในข้อ 7.3 จนกระทั่งได้ตัวอย่างมีสีเขียวอมฟ้าจาง ๆ และใส ต้มให้เดือดต่อไปอีก 1-1.5 hr หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 min เติม H_2O 300 ml แกว่ง flask เพื่อให้สารละลายผสมกัน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปกลั่น ขั้นตอนนี้สามารถเก็บไว้ได้โดยปิดจุกให้แน่น

7.5 Distillation – เปิดน้ำหล่อเย็น เติม H_3BO_3 solution ที่มี indicator 50 ml ลงใน graduated Erlenmeyer titration flask ขนาด 500 ml ต่อ flask รองรับ distillate โดยให้ปลายของ tube ที่ต่อจากปลายของ condenser จุ่มอยู่ใน H_3BO_3 solution ค่อย ๆ เติม 50% NaOH 75 ml อย่างระมัดระวังโดยเทลงข้าง ๆ flask ช้า ๆ ห้ามแกว่ง ชั้นของ NaOH จะอยู่ข้างใต้ ประกอบ flask เข้ากับ condenser ทันที หลังจากนั้นเขย่าอย่างแรงเพื่อให้สารละลายผสมกัน ให้ความร้อนจนกระทั่ง NH_3 ถูกกลั่นออกมา (≥ 150 ml distillate หรือ ≥ 200 ml total volume) ระหว่างกลั่นต้องเฝ้าดูตลอดเวลา เนื่องจากอาจเกิดการ bump ที่จุดนี้ เมื่อการกลั่นสมบูรณ์ ยก receiving flask ออก หยุดให้ความร้อนไตเตรต H_3BO_3 solution ด้วย 0.1000 M HCl จนกระทั่งจุดยุติเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้

Block digestion/Steam distillation method

7.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1–5 g ใส่ลงใน digestion tube ที่มี K_2SO_4 12 g, $CuSO_4.5H_2O$ solution 1 ml (หรือใช้ Kjeldahl catalyst tablets) เติม H_2SO_4 20 ml (หรือตามคำแนะนำของผู้ผลิต) และวิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O แทนตัวอย่าง

7.2 นำ digestion tube วางลงใน tube rack วาง heat shields แล้วสวม exhaust manifold ลงบนปากของ digestion tube ให้ปิดพอดี ยก rack ไปวางบน digestion block 180–230°C เปิดระบบดูดควัน (ในกรณีที่ใช้น้ำเป็นตัวดูดควันให้ต่อสายจาก exhaust manifold ไปยังก๊อกน้ำที่เตรียมไว้ และเปิดน้ำ) ย่อยจนกระทั่งเกิดควันสีขาว (ประมาณ 30 min) เพิ่มอุณหภูมิของ digestion block 410–430°C ย่อยจนได้ตัวอย่างสีเขียวอมฟ้าจาง ๆ และใส (clear with light blue-green color) และย่อยตัวอย่างให้เดือดต่ออีกประมาณ 1 hr (เวลาที่ใช้ในการย่อยทั้งหมดประมาณ 1.75–2.5 hr)

7.3 ยก tube rack ออกจากเครื่องย่อย โดยยังมี exhaust manifold สวมอยู่ ตั้งหลอดย่อยให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 min) เติม H_2O 85 ml แกว่งเบา ๆ เพื่อให้สารในหลอดย่อยผสมกัน ต้องทิ้งให้เย็นก่อนนำไปกลั่น (blank ให้เติม H_2O 100 ml)

ข้อควรระวัง

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

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

7.5 ไตเตรต distillate ที่ได้ด้วย 0.1000 M HCl ถึงจุดยุติเห็นเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของ HCl

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

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

โดย V_A = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (ml)

V_B = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรต blank (ml)

M = Molarity ของ HCl solution

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

โปรตีน (g/100 g) = ไนโตรเจน × 6.38

โดย 6.38 = factor ในการคำนวณปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด ในตัวอย่างนมและผลิตภัณฑ์นม

8.3 เกณฑ์ยอมรับความแตกต่างของปริมาณโปรตีนจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate); relative percentage different (%RPD) ≤ 1.3% protein

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

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อย (digestion efficiency)

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

9.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต

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

9.3 ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน (nitrogen loss)

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

การคำนวณ

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

10. รายละเอียดอื่น

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

10.2 ถ้า blank มีสีชมพูก่อนการไตเตรต แสดงว่าอาจเกิดข้อผิดพลาด เช่น titration vessel ไม่สะอาดให้เปลี่ยน blank ใหม่

10.3 สาเหตุและการแก้ไขข้อผิดพลาดต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้น

ขั้นตอนการย่อย

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

ระหว่างการกลั่นและการไตเตรต

สิ่งที่เกิดขึ้น	สาเหตุ	การแก้ไข
% recovery ของการกลั่นและการไตเตรตต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด	- มีการสูญเสียแอมโมเนีย	- ตรวจสอบอุปกรณ์เครื่องมือบริเวณที่มีการรั่วได้
	- ปริมาณ H_3BO_3 ไม่เพียงพอ	- เพิ่มความเข้มข้นหรือปริมาตรของ H_3BO_3
	- การกลั่นยังไม่สมบูรณ์	- เพิ่มเวลาในการกลั่น
	- ความเข้มข้นของกรดไม่ถูกต้อง	- ตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นของกรด
	- ค่าของ blank สูงเกินไป	- ทำ blank ซ้ำ
% recovery ของการกลั่นและการไตเตรตสูงเกินไป	- ความเข้มข้นของกรดไม่ถูกต้อง	- ตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นของกรด
	- เกิดการปนเปื้อนเนื่องจากไอของแอมโมเนีย	- หลีกเลี่ยงการกลั่นในบริเวณที่มีไอของแอมโมเนีย

DMSc F 1002: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนม Determination of fat content in milk

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมพร้อมดื่ม (น้ำนมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ) นมแปลงไขมันและนมเปรี้ยว โดยใช้หลักการ Roese-Gottlieb

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 1211: 2010 (E)/IDF1: 2010 (E). Milk - Determination of fat content -Gravimetric method (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

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

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 Mojonnier type fat-extraction flasks ชนิดมีจุกปิดที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีผลต่อ solvent ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น PTFE

4.5 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 125 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Ammonia solution ความเข้มข้นประมาณ 25% [p_{20} (NH_3) = 910 g/l]

5.2 Petroleum ether, boiling range 30-60°C

5.3 Diethyl ether ชนิดไม่มีสาร peroxide

5.4 Ethanol ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 94% โดยปริมาตร

5.5 Potassium iodide (KI) 10%

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วยบรรจุ เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด ให้ได้ปริมาตรตัวอย่างประมาณ 200-300 ml ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยเทกลับไปกลับมาในภาชนะที่สะอาด ถ้ามีไขมันหรือครีมจับเป็นก้อนหรือติดที่ภาชนะ ให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 35-38°C ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยระเหย อบถ้วยระเหยในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องชั่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 10-11 g ลงใน beaker บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) ถ่ายตัวอย่างลงใน extracting flask โดยใช้น้ำร้อนประมาณ 5-10 ml เติม ammonia solution 2 ml ผสมให้เข้ากัน เติม ethanol 10 ml ผสมให้เข้ากัน

7.3 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 1 โดยการเติม diethyl ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหย ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.4 เติม ethanol 5 ml ลงใน extracting flask สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 โดยการเติม diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหยใบเดิม ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.5 อบถ้วยระเหยที่มีไขมันในตู้อบที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C จนได้น้ำหนักคงที่ (ประมาณ 1 hr) ตั้งทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องชั่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_2)

7.6 วิเคราะห์ blank โดยใช้น้ำ 10 ml แทนตัวอย่าง น้ำหนักของสารที่เหลืออยู่ในถ้วยระเหย (W_B) ควรน้อยกว่า 0.001 g

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไขมันจากสูตร

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยระเหย (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยระเหยที่มีไขมันอยู่ (g)

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

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณไขมันในหน่วยกรัมต่อ 100 กรัม (g/100 g) หรือร้อยละของน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 เกณฑ์ยอมรับ Repeatability: absolute difference ของผลการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ไม่ควรได้ค่ามากกว่าที่กำหนดเกิน 5% ของจำนวนครั้งการวิเคราะห์

10.1.1 0.031% mass fraction of skimmed cow milk

10.1.2 0.036% mass fraction of reduced fat cow milk

10.1.3 0.043% mass fraction of whole cow milk

10.1.4 0.030% mass fraction of goat milk

10.1.5 0.069% mass fraction of sheep milk

10.2 ทดสอบ peroxide ใน diethyl ether โดยการปิเปต diethyl ether 10 ml ลงในกระบอกตวงชนิดที่มีจุกปิดซึ่งผ่านการ rinse ด้วย diethyl ether เติมสารละลาย 10% KI 1 ml เขย่ากระบอกตวง และตั้งทิ้งไว้ 1 min จะต้องไม่เกิดสีเหลืองในชั้นของ diethyl ether ทดสอบเมื่อเปิดใช้งานครั้งแรก ทดสอบครั้งต่อไปสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

10.3 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่ หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่ายจึงควรทำในที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้

10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน

DMSc F 1003: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมผงและผลิตภัณฑ์นมชนิดผง Determination of fat content in dried milk and dried milk products

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมผง และผลิตภัณฑ์นมชนิดผง เช่น หางนมผง นมแปลงไขมันชนิดผง โดยใช้หลักการ Roese-Gottlieb

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 1736: 2008 (E)/IDF 9: 2008 (E). Dried milk and dried milk products -Deter mination of fat content- Gravimetric method (Reference method).

3. หลักการ (Principle)

หลังจากทำกรดในนมให้เป็นกลาง (neutralization) และละลายโปรตีนในนม (casein) ด้วย NH_4OH เติม alcohol เพื่อป้องกันการเกิด emulsion ระหว่างการสกัด ไขมันจะถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดย diethyl ether และ petroleum ether หลังจากระเหย ether ออกแล้วอบไขมันให้แห้ง คำนวณปริมาณไขมันในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก วิธีการนี้เรียก Roese-Gottlieb principle

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 Mojonnier type fat-extraction flasks ชนิดมีจุกปิดที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีผลต่อ solvent ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น PTFE

4.5 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 125 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Ammonia solution ความเข้มข้นประมาณ 25% [p_{20} (NH_3) = 910 g/l]

5.2 Petroleum ether, boiling range 30-60°C

5.3 Diethyl ether ชนิดไม่มีสาร peroxide

5.4 Ethanol ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 94% โดยปริมาตร

5.5 Potassium iodide (KI) 10%

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของภาชนะบรรจุให้ได้ประมาณ 250 g เก็บในขวดปากกว้างคนหรือกวนจนตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยระเหย อบถ้วยระเหยในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องชั่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างนมผงประมาณ 1g นมผงพร่องมันเนย และนมผงขาดมันเนยประมาณ 1.5 g ลงใน beaker บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) ถ่ายตัวอย่างลงใน extracting flask โดยใช้น้ำร้อนประมาณ 10 ml

7.3 เติม ammonia solution 2 ml ผสมให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 ± 5°C นาน 15-20 min เขย่าเป็นครั้งคราว ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องภายใต้น้ำไหลเติม ethanol 10 ml ผสมให้เข้ากัน

7.4 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 1 โดยการเติม diethyl ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent layer ลงในถ้วยระเหย ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.5 เติม ethanol 5 ml ลงใน extracting flask สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 โดยการเติม diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหยใบเดิม ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.6 อบถ้วยระเหยที่มีไขมันในตู้อบที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C จนได้น้ำหนักคงที่ (ประมาณ 1 hr) ตั้งทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องชั่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_2)

7.7 วิเคราะห์ blank โดย H_2O 10 ml แทนตัวอย่าง น้ำหนักของสารที่เหลืออยู่ในถ้วยระเหย (W_B) ควรน้อยกว่า 0.001 g

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไขมันจากสูตร

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยระเหย (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยระเหยที่มีไขมันอยู่ (g)

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

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณไขมันในหน่วยกรัมต่อ 100 กรัม (g/100 g) หรือ ร้อยละโดยน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 เกณฑ์ยอมรับ Repeatability: absolute difference ของผลการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ไม่ควรได้ค่ามากกว่าที่กำหนดเกิน 5% ของจำนวนครั้งการวิเคราะห์

10.1.1 0.20% for dried high-fat milk and dried whole milk

10.1.2 0.15% for dried partially skimmed milk and dried buttermilk

10.1.3 0.10% for dried skimmed milk and dried whey

10.2 ทดสอบ peroxide ใน diethyl ether โดยการปิเปต diethyl ether 10 ml ลงในกระบอกตวงชนิดที่มีจุกปิดซึ่งผ่านการ rinse ด้วย diethyl ether เติมสารละลาย 10% KI 1 ml เขย่ากระบอกตวง และตั้งทิ้งไว้ 1 min จะต้องไม่เกิดสีเหลืองในชั้นของ diethyl ether ทดสอบเมื่อเปิดใช้งานครั้งแรก ทดสอบครั้งต่อไปสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

10.3 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่ หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่ายจึงควรทำในที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้

10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน

DMSc F 1004: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมข้นจืดและนมข้นหวาน Determination of fat content in evaporated milk and sweetened condensed milk

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในนมข้นไม่หวาน (Evaporated milk) นมข้นหวาน นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน (Blend of evaporated skimmed milk and vegetable fat) และนมข้นแปลงไขมันหวาน โดยใช้หลักการ Roese-Gottlieb

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 1737: 2008 (E)/IDF 13: 2008 (E). Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

หลังจากทำกรดในนมให้เป็นกลาง (neutralization) และละลายโปรตีนในนม (casein) ด้วย NH_4OH เติม alcohol เพื่อป้องกันการเกิด emulsion ระหว่างการสกัดไขมันจะถูกสกัดออกจากตัวอย่างโดย diethyl ether และ petroleum ether หลังจากระเหย ether ออกแล้วอบไขมันให้แห้ง คำนวณปริมาณไขมันในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก วิธีการนี้เรียกว่า Roese-Gottlieb principle

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 Mojonnier type fat-extraction flasks ชนิดมีจุกปิดที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีผลต่อ solvent ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น PTF

4.5 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 125 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 ammonia solution ความเข้มข้นประมาณ 25% [p20 (NH_3) = 910 g/l]

5.2 petroleum ether, boiling range 30-60°C

5.3 diethyl ether ชนิดไม่มีสาร peroxide

5.4 ethanol ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 94% โดยปริมาตร

5.5 potassium iodide (KI) 10%

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 ภาชนะบรรจุ เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด ให้ได้ตัวอย่างประมาณ 200-300 ml ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยเทกลับไปกลับมาในภาชนะที่สะอาด ถ้ามีไขมันหรือครีมจับเป็นก้อนหรือติดที่ภาชนะ ให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 35 - 40°C ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยระเหย อบถ้วยระเหยในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างนมข้นจืดประมาณ 4-5 g หรือนมข้นหวานประมาณ 2-2.5 g ลงใน beaker บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) ถ่ายตัวอย่างลงใน extracting flask โดยใช้น้ำร้อน (50°C) ประมาณ 5-10 ml

7.3 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 1 โดยการเติม diethyl ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหย ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.4 เติม ethanol 5 ml ลงใน extracting flask สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 โดยการเติม diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent layer ลงในถ้วยระเหยใบเดิม ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.5 อบถ้วยระเหยที่มีไขมันในตู้อบที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C จนได้น้ำหนักคงที่ (ประมาณ 1 hr) ตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1hr) ชั่งน้ำหนัก (W_2)

7.6 วิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O 10 ml แทนตัวอย่าง น้ำหนักของสารที่เหลืออยู่ในถ้วยระเหย (W_B) ควรน้อยกว่า 0.001 g

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไขมันจากสูตร

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยระเหย (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยระเหยที่มีไขมันอยู่ (g)

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

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณไขมันในหน่วยกรัมต่อ 100 กรัม (g/100g) หรือร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 เกณฑ์ยอมรับ Repeatability: absolute difference ของผลการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ไม่ควรได้ค่ามากกว่าที่กำหนดเกิน 5% ของจำนวนครั้งการวิเคราะห์

10.1.1 0.02% for products with a fat content < 1%

10.1.2 0.03% for products with a fat content from 1% to 4%

10.1.3 0.04% for products with a fat content from 4% to 10%

10.1.4 0.50% of the proportion of fat in the test sample for products with a fat content > 10%

10.2 ทดสอบ peroxide ใน diethyl ether โดยการปิเปต diethyl ether 10 ml ลงในกระบอกตวงชนิดที่มีจุกปิดซึ่งผ่านการ rinse ด้วย diethyl ether เติมสารละลาย 10% KI 1 ml เขย่ากระบอกตวง และตั้งทิ้งไว้ 1 min จะต้องไม่เกิดสีเหลืองในชั้นของ diethyl ether ทดสอบเมื่อเปิดใช้งานครั้งแรก ทดสอบครั้งต่อไปสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

10.3 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่ หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่ายจึงควรทำในที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้

10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน

DMSc F 1005: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนยแข็ง
Determination of fat content in cheese

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนยแข็งและผลิตภัณฑ์ โดยใช้หลักการของ Schmid-Bondzynski-Ratslaff principle

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 1735-2004 (E)/IDF 5: 2004 (E). Cheese and processed cheese products - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

ย่อยเนยแข็งด้วยกรด เติม ethanol เพื่อป้องกันการเกิด emulsion ระหว่างการสกัด สกัดไขมันออกจากตัวอย่างด้วย diethyl ether และ petroleum ether หลังจากระเหย ether ออกแล้วอบไขมันให้แห้ง คำนวณปริมาณไขมันในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก วิธีการนี้เรียกว่า Schmid-Bondzynski-Ratslaff principle

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 Mojonnier type fat-extraction flasks ชนิดมีจุกปิดที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีผลต่อ solvent ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น PTFE

4.6 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 125 ml

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น Analytical grade และ H_2O เป็นน้ำบริสุทธิ์หรือน้ำกำจัดไอออน

5.1 Petroleum ether, boiling range 30-60°C

5.2 Diethyl ether ชนิดไม่มีสาร peroxide

5.3 Ethanol ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 94% โดยปริมาตร

5.4 Potassium iodide (KI) 10%

5.5 HCl ความเข้มข้น 1.18 g/L

5.6 diluted HCl ประมาณ 1.125 g/L เตรียมโดยตวง HCl 675 ml เทลงใน volumetric flask ขนาด 1 L ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 200 ml ปรับให้ครบปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน (ควรแช่ volumetric flask ในอ่างน้ำเย็น เพื่อป้องกันความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการเตรียม)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การสุ่มตัวอย่าง เนยแข็งในภาชนะบรรจุขนาดเล็ก เก็บตัวอย่างประมาณ 50-100 g ทั้งห่อในสภาพเดิม หรือเก็บในขวดปากกว้าง ตัวอย่างในภาชนะบรรจุขนาดใหญ่ ถ้าตัวอย่างเป็นรูปวงกลมให้แบ่งตัดออกตามรัศมีของวงกลม เก็บ 2 ชิ้นที่อยู่ตรงข้ามกัน ถ้าเป็นรูปสี่เหลี่ยมให้ตัดขนานตามรูปทรง สุ่มตัวอย่างที่จุดต่าง ๆ ทำจนได้น้ำหนักประมาณ 50-100 g เก็บในขวดปากกว้าง เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C

6.2 การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างส่วนที่รับประทานได้ (ตัวอย่างที่มีราหรือเปลือกแข็งให้เอาราหรือเปลือกแข็งออก) หั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ปั่นด้วยเครื่องปั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำมาวิเคราะห์ทันที ในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันทีให้เก็บในขวด ปิดฝาให้แน่นเก็บในตู้เย็น ก่อนทำการวิเคราะห์ให้นำตัวอย่างออกจากตู้เย็น ทิ้งไว้จนถึงอุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากันดีแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ต้องไม่มีรา หรือสิ่งอื่นใดที่แสดงว่าตัวอย่างเสียก่อนการวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยระเหย อบถ้วยระเหยในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องชั่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-3 g ลงใน extracting flask หรือภาชนะอื่นที่เหมาะสม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) เติม dil HCl 8-10 ml แช่ในอ่างน้ำเดือด จนตัวอย่างหลอมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วแช่ต่ออีก 20-30 min (ระวังอย่าให้ตัวอย่างแห้งหรือไหม้) ทิ้งให้เย็นโดยผ่านน้ำไหล เติม ethanol 10 ml ผสมให้เข้ากัน

7.3 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 1 โดยการเติม diethyl ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent layer ลงในถ้วยระเหย ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.4 เติม ethanol 5 ml ลงใน extracting flask สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 2 และ 3 โดยการเติม diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min เติม petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหยใบเดิม ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60°C

7.5 อบถ้วยระเหยที่มีไขมันในตู้อบที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C จนได้น้ำหนักคงที่ (ประมาณ 1 hr) ตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_2)

7.6 วิเคราะห์ blank โดยใช้ H_2O 10 ml แทนตัวอย่าง น้ำหนักของสารที่เหลืออยู่ในถ้วยระเหย (W_B) ควรน้อยกว่า 0.001 g

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณไขมันจากสูตร

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยระเหย (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยระเหยที่มีไขมันอยู่ (g)

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

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณไขมันในหน่วยกรัมต่อ 100 กรัม (g/100 g) หรือร้อยละโดยน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 เกณฑ์ยอมรับ Repeatability: absolute difference ของผลการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ต่างกันไม่เกิน 0.3%

10.2 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่ หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.3 ทดสอบ peroxide ใน diethyl ether โดยการปิเปต diethyl ether 10 ml ลงในกระบอกตวงชนิดที่มีจุกปิดซึ่งผ่านการ rinse ด้วย diethyl ether เติมสารละลาย 10% KI 1 ml เขย่ากระบอกตวง และตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จะต้องไม่เกิดสีเหลืองในชั้นของ diethyl ether ทดสอบเมื่อเปิดใช้งานครั้งแรก ทดสอบครั้งต่อไปสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่ายจึงควรทำในที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้

10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน

DMSc F 1006: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในนมและผลิตภัณฑ์นม Determination of total solids content in milk and milk product

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนมพร้อมดื่ม (น้ำนมโคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อ) นมข้นไม่หวาน (Evaporated milk) นมแปลงไขมัน นมข้นแปลงไขมันไม่หวาน (Blend of evaporated skimmed milk and vegetable fat) และครีม

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 6731:2010 (E)/IDF 21:2010 (E); Milk, cream and evaporated milk -Determination of total solids content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

ระเหยน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอ่างน้ำร้อน และทำตัวอย่างให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C สารที่เหลืออยู่คือของแข็งทั้งหมด

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (drying oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 โถดูดความชื้นพร้อมสารดูดความชื้น (desiccator with desiccant)

4.5 ถ้วยอะลูมิเนียมชนิดมีฝาปิด (flat bottom aluminum dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥5 cm

5. สารเคมี (Reagent)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วยบรรจุ เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด ให้ได้ตัวอย่าง ประมาณ 200-300 ml ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการกวน คน เขย่าเบาๆ หรือเทกลับไปกลับมาในภาชนะที่สะอาด ถ้ามีไขมันหรือครีมจับเป็นก้อนหรือติดที่ภาชนะ ให้อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 35-38°C ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 เตรียมถ้วยอะลูมิเนียม: เขียนรหัสบนถ้วยอะลูมิเนียมที่แห้งและสะอาด นำไปอบพร้อมฝา โดยเปิดฝาขณะอบ ในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1.5 hr ปิดฝาถ้วยอะลูมิเนียมและเอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องชั่ง (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-5 g ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) แล้วนำไปประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำร้อน อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมตัวอย่างโดยเปิดฝาขณะอบ ในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 2 hr ปิดฝาถ้วยอบ เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก อบซึ่งอีกครั้งละ 1 hr จนได้น้ำหนักคงที่ (W_2)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมหลังอบ (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังอบ (g)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานผลการทดสอบ (Test report)

รายงานปริมาณของแข็งทั้งหมดในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก ด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.2 ห้ามจับถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแล้วด้วยมือเปล่า ให้ใช้ tong หรือสวมถุงมือที่สะอาด

10.3 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณของแข็งทั้งหมดในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไม่เกิน 0.1 g (นมพร้อมดื่ม), 0.2 g (ครีม) และ 0.3 g (นมข้นไม่หวาน)

DMSc F 1007: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในนมข้นหวาน Determination of total solids content in sweetened condensed milk

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในนมข้นหวาน และนมข้นแปลงไขมันหวาน

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 6734:2010 (E)/IDF 15:2010 (E); Sweetened condensed milk - Determination of total solids content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

ระเหยน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอ่างน้ำร้อน และทำตัวอย่างให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C สารที่เหลืออยู่คือของแข็งทั้งหมด

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (drying oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 โถดูดความชื้นพร้อมสารดูดความชื้น (desiccator with desiccant)

4.5 ถ้วยโลหะชนิดมีฝาปิด (flat bottom metal dish) ขนาดสูง 20-25 mm เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-75 mm

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น Analytical grade และ H_2O เป็นน้ำบริสุทธิ์หรือน้ำกำจัดไอออน

5.1 Quartz sand หรือ acid washed sea sand ขนาด 180 – 500 μm และจะต้องผ่านการทดสอบคุณสมบัติดังนี้

- ♦ ชั่งทรายประมาณ 20 g ในถ้วย อบในตู้อบที่ 102 ± 2°C อย่างน้อย 2 hr ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (a)

- ♦ เติมน้ำประมาณ 5 ml คลุกกับทรายให้เข้ากันและเกลี่ยให้ทั่วถ้วย อบในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2°C อย่างน้อย 4 hr ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องชั่งในโถดูดความชื้นชั่งและบันทึกน้ำหนัก (b)
- ♦ น้ำหนักที่ได้ (a) และ (b) ต้องต่างกันไม่เกิน 0.0005 g
- ♦ ในกรณีที่น้ำหนักที่ได้ (a) และ (b) ต่างกันเกิน 0.0005 g ให้นำทรายแช่ใน dil HCl ความเข้มข้นประมาณ 25% เป็นเวลา 3 วัน โดยคนเป็นครั้งคราว เทกรดทิ้ง และล้างด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งน้ำที่ล้างปราศจากคลอไรด์ (โดยการทดสอบ H_2O ที่ล้างต้องไม่เกิดตะกอนขุ่นขาวกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตหรือทดสอบด้วยวิธีอื่นตามความเหมาะสม) แล้วอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนที่ 160°C อย่างน้อย 4 hr แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติอีกครั้ง

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วยบรรจุ เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด ให้ได้ตัวอย่าง ประมาณ 200-300 ml คนหรือกวนจนตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 เตรียมถ้วยโลหะ เขียนรหัสบนถ้วยซึ่งมีทรายอยู่ประมาณ 8-10 g พร้อมแท่งแก้ว นำไปอบในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1.5 hr เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องชั่ง (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 g ใส่ในถ้วยโลหะที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) เติมน้ำกลั่นประมาณ 5 ml คลุกตัวอย่างและทรายให้เข้ากัน และเกลี่ยให้ทั่วถ้วย แล้วนำไปประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำร้อน ประมาณ 30 min (ขณะระเหยแห้งให้คนตัวอย่างบ่อย ๆ) อบถ้วยพร้อมตัวอย่างโดยเปิดฝาขณะอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 2 hr ปิดฝาถ้วยอบ เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 45 min) ชั่งน้ำหนัก อบซ้ำอีกครั้งละ 1 hr จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (W_2)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมหลังอบ (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังอบ (g)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานผลการทดสอบ (Test report)

รายงานปริมาณของแข็งทั้งหมดในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก ด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 น้ำหนักคงที่ หมายถึง น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.2 ห้ามจับถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแล้วด้วยมือเปล่า ให้ใช้ tong หรือสวมถุงมือที่สะอาด

10.3 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณของแข็งทั้งหมดในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไม่เกิน 0.4 g

DMSc F 1008: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในเนยแข็ง Determination of total solids content in cheese

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในเนยแข็ง

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 5534:2004 (E)/IDF 4: 2004 (E); Cheese and processed cheese - Determination of total solids content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

ระเหยน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอ่างน้ำร้อน และทำตัวอย่างให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C สารที่เหลืออยู่คือของแข็งทั้งหมด

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 ตู้อบร้อน (drying oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ 102 ± 2°C

4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 โถดูดความชื้นพร้อมสารดูดความชื้น (desiccator with desiccant)

4.5 ถ้วยโลหะชนิดมีฝาปิด (flat bottom metal dish) ขนาดสูง 20-25 mm เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-75 mm

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น Analytical grade และ H_2O เป็นน้ำบริสุทธิ์หรือน้ำกำจัดไอออน

5.1 Quartz sand หรือ acid washed sea sand ขนาด 180-500 µm และจะต้องผ่านการทดสอบคุณสมบัติดังนี้

- ชั่งทรายประมาณ 20 g ในถ้วย อบในตู้อบที่ 102 ± 2°C อย่างน้อย 2 hr ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (a)

- เติมน้ำประมาณ 5 ml คลุกกับทรายให้เข้ากันและเกลี่ยให้ทั่วถ้วย อบในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2°C อย่างน้อย 4 hr ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (b)
- น้ำหนักที่ได้ (a) และ (b) ต้องต่างกันไม่เกิน 0.0005 g
- ในกรณีที่น้ำหนักที่ได้ (a) และ (b) ต่างกันเกิน 0.0005 g ให้นำทรายแช่ใน dil HCl ความเข้มข้นประมาณ 25% เป็นเวลา 3 วัน โดยคนเป็นครั้งคราว เทกรดทิ้ง และล้างด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งน้ำที่ล้างปราศจากคลอไรด์ (โดยการทดสอบ H_2O ที่ล้างต้องไม่เกิดตะกอนขุ่นขาวกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตหรือทดสอบด้วยวิธีอื่นตามความเหมาะสม) แล้วอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนที่ 160°C อย่างน้อย 4 hr แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติอีกครั้ง

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 สุ่มตัวอย่างเนยแข็งในภาชนะบรรจุขนาดเล็ก เก็บตัวอย่างประมาณ 50–100 g ทั้งห่อในสภาพเดิม หรือเก็บในขวดปากกว้าง ตัวอย่างในภาชนะบรรจุขนาดใหญ่ ถ้าตัวอย่างเป็นรูปวงกลมให้แบ่งตัดออกตามรัศมีของวงกลม สุ่ม 2 ชิ้นที่อยู่ตรงข้ามกัน ถ้าเป็นรูปสี่เหลี่ยมให้ตัดขนานตามรูปทรง เก็บตัวอย่างที่จุดต่าง ๆ ทำจนได้น้ำหนักประมาณ 50–100 g เก็บในขวดปากกว้าง เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0–20°C

6.2 นำตัวอย่างส่วนที่รับประทานได้ (ตัวอย่างที่มีราหรือเปลือกแข็งให้เอาราหรือเปลือกแข็งออก) หั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ปั่นด้วยเครื่องปั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำมาวิเคราะห์ทันที ในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันทีให้เก็บในขวด ปิดฝาให้แน่น เก็บในตู้เย็นก่อนทำการวิเคราะห์ ให้นำตัวอย่างออกจากตู้เย็น ทิ้งไว้จนถึงอุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากันดีแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ต้องไม่มีรา หรือสิ่งอื่นใดที่แสดงว่าตัวอย่างเสียก่อนการวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 เตรียมถ้วยโลหะ เขียนรหัสบนถ้วยซึ่งมีทรายอยู่ประมาณ 8–10 g พร้อมแท่งแก้ว นำไปอบในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2°C เป็นเวลา 1.5 hr เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 g ใส่ในถ้วยโลหะที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) คลุกตัวอย่างและทรายให้เข้ากัน และเกลี่ยให้ทั่วถ้วย (ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นเนื้อแข็ง อาจเติมน้ำ 3 ml เพื่อสะดวกในการคลุกตัวอย่างและทราย) แล้วนำไปประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำร้อน ประมาณ 30 min

(ขณะระเหยแห้งให้คนตัวอย่างบ่อย ๆ) อบถ้วยพร้อมตัวอย่างโดยเปิดฝาขณะอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 3 hr ปิดฝาถ้วยอบ เอาออกจากตู้อบร้อนเก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 45 min) ชั่งน้ำหนัก อบซ้ำอีกครั้งละ 1 hr จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (W_2)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมหลังอบ (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังอบ (g)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานผลการทดสอบ (Test report)

รายงานปริมาณของแข็งทั้งหมดในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก ด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 น้ำหนักคงที่ หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.2 ห้ามจับถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแล้วด้วยมือเปล่า ให้ใช้ tong หรือสวมถุงมือที่สะอาด

10.3 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณของแข็งทั้งหมดในตัวอย่าง 100 g ต่างกันไม่เกิน 0.35 g

DMSc F 1009: การวิเคราะห์เนื้อนมไม่รวมไขมันในนมพร้อมดื่ม และนมแปลงไขมัน Determination of milk solids not fat in milk and in blend of skimmed milk and vegetable fat

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเนื้อนมไม่รวมไขมันในนมพร้อมดื่ม และนมแปลงไขมัน โดยการคำนวณ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 ISO 1211: 2010 (E)/IDF 1: 2010 (E). Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)

2.2 ISO 6731: 2010 (E)/IDF 21:2010 (E); Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

ปริมาณเนื้อนมไม่รวมไขมันคือผลต่างของปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธี DMSc F 1006 และปริมาณไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธี DMSc F 1002 รายงานในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก ด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

DMSc F 1010: การวิเคราะห์เนื้อนมไม่รวมไขมันในนมข้นไม่หวาน และนมข้นแปลงไขมันไม่หวาน Determination of milk solids not fat total solids in evaporated milk and in blend of evaporated skimmed milk and vegetable fat

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเนื้อนมไม่รวมไขมันในนมข้นไม่หวาน และนมข้นแปลงไขมันไม่หวาน โดยการคำนวณ

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 ISO 1737: 2008 (E)/IDF 13: 2008 (E). Evaporated milk and sweetened condensed milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)

2.2 ISO 6731: 2010 (E)/IDF 21:2010 (E); Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

ปริมาณเนื้อนมไม่รวมไขมันคือผลต่างของปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธี DMSc F1006 และปริมาณไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธี DMSc F 1004 รายงานในหน่วยร้อยละของน้ำหนัก ด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

DMSc F 1011: การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชา Determination of moisture in tea

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาที่มีกาก ได้แก่ ชาใบ ชาผง

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 925.19 Moisture in Tea

3. หลักการ (Principle)

เมื่อนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสมจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของน้ำหรือความชื้นในตัวอย่าง

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven)

4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven)

4.4 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.5 ถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm

5. สารเคมี (Reagents)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างจากภาชนะบรรจุตัวอย่างประมาณ 100 g แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันนำมาร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 30 เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 อบถ้วยและฝาในตู้อบร้อน อุณหภูมิ 100 – 105°C เป็นเวลา 1 hr ที่ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min แล้วชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 g ในถ้วยพร้อมฝาที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_2) เกลี่ยตัวอย่างให้เรียบเสมอกัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 95–100°C ความดัน ≤ 100 mmHg (133.3 hPa) เป็นเวลา 5 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) อบซ้ำอีก 1 hr จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.005 g)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

โดย	W_1	=	น้ำหนักถ้วยเปล่า (g)
	W_2	=	น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (g)
	W_3	=	น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างที่อบแล้ว (g)

8.2 รายงานผลการทดสอบ (Test report)

รายงานผลปริมาณความชื้น หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1012: การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในกาแฟ Determination of moisture in coffee

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูป

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 979.12 Moisture (Loss on Drying) in Roasted Coffee

3. หลักการ (Principle)

เมื่อนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสมจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของน้ำหรือความชื้นในตัวอย่าง

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven)

4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven)

4.4 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.5 ถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm

5. สารเคมี (Reagents)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างจากภาชนะบรรจุตัวอย่างประมาณ 100 g แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันนำมาร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 30 เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 อบถ้วยและฝาในตู้อบร้อน อุณหภูมิ 100 - 105°C เป็นเวลา 1 hr ที่ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min แล้วชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่าง ประมาณ 3 g ในถ้วยพร้อมฝาที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_2) เกลี่ยตัวอย่างให้ เรียบเสมอกัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 ± 1°C ความดัน 37.5 mmHg (50 hPa) เป็นเวลา 16 ± 0.5 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) อบซ้ำอีก 1 hr จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.005 g)

8. การคำนวณ และการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

โดย W_1 = น้ำหนักถ้วยเปล่า (g)

W_2 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (g)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างที่อบแล้ว (g)

8.2 รายงานผลการทดสอบ (Test report)

รายงานผลปริมาณความชื้น หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1013: การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในโกโก้ผง
Determination of moisture in cocoa powder

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในโกโก้ผง

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 931.04 Moisture in Cocoa Products

3. หลักการ (Principle)

เมื่อนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของน้ำหรือความชื้นในตัวอย่าง

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven)

4.3 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.5 ถ้วย Platinum พร้อมฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm สามารถใช้ถ้วยอะลูมิเนียมได้ถ้าไม่นำไปวิเคราะห์เถ้า

5. สารเคมี (Reagents)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างจากภาชนะบรรจุตัวอย่างประมาณ 100 g แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 อบถ้วยและฝาในตู้อบร้อน อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 hr ที่ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min แล้วชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 g ในถ้วยพร้อมฝาที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_2) เกลี่ยตัวอย่างให้เรียบเสมอกัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) (น้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.005 g)

8. การคำนวณ และการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

โดย	W_1	=	น้ำหนักถ้วยเปล่า (g)
	W_2	=	น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (g)
	W_3	=	น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างที่อบแล้ว (g)

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณความชื้น หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1014: การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาสมุนไพร
Determination of moisture in plants

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในชาสมุนไพร

2. เอกสารอ้างอิง (References)

AOAC Official Method 930.04 Moisture in Plants

3. หลักการ (Principle)

เมื่อนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสมจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปเป็นน้ำหนักของน้ำหรือความชื้นในตัวอย่าง

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001g

4.2 ตู้อบสุญญากาศ (vacuum oven)

4.3 ตู้อบร้อน (hot air oven)

4.4 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.5 ถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 mm

5. สารเคมี (Reagents)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างจากภาชนะบรรจุตัวอย่างประมาณ 100 g แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันนำมาร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 30 เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 อบถ้วยและฝาในตู้อบร้อน อุณหภูมิ 100 - 105°C เป็นเวลา 1 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min แล้วชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 g ในถ้วยพร้อมฝาที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_2) เกลี่ยตัวอย่างให้เรียบเสมอกัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 95–100°C ความดัน ≤ 100 mmHg (133.3 hPa) เป็นเวลา 5 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 30 min ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) อบซ้ำอีก 1 hr จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.005 g)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

โดย W_1 = น้ำหนักถ้วยเปล่า (g)

W_2 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (g)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างที่อบแล้ว (g)

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณความชื้น หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1015: การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในชา Determination of total ash and water soluble ash in tea

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในชาใบและชาผงที่มีกาก

2. เอกสารอ้างอิง (References)

2.1 AOAC Official Method 920.100A: Ash in Tea

2.2 AOAC Official Method 920.100B: Water Soluble Ash in Tea

3. หลักการ (Principle)

เมื่อนำตัวอย่างชาไปเผาส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนจะถูกทำลาย เหลือส่วนที่เป็น inorganic หรือเถ้า หาปริมาณเถ้าทั้งหมดและเถ้าที่ละลายน้ำได้โดยวิธีชั่งน้ำหนัก

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียดถึง 0.0001 g

4.2 เตาเผา (muffle furnace) สำหรับใช้งานที่อุณหภูมิ $525 \pm 25^{o}C$

4.3 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.4 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.5 เครื่องบดตัวอย่าง (blender)

4.6 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.7 ถ้วยกระเบื้องทนความร้อน (porcelain crucible) 50-100 ml

4.8 กระดาษกรองชนิด ashless Whatman No.42 หรือเทียบเท่า

4.9 ตะแกรงร่อน (sieve) เบอร์ 30 (No.30)

5. สารเคมี (Reagents)

–

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างประมาณ 100 g บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน นำมาร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 30 เก็บในขวดปิดสนิท (tightly stoppered bottle)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 วิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด

7.1.1 เผาถ้วยที่อุณหภูมิ 525 ± 25°C นาน 1.5 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 30 min ชั่งน้ำหนัก (W)

7.1.2 ชั่งตัวอย่าง 5-10 g ลงในถ้วยที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

7.1.3 นำตัวอย่างไปเผาบน hot plate จนหมดควันนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 525 ± 25°C ประมาณ 2.5 hr หรือจนเป็นเถ้าขาว ทิ้งให้เย็น 30 min ในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนัก (W_2) คำนวณหาปริมาณเถ้าทั้งหมด

7.1.4 เติมน้ำกลั่นลงในเถ้าที่เผาแล้วให้ชื้น นำไปตั้งบน water bath จนแห้ง แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 7.1.3 จนน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.005 g

7.2 วิเคราะห์ปริมาณเถ้าที่ละลายน้ำได้

7.2.1 เติมน้ำกลั่น 10 ml ลงในเถ้าที่ได้จากข้อ 7.1.4 นำไปต้มจนใกล้เดือด ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย เทส่วนใสผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ทำซ้ำโดยล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนเทส่วนใสผ่านกระดาษกรอง ทำซ้ำเช่นนี้จนได้ปริมาณน้ำที่ใช้ละลายเถ้าประมาณ 60 ml

7.2.2 ล้างตะกอนที่ติดแท่งแก้วผ่านกระดาษกรอง พับกระดาษกรองให้เล็กใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม นำไปตั้งบนอ่างน้ำร้อนให้แห้ง แล้วนำไปเผาบน hot plate จนหมดควันเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 525 ± 25°C ประมาณ 2.5 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 30 min ชั่งน้ำหนัก (W_3)

8. การคำนวณ และการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{เถ้าทั้งหมด (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)} = \frac{(W_2 - W) \times 10^4}{[W_1 \times (100 - \%\ \text{ความชื้น})]}$$

$$\text{เถ้าที่ละลายน้ำได้ (ร้อยละของน้ำหนักเถ้า)} = \frac{(W_2 - W_3)}{(W_2 - W)} \times 100$$

โดย W = น้ำหนักถ้วยเปล่า (g)

W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

W_2 = น้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้า (g)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้าที่ไม่ละลายน้ำ (g)

และ % ความชื้น ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DMSc F 1011

8.2 รายงานผลปริมาณเถ้าทั้งหมด หน่วยร้อยละของน้ำหนักแห้ง ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

8.3 รายงานผลปริมาณเถ้าที่ละลายน้ำได้ หน่วยร้อยละของน้ำหนักเถ้า ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1016: การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในกาแฟคั่ว Determination of ash and water soluble ash in roasted coffee

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าและเถ้าที่ละลายน้ำได้ในกาแฟคั่ว

2. เอกสารอ้างอิง (References)

2.1 AOAC Official Method 920.93 A: Ash of Roasted Coffee

2.2 AOAC Official Method 920.93 B: Soluble and Insoluble Ash in Roasted Coffee

3. หลักการ (Principle)

เมื่อนำตัวอย่างกาแฟไปเผาส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนจะถูกทำลาย เหลือส่วนที่เป็น inorganic หรือเถ้าที่ละลายน้ำได้และที่ไม่ละลายน้ำ หาปริมาณเถ้าหรือเถ้าที่ละลายน้ำได้โดยวิธีชั่งน้ำหนัก

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 เตาเผา (muffle furnace) สำหรับใช้งานที่อุณหภูมิ 525 ± 25°C

4.3 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.4 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.5 ถ้วยกระเบื้องทนความร้อน (porcelain crucible)

5. สารเคมี

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างจากภาชนะบรรจุตัวอย่างประมาณ 100 g แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันนำมาร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 30 เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 วิเคราะห์ปริมาณเถ้า

7.1.1 เผาถ้วยที่อุณหภูมิ 525 ± 25°C นาน 1.5 hr ทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น 30 min ชั่งน้ำหนัก (W)

7.1.2 ชั่งตัวอย่าง 5-10 g ลงในถ้วยที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

7.1.3 นำตัวอย่างไปเผาบน hot plate จนหมดควันนำไปเผาต่อในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 525 ± 25°C ประมาณ 2.5 hr หรือจนเป็นเถ้าขาว ทิ้งให้เย็น 30 min ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W_2) คำนวณหาปริมาณเถ้าทั้งหมด

7.1.4 เติมน้ำกลั่นลงในเถ้าที่เผาแล้วให้ชื้น นำไปตั้งบน water bath จนแห้ง แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 7.1.3 จนน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งต่างกันไม่เกิน 0.005 g

7.2 วิเคราะห์ปริมาณเถ้าที่ละลายน้ำได้

7.2.1 เติมน้ำกลั่น 10 ml ลงในเถ้าที่ได้จากข้อ 7.1.4 นำไปต้มจนใกล้เดือด ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย เทส่วนใสผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ทำซ้ำโดยล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน เทส่วนใสผ่านกระดาษกรอง ทำซ้ำเช่นนี้จนได้ปริมาณน้ำที่ใช้ละลายเถ้าประมาณ 60 ml

8. การคำนวณ และการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{เถ้าทั้งหมด (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{(W_2 - W)}{W_1} \times 100$$

$$\text{เถ้าที่ละลายน้ำได้ (ร้อยละของน้ำหนักเถ้า)} = \frac{(W_2 - W_3) \times 100}{(W_2 - W)}$$

โดย

W = น้ำหนักถ้วยเปล่า (g)

W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

W_2 = น้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้า (g)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมเถ้าที่ไม่ละลายน้ำ (g)

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณเถ้าที่ละลายน้ำได้ หน่วยเป็นร้อยละของน้ำหนักเถ้า ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1017: การวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชา Determination of hot water extract in tea

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อนในชาใบและชาผงที่มีกาก

2. เอกสารอ้างอิง (References)

2.1 AOAC Official Method 920.99 Preparation of Sample

2.2 AOAC Official Method 920.104 Water Extract of Tea

3. หลักการ (Principle)

สารสกัดได้ด้วยน้ำร้อน เป็นผลรวมของสารทั้งหมดที่มีอยู่ในชา (กาเฟอีน โพลีฟีนอล อัลคาลอยด์ และอื่น ๆ) ที่สามารถถูกสกัดออกมาได้ด้วยน้ำร้อน หาปริมาณได้โดยนำสารที่สกัดได้ไปประเหยให้แห้งและอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 100°C

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (hot air oven) สำหรับใช้งานที่อุณหภูมิ 100°C

4.3 อ่างน้ำร้อน (water bath)

4.4 โถดูดความชื้น (desiccator)

4.5 ถ้วยระเหย (evaporate dish)

4.6 เครื่องแก้ว; volumetric flask ขนาด 500 ml, Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml, แท่งแก้วยาว 75 cm

5. สารเคมี

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างประมาณ 100 g แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน นำมาร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 30 เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 อบถ้วยระเหยที่ล้างสะอาดแล้วในตู้อบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นาน 30 min แล้วชั่งน้ำหนัก (W1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) (W) ถ่ายใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml เติมน้ำร้อนประมาณ 200 ml นำไปตั้งบนอ่างน้ำร้อนต้มให้เดือด แกว่งเบา ๆ เป็นระยะ ปิดปากขวดด้วยจุกยางที่มีแท่งแก้วยาว 75 cm เพื่อให้เกิดการกลั่นตัวของไอน้ำต้มช้า ๆ ให้ไอน้ำกลั่นตัวทั้งหมด เป็นเวลา 1 hr ทิ้งให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O เขย่าให้เข้ากัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

7.3 ปิเปตสารที่กรองได้ 50 ml ใส่ในถ้วยระเหยที่อบแล้วและทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปประเหยบนอ่างน้ำร้อนเดือดจนแห้ง

7.4 อบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 hr ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 min แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{สารสกัดได้ด้วยน้ำร้อน (ร้อยละโดยน้ำหนักชาแห้ง)} = \frac{(W_2 - W_1) \times 10^4 \times 500}{W \times [100 - (\%\ \text{ความชื้น})] \times 50}$$

โดย	W	=	น้ำหนักตัวอย่าง (g)
	W_1	=	น้ำหนักถ้วย (g)
	W_2	=	น้ำหนักถ้วยพร้อมสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อน (g)

และ % ความชื้น ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DMSc F 1011

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณสารที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อน หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1018: การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักผลไม้ Determination of ethanol in beverage from fruit and vegetable product

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ ethanol ในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากพืชผักผลไม้ที่มีปริมาณ ethanol น้อยกว่า 5% (ร้อยละของน้ำหนักหรือร้อยละของปริมาตร)

2. เอกสารอ้างอิง (References)

ISO 2448-1998 (E). Fruit and vegetable products - Determination of ethanol content.

3. หลักการ (Principle)

แยก ethanol ออกจากเครื่องดื่มโดยวิธีการกลั่น (Distillation) แล้ว oxidise ethanol ด้วย potassium dichromate, ($K_2Cr_2O_7$) ในสภาพที่เป็นกรด titrate dichromate ที่มากเกินด้วยสารละลาย ammonium ferrous sulfate โดยใช้ ferrous orthophenanthroline เป็น indicator

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 g

4.2 Heating mantle

4.3 เครื่องแก้วและอุปกรณ์ (Glasswares and supplies)

4.3.1 ชุดกลั่น ประกอบด้วย ขวดกลั่นขนาด 500 ml, condenser, adapter พร้อมด้วยหลอดแก้วยาว

4.3.2 volumetric flask ขนาด 100 ml และ 1 L

4.3.3 Iodine flask ขนาด 250 ml

4.3.4 Pipettes ขนาด 5, 10 และ 2 ml

4.3.5 Burettes ขนาด 50 ml

5. สารเคมี (Reagents)

5.1 Sulfuric acid (H_2SO_4) (1:1)

5.2 Calcium hydroxide ($Ca\ (OH)_2$) solution: ชั่ง CaO 110-112 g ละลายด้วย H_2O แล้วเติม H_2O ให้ครบ 1 L

5.3 Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) solution: ชั่ง $K_2Cr_2O_7$ 42.572 g ละลายด้วย H_2O จนละลายหมดแล้วเติม H_2O ให้ครบ 1 L (1 ml ของ $K_2Cr_2O_7$ solution = 0.01 g ethanol)

5.4 Potassium permanganate ($KMnO_4$) solution: ชั่ง $KMnO_4$ 1.372 g ละลายด้วย H_2O จนละลายหมด แล้วเติม H_2O ให้ครบ 1 L (10 ml ของ $KMnO_4$ solution = 1 ml ammonium ferrous sulfate)

5.5 Ammonium ferrous sulfate solution, $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$: ชั่ง $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$ 170.2 g ละลายด้วย H_2O เติม H_2SO_4 (1:1) จำนวน 20 ml ลงไป และเติม H_2O จนครบ 1 L ทำสารละลายนี้ให้ stable โดยเติมแผ่นอะลูมิเนียมชิ้นเล็ก (Aluminium chips) ลงไป (2 ml Ammonium ferrous sulfate solution = 1 ml $K_2Cr_2O_7$ solution)

5.6 Ferrous orthophenanthroline solution: ละลาย ferric sulfate heptahydrate ($FeSO_4\ .7H_2O$) 0.695 g ใน H_2O 100 ml เติม orthophenanthroline monohydrate 1.485 g ลงไปอุ่นให้ร้อนบน water bath เพื่อช่วยการละลาย

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้มีปริมาณ ethanol ที่กลั่นได้ใน volumetric flask ขนาด 100 ml น้อยกว่า 1 g หรือชั่งน้ำหนักตามตารางดังนี้

Degree alcohol (%)	**น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (g)**
< 0.5	250
0.8	200
0.8-1.5	100
1.5-3.0	50
3.0-6.0	25

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures)

7.1 การกลั่น (Distillation)

7.1.1 ชั่งตัวอย่าง 2 ซ้ำ ให้มีน้ำหนักต่างกันไม่เกิน 0.01 g เจือจางด้วย H_2O 50 ml ถ่ายลงในขวดกลั่นเติม H_2O ลงไปอีก 120 ml ทำตัวอย่างให้เป็นด่าง ด้วยสารละลาย Ca $(OH)_2$ ที่เขย่าก่อนใช้จนได้ pH เท่ากับ 8 ± 0.2 ใส่ลูกแก้ว หรือ pumice stone เพื่อควบคุมการเดือด

7.1.2 ใส่ H_2O 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ซึ่งวางอยู่ในถ้วยน้ำแข็ง ให้ปลายของ adapter ของชุดกลั่นจุ่มลงใน H_2O ใน volumetric flask กลั่นให้ได้ distillate ประมาณ 80-85 ml แล้วหยุดกลั่น ล้าง condenser ด้วย H_2O เล็กน้อย และเติม H_2O ให้ครบปริมาตร 100 ml

7.2 Oxidation

7.2.1 ปิเปตสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ 20 ml ลงใน Iodine flask ขนาด 250 ml เติม H_2SO_4 (1:1) 20 ml เขย่าให้เข้ากัน

7.2.2 ปิเปต distillate (V_0) 10 ml ลงใน Iodine flask ปิดจุก หยด H_2SO_4 (1:1) เล็กน้อยที่จุก เขย่า ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 min เขย่าเป็นครั้งคราว

7.3 Titration

7.3.1 titrate ปริมาณ dichromate ที่มากเกินพอด้วยสารละลายของ ammonium ferrous sulfate จาก burette เมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสี greenish blue เติม Ferrous orthophenanthroline solution 4 หยด titrate ต่อจนได้ end point เป็นสี reddish brown (น้ำตาลแดง) ถ้า titrate เกิน end point ควรจะ titrate กลับมาให้ตรงกับ end point ที่ถูกต้องโดยใช้ $KMnO_4$ ให้ V_2 เป็นปริมาตรที่แท้จริง ซึ่งได้จากการเอาปริมาตรของ $KMnO_4$ ลบออกจากปริมาตรของ ammonium ferrous sulfate

7.3.2 ทำ blank โดยใช้ H_2O แทนตัวอย่าง และ ให้ V_3 เป็นปริมาตรของ ammonium ferrous sulfate ที่ titrate พอดีกับ $K_2Cr_2O_7$ 20 ml

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of result)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของ ethanol (g/100 ml)} = 0.01\,V_1 \times \frac{(V_3 - V_2)}{V_3} \times \frac{100}{V_0} \times \frac{100}{V}$$

เมื่อ V = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

V_1 = ปริมาตรของ $K_2Cr_2O_7$

V_2 = ปริมาตรของ ammonium ferrous sulfate

V_3 = ปริมาตรของ blank test

V_0 = ปริมาตรของ distillate

8.2 การรายงานผล

รายงานผลปริมาณ ethanol หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ค่า RPD ต้องไม่เกิน 5%

DMSc F 1019: การวิเคราะห์ปริมาณอะซีซัลเฟม-เค, แอสพาแทม และซัคคารินในอาหาร Determination of Acesulfame-K, aspartame and saccharin in Foods

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอะซีซัลเฟม–เค, แอสพาแทม และซัคคารินในอาหาร โดยวิธี HPLC

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

BS EN 12856: 1999 Foodstuffs-Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin - High performance liquid chromatographic method

3. หลักการ (Principle)

วัตถุให้ความหวานในตัวอย่างอาหารจะถูกสกัดด้วยน้ำกลั่น สารละลายที่ได้อาจกรองผ่าน solid phase extraction (SPE) หรือตกตะกอนด้วย Carraz reagents จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ reversed-phase column และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 220 nm

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 HPLC UV detector หรือ diode array detector

4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.3 เครื่อง homogenizer

4.4 เครื่อง centrifuge และ centrifuge tubes ขนาด 50 ml

4.5 อุปกรณ์

4.5.1 ชุดกรองตัวอย่าง (sample clarification kit) และชุดกรองสารละลาย (solvent clarification kit): membrane filter (nylon, 0.45 μm, dia. 47 mm), syringe filter (PTFE/Nylon, 0.45 μm, dia. 13 mm)

4.5.2 Solid phase extraction (SPE) C18 (reversed phase), 500 mg

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 acetonitrile (HPLC grade)

5.2 methanol (HPLC grade)

5.3 potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)

5.4 dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)

5.5 5% phosphoric acid (H_3PO_4) (1.7g/ml, 85%)

5.6 Carrez No.1: ชั่ง potassium hexacyanoferrate (II)($K_4[Fe(CN)_6]$. $3H_2O$) น้ำหนัก 15 g แล้วละลาย ด้วย H_2O แล้วปรับให้ครบ 100 ml

5.7 Carrez No. 2: ชั่ง zinc sulfate ($ZnSO_4$. $7H_2O$)(w/w) น้ำหนัก 30 g ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับให้ครบ 100 ml

5.8 phosphate buffer solution I (0.02 mol/L; pH 4.3): ละลาย 2.72 g KH_2PO_4 ใน beaker ขนาด 1 L ด้วย H_2O 800 ml ปรับสารละลายให้มี pH 4.3 ด้วย 5% H_3PO_4 จากนั้นถ่ายสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด Lแล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.9 phosphate buffer solution II (0.0125 mol/L; pH 3.5): ละลาย 1.70 g KH_2PO_4 ใน beaker ขนาด 1 L ด้วย H_2O 800 ml ปรับสารละลายให้มี pH 3.5 ด้วย 5% H_3PO_4 จากนั้นถ่ายสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 1 L แล้วปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.10 mobile phase: ผสมสารละลาย ในข้อ 5.10.1-5.10.7 ตามอัตราส่วนที่กำหนด นำมากรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 µm และ degas นาน 5 min ในเครื่อง ultrasonic bath โดยเตรียมเมื่อจะใช้ และสามารถเลือกสัดส่วนของ mobile phase จาก 5.10.1 ถึง 5.10.7 ได้ตามความเหมาะสม

5.10.1 phosphate buffer solution I + acetonitrile อัตราส่วน 90:10

5.10.2 phosphate buffer solution I + phosphoric acid pH = 2.8

5.10.3 phosphate buffer solution II + acetonitrile อัตราส่วน 80:20

5.10.4 phosphate buffer solution II + acetonitrile อัตราส่วน 85:15

5.10.5 phosphate buffer solution II + acetonitrile อัตราส่วน 90:10

5.10.6 phosphate buffer solution II + acetonitrile อัตราส่วน 95:5

5.10.7 phosphate buffer solution II + acetonitrile อัตราส่วน 98:2

5.11 สารมาตรฐาน Aspatame, Acesulfame-K และ Saccharin

5.11.1 สารละลายมาตรฐานผสม (1 mg/ml)

ชั่งสารมาตรฐาน Aspatame, Acesulfame-K และ Saccharin ชนิดละ 100 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ขวดเดียวกัน ละลายและปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.11.2 working standard solution (100, 50, 10 mg/L)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานจาก 5.11.1 ปริมาตร 10 ml, 5 ml และ 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O

5.12 control solution (อาจปรับเปลี่ยนชนิดสารมาตรฐานตามความเหมาะสม)

ชั่งสารมาตรฐาน Aspatame 220 mg, Acesulfame-K 30 mg, Sodium saccharin 20 mg, Caffeine 60 mg, Sorbic acid 100 mg, Benzoic acid 100 mg, Vanilla 100 mg, Diketopiperacin 10 mg, Phenyl alanine 10 mg, Aspatyl phenylalanine 10 mg, Hydroxymethylfurfurol 20 mg และ Theobromine 70 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ใบเดียวกัน ละลายและปรับปริมาตรด้วย H_2O เจือจางสารละลายผสมนี้ 5 เท่าด้วย H_2O เมื่อจะใช้งาน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 อาหารที่เป็นของเหลวใส เช่น เครื่องดื่มโคลา น้ำมะนาว ให้สุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ปิเปต 20 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml นำมาเจือจางและปรับปริมาตร ด้วย H_2O จากนั้นนำมากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm

6.2 อาหารที่เป็นของเหลวขุ่น ได้แก่ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่มีนมเป็นเฟลเวอร์ ให้สุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว แล้วปิเปต 20 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม Carrez No.1 2 ml เขย่า แล้วเติม Carrez No.2 2 ml เขย่าแรง ๆ และตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 10 min เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O จากนั้นนำมากรองแบบ fluted paper (ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 10 ml แรก) นำสารละลายที่กรองได้ที่เหลือมา ผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm หากมีตะกอนมากให้นำไป centrifuge ประมาณ 10 min ก่อนกรอง

6.3 อาหารประเภทแยม มาร์มาเลด และผลิตภัณฑ์ที่คล้ายกัน นำมาบดด้วย blender/homogenizer แล้วชั่งตัวอย่าง 20 g ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม H_2O 60 ml วางใน ultrasonic bath ประมาณ 20 min (อุณหภูมิไม่เกิน 40°C) นำขวดมาวางไว้จนมีอุณหภูมิ

เท่าอุณหภูมิห้อง เติม Carrez No.1 2 ml เขย่า แล้วเติม Carrez No.2 2 ml เขย่าแรง ๆ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 min เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O จากนั้น นำมากรองแบบ fluted paper (ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 10 ml แรก) นำสารละลายที่กรองได้ที่เหลือมา ผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm หากมีตะกอนมากให้นำไป centrifuge ประมาณ 10 min ก่อนกรอง

6.4 อาหารกึ่งแข็ง หรืออาหารที่เป็นของแข็ง เช่น ขนม ผลิตภัณฑ์จากนมเปรี้ยว นำมาบดด้วย homogenizer แล้วชั่งตัวอย่าง 10-20 g ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติมน้ำกรอง 60 ml วางใน ultrasonic bath ประมาณ 20 min (อุณหภูมิไม่เกิน 40°C) นำขวดมาวางไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง เติม Carrez No.1 2 ml เขย่าแล้วเติม Carrez No.2 2 ml เขย่าแรง ๆ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 min เจือจางและปรับปริมาตร ด้วย H_2O จากนั้นนำมากรองแบบ fluted paper (ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 10 ml แรก) นำสารละลายที่กรองได้ที่เหลือมา ผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm หากมีตะกอนมากให้นำไป centrifuge ประมาณ 10 min ก่อนกรอง

6.5 อาหารที่เป็นผง เช่น ผงคัสตาร์ด แล้วชั่งตัวอย่าง 10 g ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 500 ml เติม H_2O 400 ml วางใน ultrasonic bath ประมาณ 20 min (อุณหภูมิไม่เกิน 40°C) นำขวดมาวางไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง เติม Carrez No.1 6 ml เขย่า แล้วเติม Carrez No.2 6 ml เขย่าแรง ๆ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 min เจือจางและปรับปริมาตรด้วย H_2O จากนั้นนำมากรองแบบ fluted paper (ทิ้งสารละลายที่กรองได้ 10 ml แรก) นำสารละลายที่กรองได้ที่เหลือมา ผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm หากมีตะกอนมากให้นำไป centrifuge ประมาณ 10 min ก่อนกรอง

7. ขั้นตอนการวิเคราะห์

7.1 นำสารละลายที่ได้จาก 6.1-6.5 มาวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ในการฉีดแต่ละครั้งให้มีระยะเวลาไม่น้อยกว่า 15 min ก่อนฉีดครั้งต่อไป เปรียบเทียบ retention time และปริมาณสารให้ความหวานจากโครมาโตแกรมของตัวอย่างและกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ในกรณีที่สงสัยว่าจะมีการรบกวน ให้ล้างคอลัมน์ด้วยสารผสมระหว่าง mobile phase (5.10) + acetonitrile = 1:1

7.2 สภาวะเครื่อง HPLC;

Column: RP C18 (3-10 μm, 4.6 × 150 mm)

Detector: UV, 220 nm หรือ DAD

Flow rate: 0.8-1.0 ml/min

Injection volume: 10-20 μl

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโซเดียมซัคคาริน/แอสพาแทม/อะซีซัลเฟม-เค (mg/kg)} = \frac{c \times v \times f}{w}$$

เมื่อ
- c = ปริมาณ โซเดียมซัคคาริน/แอสพาแทม/อะซีซัลเฟม-เค ในตัวอย่างที่อ่านจากกราฟ (mg/L)
- v = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (ml)
- w = น้ำหนักที่ใช้ทดสอบ (g)
- f = dilution factor

8.2 การรายงานผล

รายงานผล หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

DMSc F 1020: การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมซัยคลาเมตในอาหาร Determination of sodium cyclamate in Foods

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมซัยคลาเมต (sodium cyclamate) ในอาหาร

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

EN 12857: 1999 Foodstuffs - Determination of cyclamate-High performance liquid chromatographic method

3. หลักการ (Principle)

Sodium cyclamate จะถูกสกัดออกจากอาหารด้วยน้ำ และถูกเปลี่ยนให้เป็น N, N-dichloro cyclohexylamine จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ reversed-phase column และ UV detector ที่ความยาวคลื่น 314 nm

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 HPLC UV detector หรือ diode array detector

4.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.3 เครื่อง homogenizer

4.4 เครื่อง centrifuge และ centrifuge tubes ขนาด 50 ml

4.5 Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C

4.6 อุปกรณ์

4.5.1 ชุดกรองตัวอย่าง (sample clarification kit) และชุดกรองสารละลาย (solvent clarification kit): membrane filter (nylon, 0.45 μm, dia. 47 mm), syringe filter (PTFE, 0.45 μm, dia. 13 mm)

4.5.2 Separatory funnel ขนาด 50 และ 100 ml

4.5.3 กระดาษกรองเบอร์ 4 หรือเทียบเท่า

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 MeOH, HPLC grade

5.2 n-Heptane, HPLC grade

5.3 Sodium sulfate, anhydrous

5.4 Sodium carbonate solution, ความเข้มข้น 50 g/L

5.5 Sodium hypochlorite solution (1.7% active chlorine) การเจือจางสารละลายให้มี active chlorine 1.7% ดำเนินการตามข้อ 10.2

5.6 Sulfuric acid (H_2SO_4) 50% (w/w)

5.7 Carrez No.1: ละลาย potassium hexacyanoferrate (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$.$3H_2O$) (ความบริสุทธิ์เท่ากับหรือมากกว่า 99%) 15 g ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับให้ครบ 100 mL

5.8 Carrez solution No. 2: ละลาย zinc sulfate ($ZnSO_4$.$7H_2O$)(w/w) (ความบริสุทธิ์เท่ากับหรือมากกว่า 99.5%) 30 g ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับให้ครบ 100 mL

5.9 Mobile phase (MeOH: H_2O= 80:20): ผสม MeOH และน้ำในอัตราส่วน 80:20 ให้เพียงพอในการใช้งาน จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 µm และ degas นาน 5 นาที ใน ultrasonic bath (สามารถปรับอัตราส่วนของ mobile phase ตามความเหมาะสม)

5.10 Conditioning solution (EDTA solution ความเข้มข้น 10 g/L): ชั่ง EDTA 10 g ละลายในน้ำกลั่น 1 L แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 µm และ degas นาน 5 นาที ใน ultrasonic bath

5.11 น้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำที่มีคุณภาพเทียบเคียง

5.12 Cellulose, powdered ความบริสุทธิ์เท่ากับหรือมากกว่า 99.9%, acid washed

5.13 light petroleum, boiling range from 40 – 60°C

5.14 สารมาตรฐาน sodium cyclamate: purity > 99%

5.14.1 สารละลายมาตรฐาน sodium cyclamate 4490 µg/mL: ชั่งสารมาตรฐาน sodium cyclamate 898 ± 0.1 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 200 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (ถ้าเป็น cyclohexylsulfamic acid ให้ชั่ง cyclohexyl sulfamic acid 800 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 200 mL แล้วปรับให้ครบปริมาตรด้วยน้ำกลั่น)

5.14.2 working standard solution (11.22, 44.90, 112.25, 224.50, 449.00 และ 898.00 mg/L): ปิเปตสารละลายมาตรฐาน sodium cyclamate ปริมาตร 0.25, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (ถ้าเป็น cyclohexylsulfamic acid จะมีความเข้มข้น 10, 40, 100, 200, 400 และ 800 mg/L)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 อาหารที่เป็นของเหลวหรือของแข็งที่ละลายน้ำแล้วได้เป็นสารละลายใส ได้แก่ น้ำผลไม้ ลูกกวาด ให้สุ่มตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำมาชั่ง (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) นำมาเจือจางหรือละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณ cyclamate 400 mg/L ในกรณีที่เป็นของเหลวขุ่นให้กรองก่อนเจือจาง จากนั้นนำไป derivatization

6.2 อาหารกึ่งแข็ง (ข้น, หนืด) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม ขนม น้ำผลไม้เข้มข้น แยม เยลลี่ มาร์มาเลด ให้นำตัวอย่างมาบดด้วย homogenizer ประมาณ 1 min ชั่งตัวอย่างประมาณ 15 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) หรือชั่งปริมาณอื่นที่เหมาะสม เพื่อให้ได้มีปริมาณ cyclamate 400 mg/L (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน beaker ขนาด 50 mL แล้ว ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml เติมน้ำกลั่นประมาณ 80 ml เขย่าแล้วนำไปใส่ในเครื่อง ultrasonic bath นาน 10 min เติมสารละลาย Carrez No.1, 1-2 ml และเติม Carrez No. 2, 1-2 ml (โดยต้องใช้ในปริมาณที่เท่ากัน) เขย่า ปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง (ให้ทิ้งส่วนที่กรองได้ 10 ml แรก)

6.3 ตัวอย่าง ช็อกโกแลต และผลิตภัณฑ์ ชั่งตัวอย่างประมาณ 15 g หรือปริมาณที่เหมาะสม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ลงในหลอด centrifuge แล้วนำไปวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C จนตัวอย่างหลอมละลาย ค่อย ๆ เติม light petroleum 25 ml ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาหลอด centrifuge ให้สนิท แล้วนำไปวางลงในเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 30 วินาที และเขย่าปิดฝาหลอด centrifuge ให้สนิท แล้วนำไป centrifuge เป็นเวลา 10 min โดยใช้ความเร็วรอบ 1,400 *g* ทิ้งชั้น light petroleum และทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง วางหลอด centrifuge ในอ่าง water bath ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 15 min เพื่อไล่ light petroleum เติมน้ำกลั่นประมาณ 30 ml เขย่า แล้ววางหลอด centrifuge ในเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 5 min ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml โดยใช้น้ำกลั่น 40 ml การล้างตัวอย่างลงใน volumetric flask เติมสารละลาย Carrez No.1, 1-2 ml และเติม Carrez No. 2, 1-2 ml (โดยต้องใช้ในปริมาณที่เท่ากัน) เขย่าปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง (ให้ทิ้งส่วนที่กรองได้ 10 ml แรก)

6.4 อาหารที่มีไขมันสูง เช่น มายองเนส homogenize ตัวอย่างแล้วชั่งประมาณ 15 g หรือปริมาณที่เหมาะสม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ลงในหลอด centrifuge เติม powdered cellulose 2.5 g ผสมกับตัวอย่าง เติม light petroleum 25 ml เขย่า ปิดฝาหลอด centrifuge ให้สนิท แล้ววางลงในเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 30 sec และเขย่า แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง centrifuge 10 g โดยใช้ความเร็วรอบ 1,400 *g* ทิ้งชั้น light petroleum ทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง นำหลอด centrifuge มาวางใน water bath ที่ อุณหภูมิ 60°C นาน 15 min และเขย่าเป็นครั้งคราว เพื่อระเหย light petroleum เติมน้ำกลั่นประมาณ 40 ml เขย่า และวางหลอด centrifuge ในเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 10 min ถ่ายสารผสมที่ได้ลงใน volumetric flask 100 ml โดยใช้น้ำกลั่น 30 ml ในการถ่ายสารผสม ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Carrez No.1, 1-2 ml และเติม Carrez No. 2, 1-2 ml (โดยต้องใช้ในปริมาณที่เท่ากัน) เขย่า ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง (ให้ทิ้งส่วนที่กรองได้ 10 ml แรก)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ปิเปตสารละลายที่กรองได้จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 200 ml ลงใน separatory funnel เติม H_2SO_4 1.0 ml, n-heptane 10.0 ml, sodium hypochlorite solution 2.5 ml เขย่าแรง ๆ ประมาณ 1 min แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทิ้งสารละลายชั้นล่าง (aqueous phase) แล้ว เก็บชั้น n-heptane (ในกรณีที่เกิด emulsion ให้เติม sodium carbonate solution 25 ml แล้วเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ 30 sec แล้วปล่อยให้แยกชั้น) ถ้าแยกชั้นดีให้เติม sodium sulfate anhydrous 1 g แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง (ถ้าชั้น n-heptane ขุ่น ให้เติม sodium sulfate anhydrous ประมาณ 7 g แล้วจึงนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง) สารละลายที่ผ่านการ derivatized จะเก็บไว้ได้ไม่เกิน 24 hr ที่ 4°C กรองส่วนที่ได้ด้วย syringe filter ชนิด PTFE แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยฉีดสารละลาย 20 µL และหาปริมาณโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

7.2 สภาวะเครื่อง HPLC;

Column: RP C18 (3-10 µm, 4.6 × 150 mm)

Detector: UV, 220 nm หรือ DAD

Flow rate: 0.8-1.0 ml/min

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ โซเดียมซัยคลาเมต (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)} = \frac{c \times v \times f}{w}$$

เมื่อ c = ปริมาณโซเดียมซัยคลาเมตในตัวอย่างที่อ่านจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

v = ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

w = น้ำหนักที่ใช้ทดสอบ (กรัม)

f = dilution factor

8.2 การรายงานผล

รายงานผลหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

-

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โซเดียมซัยคลาเมตในอาหาร โดยวิธี HPLC ตามเอกสารอ้างอิง

น้ำมะนาว	$\bar{x}$ = 435.9 mg/l	RSD_r = 1.4%	RSD_R = 3.1%
น้ำส้ม	$\bar{x}$ = 178.3 mg/l	RSD_r = 3.1%	RSD_R = 4.9%
Spray cream	$\bar{x}$ = 280.9 mg/kg	RSD_r = 3.3%	RSD_R = 6.3%
โยเกิร์ตผลไม้	$\bar{x}$ = 647.6 mg/kg	RSD_r = 2.3%	RSD_R = 9.3%

10.2 การวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนในสารละลาย hypochlorite

10.2.1 สารเคมี :

- potassium iodide solution (KI solution) 5 g/100 ml
- hydrochloric acid (HCl), 10%
- sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$), 0.1 mole/L
- น้ำแป้ง 1 g/100 g
- calcium carbonate ($Ca(CO_3)_2$)

10.2.2 วิธีการ : ปิเปตสารละลาย hypochlorite (ที่มี active chlorine ประมาณ 2%) ปริมาตร 1 ml ลงในขวดก้นกลมที่มีน้ำกลั่น 100 ml และเติม KI solution 10 ml แล้วเติม HCl 5 ml เพื่อทำให้เป็นกรด หลังจากนั้นค่อย ๆ เติม $Ca(CO_3)_2$ เล็กน้อย ระวังแก๊ส CO_2 ที่เกิดขึ้น แล้วนำไปไตเตรตกับ $Na_2S_2O_3$ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีน้ำตาลอ่อนลงจนเกือบไม่มีสี ให้เติมน้ำแป้งลงไป 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน และนำไปไตเตรตต่อกับ $Na_2S_2O_3$ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นไม่มีสี

10.2.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณคลอรีน (g/100 g)} = \frac{V_T \times 3.546 \times F_T \times F_V \times 100}{V_H \times 1000}$$

เมื่อ V_T คือ ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ (ml)

F_T คือ ความเข้มข้นของสารละลาย $Na_2S_2O_3$

F_V คือ dilution factor

V_H คือ ปริมาตรของ hypochlorite

โดย 1 ml $Na_2S_2O_3$ (0.1 mole/L) = 3.546 mg active chlorine

DMSc F 1021: การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง เหล็ก และสังกะสี ในอาหาร Determination of Lead, Cadmium, Copper Iron, and Zinc in foods

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะตะกั่ว (Lead; Pb) แคดเมียม (Cadmium; Cd) ทองแดง (Copper; Cu) เหล็ก (Iron; Fe) และสังกะสี (Zinc; Zn) ในอาหาร ที่ระดับความเข้มข้นของ Pb 0.3 mg/kg, Cd 0.1 mg/kg, Zn 1 mg/kg, Cu 5 mg/kg และ Fe 7 mg/kg โดยวิธี dry ashing and flame atomic absorption spectrometry (GFAAS) และวิธี flame and graphite furnace

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 999.11: Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างจะถูกทำให้แห้งและเผาให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิ 450°C โดยเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราไม่เกิน 50°C/hr เติม 6M HCl (1+1) ระเหยให้แห้ง ละลายเถ้าด้วย 0.1M HNO_3 และวัดปริมาณโลหะด้วยเครื่อง flame AAS และ GF AAS

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 FAAS

4.2 GFAAS

4.3 เครื่องชั่ง อ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.4 เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) ควบคุมอุณหภูมิได้คงที่ 450 ± 25°C

4.5 Hot plate ชนิดปรับระดับความร้อนได้ถึง 300°C

4.6 IR Lamp 250 W

4.7 Quartz หรือ platinum หรือ porcelain crucibles ขนาด 50–75 ml

4.8 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 ml

4.9 auto pipette ขนาด 200 µL, 1 และ 10 ml พร้อม tip

4.10 กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 70 mm

4.11 ขวดพลาสติกชนิด polystyrene หรือ polyethylene มีฝาเกลียวปิดขนาด 50-100 mL

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าหรือดีกว่า เช่น suprapure grade และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq$ 18 MΩ-cm

5.1 6M HCl: เจือจาง HCl 37% (w/w) 500 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 1 L

5.2 HNO_3 65% (w/w)

5.3 HNO_3 10%: เจือจาง HNO_3 เข้มข้น 10 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.4 0.1 M HNO_3: เจือจาง HNO_3 เข้มข้น 7 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 1 L

ข้อควรระวัง การเจือจางกรดต้องค่อย ๆ เติมกรดลงในน้ำเสมอ

5.5 สารมาตรฐาน (Standards)

5.5.1 สารละลายมาตรฐาน Pb 1,000 µg/ml

5.5.2 สารละลายมาตรฐาน Cd 1,000 µg/ml

5.5.3 สารละลายมาตรฐาน Cu 1,000 µg/ml

5.5.4 สารละลายมาตรฐาน Fe 1,000 µg/ml

5.5.5 สารละลายมาตรฐาน Zn 1,000 µg/ml

5.5.6 working standard solution สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GFAAS เจือจางสารละลายมาตรฐาน Pb และ Cd ด้วย 0.1 M HNO_3 ให้ได้ช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นของธาตุที่ต้องการวัด สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS เจือจางสารมาตรฐาน Cu, Fe และ Zn ด้วย 0.1 M HNO_3 ให้ได้ช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นของธาตุที่ต้องการวัด

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างเฉพาะส่วนที่บริโภคได้และบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การทำความสะอาดอุปกรณ์ภาชนะพลาสติกและเครื่องแก้ว ล้างภาชนะพลาสติกและเครื่องแก้วด้วยน้ำและน้ำยาทำความสะอาด (detergent) ล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาดตามด้วย H_2O ล้างด้วย HNO_3 10% ตามด้วย H_2O อีก 4-5 ครั้ง

7.2 การทำให้ตัวอย่างแห้ง ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 10-20 g (± 0.01 g) ใส่ในถ้วยตัวอย่าง (crucible) ระเหยให้แห้งด้วย water-bath หรืออบในตู้อบร้อน หรือ hot plate ที่อุณหภูมิ 100°C

7.3 วิเคราะห์ Blank ควบคู่กับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

7.4 การเผาให้หมดควัน

7.4.1 วางถ้วยตัวอย่างปิดด้วยกระจกบน hot plate และวาง IR lamp เหนือตัวอย่าง โดยเริ่มต้นเผาที่อุณหภูมิไม่เกิน 100°C และค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 300°C และเผาต่อจนหมดควัน ระยะเวลาการเผาขึ้นกับชนิดตัวอย่าง

7.4.2 วางถ้วยตัวอย่างในเตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) โดยเริ่มต้นเผาที่อุณหภูมิ 200-300°C แล้วค่อย ๆ เพิ่มเป็น 450°C ด้วยอัตราไม่เกิน 50°C/hr เป็นเวลาอย่างน้อย 8 hr หรือเผาไว้ข้ามคืน คอยให้อุณหภูมิภายในเตาเผาเย็นลง

7.4.3 นำถ้วยตัวอย่างออกจากเตาเผา ทิ้งไว้ให้เย็น ทำเถ้าให้เปียก โดยเติม H_2O 1-3 ml นำไประเหยบน water-bath หรือ hot plate จนแห้ง

7.4.4 นำถ้วยตัวอย่างเข้าเผาต่อในเตาเผา เริ่มต้นเผาที่อุณหภูมิไม่เกิน 200°C ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 50-100°C/hr จนถึง 450°C และเผาต่อเป็นเวลา 1-2 hr หรือมากกว่า

7.4.5 ทำซ้ำ จนตัวอย่างเป็นเถ้าขาว หรือเทา หรือมีสีจาง ๆ

7.4.6 เติม 6M HCl 5 ml แกว่งถ้วยเบา ๆ เพื่อให้เถ้าทั้งหมดสัมผัสกับกรด นำไประเหยบน water-bath หรือ hot plate จนแห้ง

7.4.7 ละลายเถ้าด้วย 0.1 M HNO_3 10-30 ml แกว่งถ้วยเบา ๆ เพื่อละลายเถ้า ปิดด้วยกระจก ตั้งทิ้งไว้ 1-2 hr คนสารละลายตัวอย่างในถ้วยตัวอย่างให้ทั่วด้วยแท่งแก้ว

7.4.8 กรองผ่านกระดาษกรอง ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ล้างถ้วยตัวอย่างด้วย H_2O หลาย ๆ ครั้ง รวมน้ำล้างลงใน volumetric flask เดิม และปรับปริมาตรด้วย H_2O

7.4.9 ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ลงในขวดพลาสติกปิดฝาให้สนิท

7.4.10 วัดปริมาณ Pb และ Cd ด้วย GFAAS ส่วน Cu, Fe และ Zn วัดปริมาณด้วย FAAS

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณโลหะจากสูตร

$$C = \frac{(a - b) \times v}{m}$$

เมื่อ	C	=	ความเข้มข้นโลหะในตัวอย่าง (mg/kg)
	a	=	ความเข้มข้นโลหะในสารละลายตัวอย่าง (mg/L)
	b	=	ความเข้มข้นโลหะใน blank (mg/L)
	v	=	ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (mL)
	m	=	น้ำหนักตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณโลหะที่พบในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the Quality of Test Results)

9.1 ก่อนทำกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ความเข้มข้นตามที่คู่มือเครื่องกำหนด

9.2 ควรตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นสูงสุดหลังการวัดตัวอย่างทุก 10-12 ตัวอย่าง ค่าที่วัดได้ควรเบี่ยงเบนจากค่าที่วัดครั้งแรกไม่เกิน 5%

9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง

9.4 วิเคราะห์ spiked matrix เพื่อประเมิน %Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ยอมรับดังนี้

ระดับความเข้มข้น (ng/ml)	% Recovery
100-10	80-110
10-<100	60-115
1-< 10	40-120

9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสัมพัทธ์ (% RPD) ของผลวิเคราะห์มีเกณฑ์การยอมรับ คำนวณจากสูตร

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

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

10. รายละเอียดอื่น

ข้อมูล Interlaboratory study results ปรากฏในตาราง

ตารางแสดง Interlaboratory study results

Metal	Sample	Analyte range	Mean, mg/kg	n[a]	S_r[b]	S_R[c]	RSD_r[d]	RSD_R[e]	r[f]	R[g]
Pb-GFAAS	Liver paste/milk powder	≥ 0.04	0.040	11	0.019	0.019	46	46	0.052	0.052
	Apple sauce		0.27	10		0.10		38		0.29
	Minced fish		0.53	10		0.11		20		0.31
	Wheat bran		0.111	12		0.056		50		0.16
	Simulated diets D/E		0.246	10[1]		0.048	14	20	0.096	0.14
Cd-GFAAS	Liver paste	≥ 0.05	0.0491	11		0.0058		12		0.016
	Minced fish/wheat bran		0.175	8[1]	0.021	0.032	12	18	0.058	0.089
	Simulated diets D/E		0.51	8		0.13	19	26	0.27	0.37
Zn-FAAS	Liver paste/minced fish	≥ 0.7	6.63	13	0.35	0.50	5.3	7.5	0.98	1.4
	Apple sauce		0.699	11[3]		0.047		6.8		0.13
	Wheat bran		71.5	12[2]		4.9		6.8		14
	Milk powder		35.0	12[2]		2.8		8.0		7.9
	Simulated diets D/E		37.82	11[2]		1.31	1.8	3.5	1.9	3.7
Cu-FAAS	Apple sauce/minced fish	≥ 0.2	0.240	12[1]	0.076	0.076	32	32	0.21	0.21
	Milk powder		0.51	14[2]		0.23		45		0.65
	Liver paste		5.34	13[2]		0.37		6.9		1.0
	Wheat bran		9.52	12		0.98		10		2.7
	Simulated diets D/E		45.4	12[1]	1.6	3.1	3.6	6.9	4.6	8.8
Fe-FAAS	Liver paste	≥ 4	24.3	14		2.8		11		7.8
	Minced fish/ milk powder		3.99	11[3]	0.44	0.54	11	14	1.2	1.5
	Wheat bran		124	13[1]		14		11		39
	Simulated diets D/E		216	13	18	23	8.2	11	49	64

[a]n = Number of laboratories remaining after elimination of outliers [in brackets].

[b]s_r = Repeatability standard deviation

[c]s_R = Reproducibility standard deviation

[d]RSD_r = Relative repeatability standard deviation

[d]RSD_R = Relative reproducibility standard deviation

[f]r = $2.8 \times s_r$

[g]R = $2.8 \times s_R$

DMSc F 1022: การวิเคราะห์ปริมาณดีบุกในอาหารกระป๋อง Determination of Tin in canned foods

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณดีบุก (Tin; Sn) ในอาหารกระป๋อง โดยวิธี Atomic absorption spectrophotometric method

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 985.16 Tin in Canned Foods

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างจะถูกย่อยด้วย HNO_3 และ HCl และถูกเจือจาง หลังจากนั้นเติม aqueous KCl ลงในสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานเพื่อกำจัดสารรบกวน วัดปริมาณดีบุกด้วยเครื่อง flame AAS (N_2O-C_2H_2 flame) ที่ 235.5 nm

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 flame AAS

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าหรือดีกว่า เช่น suprapure grade และน้ำ (H_2O) ที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity ≥ 18 MΩ-cm

5.1 HNO_3 65% (w/w): ทดสอบความบริสุทธิ์โดยเจือจางด้วย H_2O สัดส่วน 1:4 (v/v) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS ผลต้องไม่พบสัญญาณ แสดงว่ากรดมีคุณภาพเหมาะกับการใช้งาน

5.2 KCl solution 10 mg K/ml: ละลาย KCl 1.91 g ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

5.3.1 Sn standard solution 1,000 µg/mL

5.3.2 working standard solutions: 0, 50, 100, 150 และ 200 µg/mL เตรียมโดยปิเปต HCl 10 ml, KCl solution (10 mg K/ml) 1.0 ml และ Sn standard solution 1,000 µg/mL (5.3.1) 0, 5, 10, 15 และ 20 ml เจือจางด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างเฉพาะส่วนที่บริโภคได้และบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่างอาหารน้ำหนักแน่นอน (± 0.01 g) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml แล้วทำให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 120°C โดยน้ำหนักตัวอย่างขึ้นกับชนิดอาหาร ดังนี้ เครื่องดื่มและน้ำผักผลไม้ ชั่ง 30-40 g, อาหารที่มีความชื้น 50-75% ชั่ง 20 g และอาหารที่เป็นของแข็งหรือของแข็งกึ่งเหลว ชั่ง 5-10 g จำกัดปริมาณไขมัน และน้ำมันอยู่ระหว่าง 2-4 g และสารอินทรีย์ทั้งหมด ชั่งไม่เกิน 5 g

7.2 เติม conc. HNO_3 30 ml หลังจากการเติมกรดไม่เกิน 15 min เริ่มย่อยตัวอย่างโดยใช้ความร้อนต่ำ ๆ ในตู้ดูดควัน ต้องระวังไม่ให้ตัวอย่างเกิดฟองล้น (หากไม่สามารถทำการย่อยตัวอย่างให้เสร็จภายในวันเดียวกัน ต้องไม่เติมกรด) ต้มให้เดือดเบา ๆ ต่อไปจนเหลือปริมาตรประมาณ 3-6 ml หรือตัวอย่างเริ่มแห้ง ต้องระวังไม่ให้ตัวอย่างไหม้ หลังจากยก flask ลงจากเตาแล้วให้ทำขั้นตอนต่อไปทันที

7.3 เตรียม flask อีก 2 ใบ สำหรับ reagent blank ให้เติม conc. HCl 25 ml และต้มเบา ๆ อีกครั้งประมาณ 15 min จนกระทั่งไม่มีการปล่อยแก๊ส Cl_2 ต้มให้เดือดเบา ๆ ต่อไปจนเหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ml (โดยใช้ flask ขนาดเดียวกันเติม H_2O ปริมาตร 15 ml เพื่อประมาณปริมาตรตัวอย่างที่เหลือ) เติม H_2O อีก 40 ml แกว่งและถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml กลั้วล้าง flask ด้วย H_2O ประมาณ 10 ml ในขั้นตอนนี้อาจเก็บไว้ได้ข้ามคืน หรือนานกว่านั้น เนื่องจากมีกรด HCl เหลืออยู่

7.4 ปิเปต KCl solution (10 mg K/ml) 1.0 ml ลงใน volumetric flask ทุกใบ ทิ้งให้เย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง เจือจางและปรับให้ครบปริมาตรด้วย H_2O ผสมให้เข้ากันกรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง เก็บ filtrate 30-50 ml ในขวดฝาเกลียวพลาสติกชนิด polypropylene หรือ polyethylene ไม่ต้องกรอง blank solution ปิดขวดให้สนิทจนกระทั่งวิเคราะห์ด้วย AAS สารละลายนี้มีความคงตัวหลายเดือน

7.5 วัดปริมาณด้วย flame AAS

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณโลหะจากสูตร

$$C = \frac{(a - b) \times v}{m}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นโลหะในตัวอย่าง (mg/kg)
a = ความเข้มข้นโลหะในสารละลายตัวอย่าง (mg/l)
b = ความเข้มข้นโลหะใน blank (mg/l)
v = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (ml)
m = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณโลหะที่พบในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the Quality of Test Results)

9.1 ก่อนทำกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ความเข้มข้นตามที่คู่มือเครื่องกำหนด

9.2 ควรตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นสูงสุดหลังการวัดตัวอย่างทุก 10-12 ตัวอย่าง ค่าที่วัดได้ควรเบี่ยงเบนจากค่าที่วัดครั้งแรกไม่เกิน 5%

9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง

9.4 วิเคราะห์ spiked matrix เพื่อประเมิน% Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ยอมรับดังนี้

ระดับความเข้มข้น (ng/ml)	% Recovery
100-10	80-110
10-<100	60-115
1-<10	40-120

9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสัมพัทธ์ (% RPD) ของผลวิเคราะห์ มีเกณฑ์การยอมรับคำนวณจากสูตร

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

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

DMSc F 1023: การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมดในอาหาร Determination of total arsenic in foods

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมด (Total Arsenic; As) ในอาหาร โดยวิธี microwave digestion และวัดปริมาณด้วยเครื่อง hydride-atomic absorption spectrophotometer (hydride - AAS)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 986.15: Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างจะถูกย่อยด้วย HNO_3 ในระบบปิด โดยวิธี microwave digestion จากนั้นสารละลายตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นเถ้า โดยการเติม $Mg(NO_3)_2$ ให้ความร้อนต่ำ ๆ จนสารละลายแห้ง แล้วทำให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิ 450°C ละลายเถ้าด้วย 8M HCl วัดปริมาณด้วยเครื่อง hydride-AAS

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 hydride - AAS

4.2 microwave oven พร้อมชุดอุปกรณ์ รวมทั้งภาชนะสำหรับย่อยตัวอย่างพร้อมฝาปิด (vessel)

4.3 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.4 เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace) สำหรับใช้งานที่ 450 ± 25°C

4.5 hotplate ชนิดปรับระดับความร้อนได้ถึง 400°C

4.6 quartz หรือ platinum หรือ porcelain crucibles ขนาด 50-75 ml

4.7 volumetric flask ขนาด 10, 20, 25 และ 100 ml

4.8 autopipet ขนาด 2-10 ml, 200-1,000 µL, 10-100 µL และ 5-40 µL พร้อม pipet tip

4.9 ขวดพลาสติกชนิด polystyrene หรือ polyethylene มีฝาเกลียวปิดขนาด 50-100 ml

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่าหรือดีกว่า เช่น suprapure grade และน้ำที่ใช้เป็นน้ำปราศจากไอออน (deionized water) หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ที่มีค่า resistivity $\geq$ 18 MΩ-cm

5.1 HNO_3 65% (w/w)

5.2 8M HCl: เจือจาง HCl 37% (w/w) 66 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.3 Mg $(NO_3)_2$ solution 75 mg/ml: ละลาย Mg $(NO_3)_2$ 7.5 g ด้วย H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.4 sodium borohydride solution ($NaBH_4$): ละลาย $NaBH_4$ 4 g ใน 4% NaOH 100 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

5.5 potassium iodide solution (KI): ละลาย KI 20 g ใน H_2O ปรับปริมาตรเป็น 100 ml (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

5.6 สารมาตรฐาน (standards)

5.6.1 As standard solution 1,000 μg/ml

5.6.2 Intermediate standard solution: 10 μg/mL เตรียมโดยเจือจาง As standard solution (ข้อ 5.6.1) 100 เท่าด้วย H_2O

5.6.3 Intermediate standard solution: 1 μg/mL เตรียมโดยเจือจาง As standard solution (ข้อ 5.6.1) 1,000 เท่าด้วย H_2O

5.6.4 working standard solutions: 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ng/ml เตรียมโดยปิเปต Intermediate standard solution: 1 μg/mL (ข้อ 5.6.3) ปริมาตร 0, 50 μL และ Intermediate standard solutions 10 μg/ml (ข้อ 5.6.2) ปริมาตร 10, 25, 50, 75 และ 100 μL ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย H_2O

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างเฉพาะส่วนที่บริโภคได้และบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 0.2-0.5 g ลงใน vessel เติม conc HNO_3 5 ml ปิดฝา นำไปประกอบเข้ากับชุดอุปกรณ์ นำเข้า microwave oven

7.2 ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดควัน นำ vessels ออกจากชุดอุปกรณ์

7.3 ถ่ายสารละลายตัวอย่างลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml

7.4 เติม H_2O 4 ml กลั้วล้าง vessels เจือจางและปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O ผสมให้เข้ากัน

7.5 ปิเปตสารละลายตัวอย่างลงใน porcelain crucibles เติม $Mg(NO_3)_2$ solution 1 mL

7.6 ให้ความร้อนต่ำ ๆ บน hotplate อุณหภูมิไม่เกิน 375°C จนสารละลายตัวอย่างแห้งนำไปเข้าเตาเผา อุณหภูมิ 450°C ประมาณ 30 min ทิ้งไว้ให้เย็น

7.7 ละลายด้วย 8M HCl 2 ml เติม 20% KI 0.1 ml เพื่อรีดิวซ์ As^{5+} เป็น As^{3+} ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 min

7.8 วัดปริมาณด้วย hydride AAS

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 คำนวณปริมาณสารหนูทั้งหมดจากสูตร

$$C = \frac{(a - b) \times v}{M} \times \frac{1}{1000}$$

เมื่อ	C	=	ความเข้มข้นสารหนูทั้งหมดในตัวอย่าง (mg/kg)
	a	=	ความเข้มข้นสารหนูทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง (ng/ml)
	b	=	ความเข้มข้นสารหนูทั้งหมดใน blank (ng/ml)
	v	=	ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (ml)
	m	=	น้ำหนักตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณสารหนูทั้งหมดที่พบในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) ทศนิยม 3 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the Quality of Test Results)

9.1 ก่อนทำกราฟมาตรฐานต้องทำ sensitivity check ของเครื่อง โดยใช้ working standard solution ความเข้มข้นตามที่คู่มือเครื่องกำหนด

9.2 ควรตรวจสอบการ drift ของเครื่อง โดยการวัด working standard solution ที่ความเข้มข้นสูงสุดหลังการวัดตัวอย่างทุก 10-12 ตัวอย่าง ค่าที่วัดได้ควรเบี่ยงเบนจากค่าที่วัดครั้งแรกไม่เกิน 5%

9.3 วิเคราะห์ blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง

9.4 วิเคราะห์ spiked matrix เพื่อประเมิน % Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง โดยมีเกณฑ์ยอมรับดังนี้

ระดับความเข้มข้น (ng/ml)	% Recovery
100-10	80-110
10-<100	60-115
1-<10	40-120

9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีมาก วิเคราะห์ 5% ของจำนวนตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสัมพัทธ์ (% RPD) ของผลวิเคราะห์ มีเกณฑ์การยอมรับ คำนวณจากสูตร

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

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

DMSc F 1024: การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง
Determination of Aflatoxins in corn and peanuts

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 ในข้าวโพดและถั่วลิสง (ถั่วลิสงดิบ และเนยถั่ว) ที่ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ng/g total aflatoxins

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 977.16 Sampling for Aflatoxins

2.2 AOAC Official Method 970.44 Preparation of Standards for Aflatoxins

2.3 AOAC Official Method 991.31 Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter

3. หลักการ (Principle)

ตัวอย่างถูกสกัดด้วย CH_3OH-H_2O (7+3) สารสกัดถูกนำมากรองและเจือจางด้วยน้ำและผ่าน affinity column ที่มี monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ aflatoxins B_1, B_2, G_1 และ G_2 หลังจาก aflatoxins ถูกแยก ทำให้บริสุทธิ์ และทำให้เข้มข้นขึ้น จะถูกชะออกจาก antibodies ด้วย MeOH ตรวจปริมาณ total aflatoxins ด้วย การวัดการเรืองแสง fluorescence หลังจากทำปฏิกิริยากับ bromine solution (SFB method) ตรวจปริมาณ aflatoxins B_1, B_2, G_1 และ G_2 ด้วย LC – fluorescence detector และ postcolumn iodine derivatization (PCD method)

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องบดปั่นความเร็วสูง (Blender – High speed)

4.2 กระดาษกรอง (Filter paper) ขนาด 24 cm

4.3 Glass microfiber filter paper ขนาด 11 cm

4.4 Affinity column: Aflatest P column (Vicam)

4.5 Syringe ขนาด 20 ml พร้อม Luer tip ใช้เป็น sample reservoir

4.6 Hand pump ประกอบด้วย syringe ขนาด 20 ml และ plunger

4.7 LC Fluorescence detector with Postcolumn derivatization system

4.8 Screw-capped vial สีชา ขนาด 2 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Solvents: CH_3OH, LC grade, CH_3CN, LC grade และ H_2OType I: Reagent grade มีค่า resistivity ระหว่าง 10-18 MΩ-cm

5.2 Extraction solvent: CH_3OH-H_2O (7+3)

5.3 NaCl, AR

5.4 LC mobile phase: H_2O-CH_3CN-CH_3OH (3+1+1), degas

5.5 Post column reagent: ละลาย iodine 100 mg ใน CH_3OH 2 ml แล้วเติม H_2O 200 ml กวน (ใช้ magnetic stirrer) นาน 1 hr กรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 µm

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 นำตัวอย่าง (เมล็ดข้าวโพด หรือถั่วลิสง) 1-2 kg มาบดปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องมือที่เหมาะสม เช่น blendor, rotary cutter หรือ ultracentrifuge mill เป็นต้น ให้ได้ผงตัวอย่างมีความละเอียดขนาด < 1 mm

6.2 เก็บตัวอย่างที่บดปั่นแล้วที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C เมื่อไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทันที

6.3 นำตัวอย่างมาวางไว้จนถึงอุณหภูมิห้องก่อนทำการวิเคราะห์

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่าง 25 g ลงใน blender jar เติม NaCl 5 g และ extraction solvent 125 ml ปั่นด้วยความเร็วสูงนาน 2 min กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง แล้วปิเปต filtrate ที่ได้ 15 ml ลงใน glass-stopper Erlenmeyer flask ขนาด 100 ml เติม H_2O 30 ml ปิดจุกแล้วผสมให้เข้ากัน

7.2 กรองสารผสมที่ได้ผ่าน glass microfiber paper, filtrate ที่ได้ต้องใส ถ้าไม่ใสให้กรองซ้ำ รีบนำสารที่ได้ไปผ่าน column ขั้นตอนการกรองและผ่าน column ต้องใช้เวลาไม่เกิน 30 min

7.3 การทำให้บริสุทธิ์

7.3.1 ตัดปลายจุกสีน้ำเงิน (top cap) จาก Aflatest P column ใช้เป็นส่วนต่อระหว่าง column และ syringe ที่ใช้เป็น sample reservoir

7.3.2 ปิเปต filtrate ที่กรองผ่าน glass microfiber paper 15 ml ลงใน reservior เติมอากาศใน hand pump แล้วต่อกับ sample reservior เปิดจุกที่ปลายล่าง (end cap) ของ column กด hand pump ให้สารสกัดผ่าน column ด้วย flow rate ประมาณ 2 หยดต่อวินาที หรือ 6 ml/min จนสารสกัดผ่าน column จนหมด แล้วกดให้อากาศผ่าน column ประมาณ 2-3 ml

7.3.3 ล้าง column ด้วยน้ำ 10 ml 2 ครั้ง แล้วกดให้อากาศผ่าน column ประมาณ 2-3 ml

7.3.4 elute column ด้วย CH_3OH ปริมาตร 1.0 ml เก็บ eluate ใน screw-capped vial สีชาขนาด 2 ml

7.4 การหาปริมาณด้วย HPLC

สภาวะเครื่องมือที่ใช้

mobile phase:	CH_3CN-CH_3OH-H_2O (16+24+60)
analytical column:	Ultracarb C_8, 5 µm, 150 × 4.6 mm id
guard column:	C_8, 5 µm, 12.5 × 4.6 mm id
column oven:	40°C
postcolumn reactor:	70°C
flow rate:	mobile phase 1.0 ml/min; post column reagent 0.3 ml/min
injection:	10 µL
detector:	Fluorescence, Ex 360 nm, Em 440 nm

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ } (\mu g/kg) = \text{ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน } (ng/ml) \times \frac{\text{ปริมาตรสุดท้าย (ml)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

$$\text{น้ำหนักของตัวอย่าง} = 25\ g \times \frac{15\ ml}{45\ ml} \times \frac{15\ ml}{125\ ml}$$

$$= 1\ g$$

8.2 การรายงานผล

Aflatoxins คือ ผลรวมปริมาณ aflatoxins B1, B2, G1 and G2 หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (µg/kg)

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ก่อนใช้งานทุก Lot ของ Immunoaffinity column – Afla P test ให้ตรวจสอบข้อมูล % Recovery ของ B1, B2, G1 และ G2 ที่ระบุใน Certificate of Analysis ของ Lot นั้นต้องเท่ากับหรือมากกว่า 90%, 80%, 90% และ 60% ตามลำดับ

9.2 ก่อนใช้งานทุก Lot ของ Immunoaffinity column – Afla P test ให้ตรวจสอบประสิทธิภาพของ column โดยผ่านสารละลายมาตรฐานที่มี 25 ng B_1, 5 ng B_2, 15 ng G_1 และ 5 ng G_2 ใน CH_3OH-H_2O (1 + 9) 15 ml %Recovery ที่ได้ต้องเท่ากับหรือมากกว่า 90%, 80%, 90% และ 60% ตามลำดับ

9.3 วิเคราะห์ spiked matrix ที่ระดับความเข้มข้นของ total aflatoxin ประมาณ 10 µg/kg เพื่อประเมิน %Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดย %Recovery (total aflatoxin) ต้องอยู่เกณฑ์ยอมรับ 60-115%

10. รายละเอียดอื่น

ข้อมูล Interlaboratory study results ปรากฏในตาราง

ตารางแสดง Interlaboratory study results for aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter

Food	Added (ng/g)	s_r	RSD_r,%	s_R	RSD_R,%	HorRat
Corn	10			3.66	50.77	1.60
	20			0.78	4.63	0.16
	30	1.79	7.31	2.86	11.68	0.43
Raw peanuts	10			4.06	47.26	1.49
	20	0.83	0.53	2.58	16.15	0.57
	30			9.64	35.55	1.32
Peanut butter	10	1.45	17.22	2.54	30.17	0.95
	20			3.74	23.06	0.81
	30			5.07	21.74	0.81

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา
สำหรับการวิเคราะห์อาหาร
ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

1.	นายปรีชา จึงสมานุกูล	ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)
2.	นางลดาวัลย์ จึงสมานุกูล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
3.	นางดวงดาว วงศ์สมมาตร์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
4.	นางลดาพรรณ แสงคล้าย	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
5.	นางสาวอุรารัตน์ วุฒิกรภัณฑ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
6.	นางอัชฌา สัจจปาละ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
7.	นางสาวกมลวรรณ กันแต่ง	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 2001	อาหาร	*Bacillus cereus*	I	111
DMSc F 2002	อาหาร	*Clostridium perfringens*	I	131
DMSc F 2003	อาหาร	*Listeria* spp. *Listeria monocytogenes*	I	147
DMSc F 2004	อาหาร	*Salmonella* spp.	I	161
DMSc F 2005	น้ำและน้ำแข็ง	*Salmonella* spp.	I	177
DMSc F 2006	อาหาร	*Staphylococcus aureus*	I	191
DMSc F 2007	น้ำและน้ำแข็ง	*Staphylococcus aureus*	I	207
DMSc F 2008	นมและผลิตภัณฑ์นม	*Cronobacter sakasakii*	I	221

DMSc F 2001: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหาร
Analytical Method of *Bacillus cereus* in Food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative references)

2.1 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001; updated 2012, Chapter 14 *"Bacillus cereus"*. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 19 เมษายน 2556]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm.

2.2 Parry, J.M., P.C.B. Turnbull and J.R. Gibson. A Colour Atlas on *Bacillus* species: Wolfe Medical Publication Ltd; 1988. p. 30.

2.3 Niall A. Logan, Tanja Popovic, Alex Hoffmaster. *Bacillus* and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In: Patrick R. Murray, editor in chief. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, D.C.; chapter 32, p. 455-473.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 AnO_2	=	Anaerobic condition (สภาวะไร้ออกซิเจน)
3.2 *B. cereus*	=	*Bacillus cereus*
3.3 *B. thuringiensis*	=	*Bacillus thuringiensis*
3.4 *B. anthracis*	=	*Bacillus anthracis*
3.5 *B. mycoides*	=	*Bacillus mycoides*
3.6 *B. weihenstephanensis*	=	*Bacillus weihenstephanensis*

4. หลักการ (Principle)

B. cereus group ได้แก่ *B. cereus, B. thuringiensis, B. anthracis, B. mycoides* และ *B. weihenstephanensis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สามารถใช้น้ำตาล mannitol สามารถย่อย lecithin ในไข่แดงได้

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) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี

4.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate

นำตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง นำไปบ่ม นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันทางชีวเคมี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Bacara agar

5.1.2 Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar

5.1.3 Motility medium

5.1.4 Nitrate broth

5.1.5 Nutrient agar (NA)

5.1.6 Phenol red glucose broth

5.1.7 Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

5.1.8 Trypticase soy-polymyxin broth (TSB-P)

5.1.9 Trypticase soy-sheep blood agar (TS-SBA)

5.1.10 Tyrosine agar

5.1.11 Voges-Proskauer (VP) medium (Modified)

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

5.2 สารเคมี

5.2.1 Basic fuchsin staining solution หรือ TB carbolfuchsin ZN staining solution

5.2.2 Carbol fuchsin staining solution (0.1%)

5.2.3 Creatine crystals

5.2.4 Gram stain reagents

5.2.5 Malachite green staining solution (5%)

5.2.6 Nitrite detection reagents

5.2.7 VP test reagents

5.2.8 Zinc dust

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 ตู้อบเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic incubator) 35 ± 2°C หรือ anaerobic jar

6.1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 118 ± 3°C และ 121 ± 3°C

6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.5 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 30 ± 2°C และ 35 ± 2°C

6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44 - 50°C

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 แท่งแก้วงอ (glass spreader)

6.2.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.6 ปิเปต (pipette)

6.2.7 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial ten fold) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจางดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นหรือเครื่องตีผสมอาหาร 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10

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): ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ใน TSB-P ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 หลอด

7.3.2 บ่มที่ 30°C 48 ± 2 ชั่วโมง

7.3.3 กรณีที่หลอดขุ่น ให้ขีดบนจานเพาะเชื้อ MYP agar หรือ Bacara agar

7.3.4 บ่มที่ 30°C 18-24 ชั่วโมง

7.3.5 เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะอย่างน้อย 5 โคโลนี ลงบน NA slant

- MYP agar โคโลนีสีชมพูมี zone ขุ่น
- Bacara agar โคโลนีสีส้มอมชมพูมี zone ขุ่น

ถ้าปฏิกิริยาหรือโคโลนีลักษณะเฉพาะไม่ชัดเจน บ่มเพิ่ม 24 ชั่วโมง

7.3.6 บ่มที่ 30°C 24 ชั่วโมง นำไปตรวจยืนยันต่อไป

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 3 แผนภูมิที่ 2

7.4.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้า MYP agar หรือ Bacara agar จำนวน 3 จานเพาะเชื้อ (0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) ต่อระดับความเจือจาง กรณีที่คาดว่าตัวอย่างมี *B. cereus* จำนวนมากกว่า 10^3/กรัม ปิเปตสารละลายตัวอย่างลงบนผิวหน้า MYP agar หรือ Bacara agar จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ (0.1 และ 0.1 มิลลิลิตร) ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง

7.4.2 บ่มที่ 30°C 18 – 24 ชั่วโมง

7.4.3 นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 15–150 โคโลนี

♦ MYP agar โคโลนีสีชมพู มี zone ขุ่น

♦ Bacara agar โคโลนีสีส้มอมชมพู มี zone ขุ่น

ถ้าปฏิกิริยาหรือโคโลนีลักษณะเฉพาะไม่ชัดเจน บ่มเพิ่ม 24 ชั่วโมง ก่อนนับจำนวน

7.4.4 เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.4.3 อย่างน้อย 5 โคโลนี ลงบน NA slant

7.4.5 บ่มที่ 30°C 24 ชั่วโมง นำไปตรวจยืนยันต่อไป

7.5 การตรวจยืนยัน *B. cereus*: ภาคผนวก 4 แผนภูมิที่ 3 และภาคผนวก 6 ตารางที่ 1

7.5.1 เขี่ยเชื้อจาก NA slant (ข้อ 7.3.6 หรือ 7.4.5) ย้อมสีแกรม

♦ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปท่อน ขนาดใหญ่ มักต่อกันเป็นสายสั้นหรือยาว สร้างสปอร์รูปไข่ (ellipsoidal) ตำแหน่งตรงกลางเซลล์ (central) หรือปลายเซลล์ (subterminal) ลักษณะสปอร์ภายในเซลล์ไม่บวม

7.5.2 การตรวจยืนยันเบื้องต้น

นำเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะบน NA slant จากข้อ 7.3.6 หรือ 7.4.5 จำนวน 1 loop ผสมกับสารละลายสำหรับเจือจาง 0.5 มิลลิลิตร ทดสอบดังนี้

♦ Phenol red glucose broth

บ่ม AnO_2 ที่ 35°C 24 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงไม่เปลี่ยนสี

B. cereus ให้ผลบวก เนื่องจาก *B. cereus* เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนและสร้างกรดจากน้ำตาล glucose

♦ Nitrate broth

บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง ทดสอบหา nitrite โดยเติม nitrite detection reagents A และ C อย่างละ 0.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลบวก: เกิดสีส้มภายใน 10 นาที

ผลลบ: สีไม่เปลี่ยนแสดงว่า nitrate อาจไม่ถูกรีดิวซ์หรือถูกรีดิวซ์จนกลายเป็นแก๊สไนโตรเจน ทดสอบต่อโดยเติม zinc dust ถ้าเกิดสีส้มแสดงว่า nitrate ไม่ถูกรีดิวซ์ อ่านผลเป็นลบถ้ายังคงไม่มีสีแสดงว่า nitrate ถูกรีดิวซ์เป็นแก๊ส อ่านผลเป็นบวก

B. cereus ให้ผลบวก เนื่องจาก *B. cereus* รีดิวซ์ nitrate เป็น nitrite หรือแก๊สไนโตรเจน *B. cereus* บางสายพันธุ์ (ส่วนน้อย) ให้ผลลบ

♦ Modified VP medium

บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง แบ่ง modified VP medium มา 1 มิลลิลิตร เติม alpha-naphthol solution 0.6 มิลลิลิตร และ 40% potassium hydroxide 0.2 มิลลิลิตร เขย่าหลอดและเติม creatine crystals เล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีม่วง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

B. cereus ให้ผลบวก เนื่องจากสร้าง acetylmethyl-carbinol จากน้ำตาล glucose ซึ่งเมื่อเติม VP test reagents ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี

♦ Tyrosine agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง (กรณีที่ผลเป็นลบให้บ่มต่อจนครบ 7 วัน)

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อใส (clear) บริเวณที่เชื้อเจริญ

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง

B. cereus ให้ผลบวกเนื่องจากย่อยสลาย tyrosine

7.5.3 การตรวจเพื่อจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group: ภาคผนวก 5 แผนภูมิที่ 4 และภาคผนวก 6 ตารางที่ 2

นำเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะบน NA slant จากข้อ 7.3.6 หรือ 7.4.5 จำนวน 1 loop ผสมกับสารละลายสำหรับเจือจาง 0.5 มิลลิลิตร ทดสอบเพิ่ม ดังนี้

♦ motility test

stab ลงใน motility medium บ่มที่ 30°C 18-24 ชั่วโมง

ผลบวก: เชื้อเจริญแผ่ออกจากแนว stab

ผลลบ: เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab

B. cereus ส่วนใหญ่ให้ผลบวก สายพันธุ์ของ *B. cereus* ส่วนน้อยให้ผลลบ

♦ rhizoid growth

นำเชื้อ 1 loop แตะบนผิวหน้าบริเวณกลางจานเพาะเชื้อ NA (dry plate ที่อุณหภูมิห้องล่วงหน้า 1-2 วัน) บ่มที่ 30°C 48-72 ชั่วโมง

ผลบวก: เชื้อเจริญแผ่ออกเป็นเส้นคล้ายรากไม้ยาวหลายเซนติเมตร

ผลลบ: เชื้อเจริญเฉพาะบริเวณที่แตะ

B. cereus ให้ผลลบ

B. mycoides ส่วนใหญ่ให้ผลบวก

♦ hemolysis activity

นำเชื้อ 1 loop แตะบนผิวหน้าจานเพาะเชื้อ TS-SBA บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง

ผลบวก: เกิดโซนใส (β-hemolysis) รอบ ๆ โคโลนี

ผลลบ: ไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนี

B. cereus ให้ผลบวก เนื่องจากสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (strong β-hemolysis) ขนาด 2-4 มิลลิเมตร

♦ endotoxin crystals หรือ protein toxin crystals

นำเชื้อบน NA slant จากข้อ 7.3.6 หรือ 7.4.5 บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน ย้อมดู endotoxin crystals (ภาคผนวก 7) ในกรณีที่ไม่พบ free spore ให้บ่มต่ออีก 2-3 วัน และย้อมดู endotoxin crystals ซ้ำอีกครั้ง

ผลบวก: พบ endotoxin crystals
รูปร่างของ crystal ที่พบบ่อยเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคล้ายเพชร (diamond-shaped)

ผลลบ: ไม่พบ endotoxin crystals

B. cereus ให้ผลลบ

B. thuringiensis ส่วนใหญ่ให้ผลบวก

♦ การเจริญที่ 43°C

นำเชื้อขีดบนจานเพาะเชื้อ TSA บ่มที่ 43°C 4 วัน

ผลบวก: เชื้อเจริญ

ผลลบ: เชื้อไม่เจริญ

B. cereus เจริญที่ 43°C

B. weihenstephanensis ไม่เจริญที่ 43°C

8. การคำนวณปริมาณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันพบว่าเป็น *B. cereus* บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น *B. cereus* ไปคูณจำนวนที่นับได้และคูณ 1/d (d = dilution factor = ระดับความเจือจางแรกของการนับจำนวน) ตัวอย่างเช่น การตรวจโดยใช้ปริมาตรตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} นับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้ 65 โคโลนี สุ่ม 5 โคโลนี และตรวจยืนยันว่าเป็น *B. cereus* 4 โคโลนี ดังนั้นสัดส่วนเท่ากับ 4/5

จำนวน *B. cereus* CFU/กรัมหรือมิลลิลิตร = (โคโลนีที่นับได้ × สัดส่วน) × 1/d × 10

= (65 × 4/5) × 10,000 × 10 = 5,200,000

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

B. cereus/น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) รายงานเป็น

9.2.1 จำนวน *B. cereus* CFU/น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2.2 กรณีไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะหรือยืนยันแล้วไม่ใช่ *B. cereus*

- ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร
  รายงานเป็น น้อยกว่า 1 × ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ
- ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 0.1 มิลลิลิตร

รายงานเป็น น้อยกว่า 1 × ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ × 10

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1	ภาคผนวก 1:	อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)
10.2	ภาคผนวก 2:	แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *B. cereus* ในอาหาร
10.3	ภาคผนวก 3:	แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) *B. cereus* ในอาหาร โดยวิธี spread plate
10.4	ภาคผนวก 4:	แผนภูมิที่ 3 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *B. cereus*
10.5	ภาคผนวก 5:	แผนภูมิที่ 4 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group
10.6	ภาคผนวก 6:	ตารางที่ 1 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *B. cereus* ตารางที่ 2 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group
10.7	ภาคผนวก 7:	วิธีย้อม endotoxin crystals

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Bacara agar ใช้ชนิดสำเร็จรูป

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

   2.1 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) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อ 121°C 15 นาที

   2.2 Diluent

ปิเปต stock solution (ข้อ 2.1) 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปิเปตใส่หลอดทดลองหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

3. Mannitol–egg yolk–polymyxin (MYP) agar

   3.1 base medium

Beef extract	1	กรัม
Peptone	10	กรัม
Mannitol	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
Phenol red (1% solution in 95% ethanol)	2.5	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	900	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 900 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

3.2 0.1% Polymyxin B solution

ละลาย 500,000 units polymyxin B sulfate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 50 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4°C

3.3 50% Egg yolk emulsion

ล้างเปลือกไข่สดให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol 1 ชั่วโมง ตอกไข่ด้วยวิธี aseptic technique นำส่วนของไข่แดงใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ผสม sterile 0.85% saline ในปริมาตรที่เท่ากัน

การใช้งาน

เติม 0.1% Polymyxin B solution (ข้อ 3.2) 2.5 มิลลิลิตร และ 50% Egg yolk emulsion 12.5 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 3.1) 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

4. Motility medium

Trypticase	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Agar	3	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายแบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2 เก็บที่อุณหภูมิห้อง 2 วันก่อนนำไปใช้งาน

5. Nitrate broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
KNO_3	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

6. Nutrient agar (NA)

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

7. 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 มิลลิลิตร ของ 0.25% solution)	0.018	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 118°C 10 นาที pH 7.4 ± 0.2

8. 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 ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

9. Trypticase soy-polymyxin broth (TSB-P)

9.1 Trypticase (Tryptic) soy broth (TSB)

Trypticase peptone	17	กรัม
Phytone peptone	3	กรัม
NaCl	5	กรัม

K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

9.2 0.15% polymyxin B solution

ละลาย 500,000 units polymyxin B sulfate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปราศจากเชื้อ 33.3 มิลลิลิตร นำไปกรอง เก็บที่มืด อุณหภูมิ 4°C

การใช้งาน

ปิเปต 0.15% Polymyxin B solution (ข้อ 9.2) 0.1 มิลลิลิตร ลงใน TSB (ข้อ 9.1) 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

10. Trypticase soy-sheep blood agar (TS-SBA)

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2 ปล่อยให้เย็นประมาณ 50°C เติมเลือดแกะ 5% ผสมให้เข้ากัน ปิเปต 15 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ

11. Tyrosine agar

11.1 Base (Nutrient agar)

Beef extract	0.3	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Agar	1.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

11.2 Tyrosine suspension

L-tyrosine	0.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	10	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

การใช้งาน

เติม tyrosine suspension (ข้อ 11.2) 10 มิลลิลิตร ลงใน base ที่อุณหภูมิ 48°C (ข้อ 11.1) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการพลิกขวด 2-3 ครั้ง แบ่งใส่หลอดทดลอง นำไปวางเอียง (slant) ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการตกตะกอนของ tyrosine

12. Voges - Proskauer (VP) medium (Modified)

Proteose peptone	7	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10 นาที pH 6.5 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Basic fuchsin staining solution

Basic fuchsin dye	0.5	กรัม
95% Ethanol	20	มิลลิลิตร

ละลาย Basic fuchsin dye ใน 95% Ethanol 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.31 และสามารถใช้สี TB Carbolfuchsin ZN staining solution (สำเร็จรูป) แทนสี Basic fuchsin staining solution ได้

2. Carbol fuchsin staining solution (0.1%)

Carbol fuchsin dye	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Carbon fuchsin dye ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. Creatine crystals ใช้ชนิดสำเร็จรูป

4. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. Malachite green staining solution (5%)

Malachite green	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบและกรองด้วยกระดาษกรอง

6. Nitrite detection reagents

A. Sulfanilic acid reagent

Sulfanilic acid	1	กรัม
5 N acetic acid	125	มิลลิลิตร

ละลาย sulfanilic acid ใน 5 N acetic acid

C. α-Naphthol reagent

α-Naphthol	1	กรัม
5 N acetic acid	200	มิลลิลิตร

ละลาย α-Naphthol ใน 5 N acetic acid

เตรียม 5 N acetic acid โดยเติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 71.25 มิลลิลิตร

7. Voges-Proskauer (VP) test reagents

a. Solution 1

α-naphthol	5	กรัม
Alcohol (absolute)	100	มิลลิลิตร

ละลาย α-naphthol ใน alcohol

b. Solution 2

Potassium hydroxide	40	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลาย potassium hydroxide ในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

8. Zinc dust

ภาคผนวก 2

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

↓ 1 มิลลิลิตร

15 มิลลิลิตร TSB-P ระดับความเจือจางละ 2 หลอด

↓ $30^{o}C$ 48 ± 2 ชั่วโมง

MYP agar หรือ Bacara agar

↓ $30^{o}C$ 18-24 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ

↓

เขี่ยเชื้ออย่างน้อย 5 โคโลนี/จานเพาะเชื้อ ลงบน NA slant

↓ $30^{o}C$ 24 ชั่วโมง

ตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี (ภาคผนวก 4, 5)

↓

รายงานผล

แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *B. cereus* ในอาหาร

ภาคผนวก 3

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

↓ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร
หรือ 0.1, 0.1 มิลลิลิตร

MYP agar หรือ Bacara agar

↓ 30°C 18-24 ชั่วโมง

นับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ (15-150 โคโลนี)

↓

เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะอย่างน้อย 5 โคโลนี ลงบน NA slant

↓ 30°C 24 ชั่วโมง

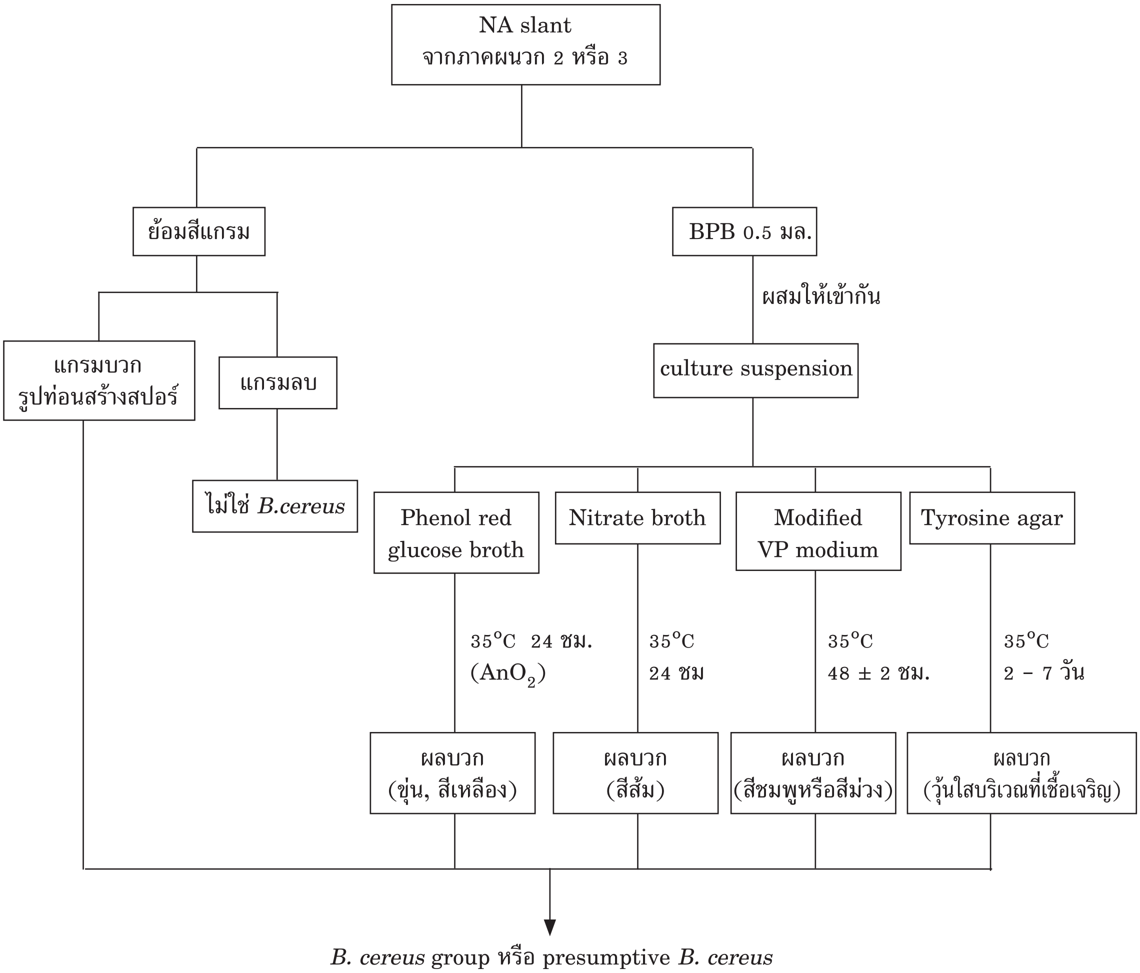
ตรวจยืนยันโดยทดสอบทางชีวเคมี (ภาคผนวก 4, 5)

↓

คำนวณและรายงานผล

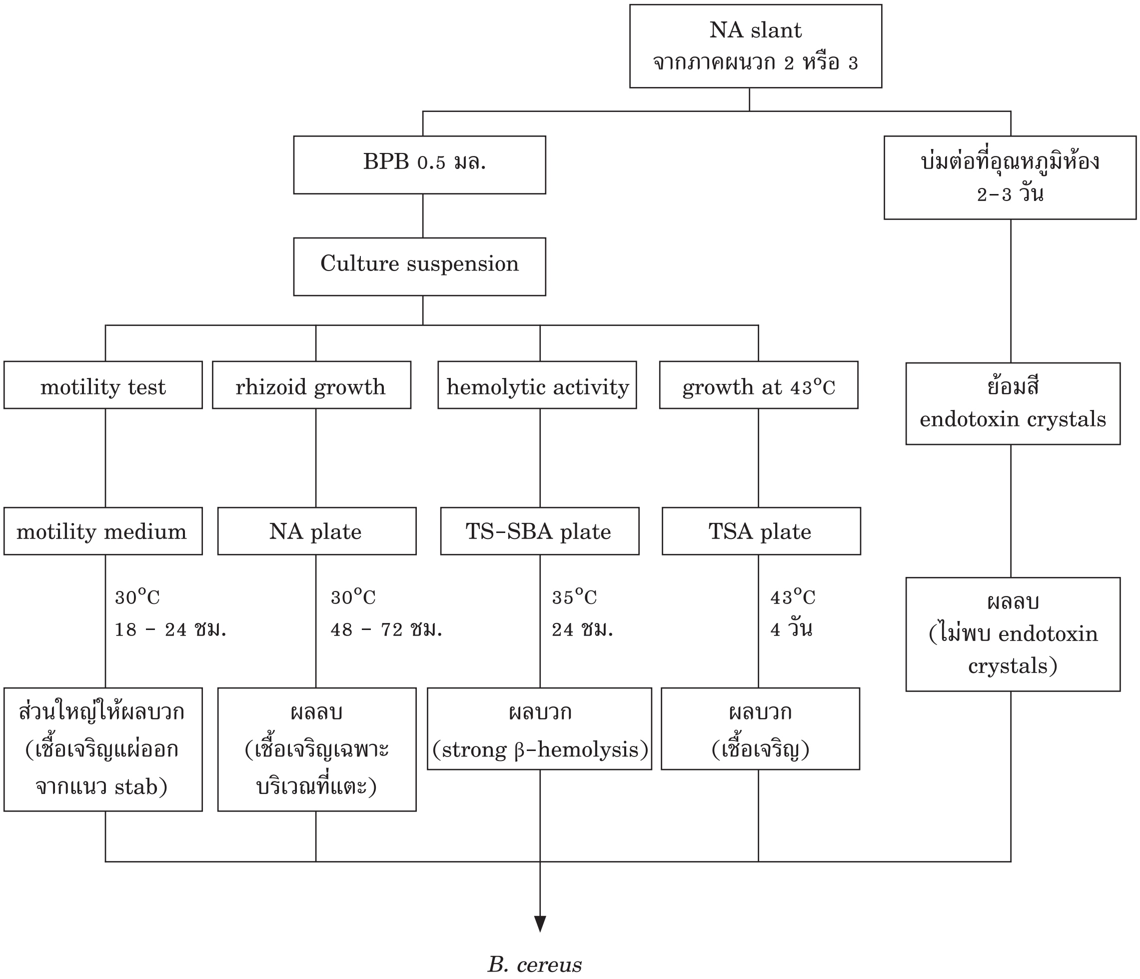
แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) *B. cereus* ในอาหาร โดยวิธี spread plate

ภาคผนวก 4



แผนภูมิที่ 3 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *B.cereus*

ภาคผนวก 5



แผนภูมิที่ 4 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group

ภาคผนวก 6

ตารางที่ 1 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *B. cereus*

Test	Reagents	Positive result	*B. cereus* group
Anaerobic utilization of glucose	-	Yellow	+
Nitrate reduction*	Nitrite detection reagents	Orange	+
VP reaction	VP test reagents	Pink or violet	+
Tyrosine decomposition	-	clearing of medium near growth	+

หมายเหตุ: 1) ถ้าทั้ง 4 รายการให้ผลบวก เป็นการยืนยันเบื้องต้นว่าพบ *B. cereus* หรือเชื้อใน *B. cereus* group

2) **B. cereus* บางสายพันธุ์ (ส่วนน้อย) ให้ผลลบกับปฏิกิริยา nitrate reduction ให้ทดสอบต่อไป

ตารางที่ 2 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group

Test	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. weihenstephanensis*	*B. anthracis*
motility	+/-	+/-	- (90-100% of strains)	+	-
rhizoid growth	-	-	+	-	-
β- hemolysis (sheep blood)	++ (strong 2-4 mm)	+ (weak)	+ (weak)	ND	- (most strains)
endotoxin crystals	-	+	-	-	-
growth at 43°C, 4 days	+	+	-	-	+

ND = Not determined

ภาคผนวก 7

วิธีย้อม endotoxin crystals

วิธีที่ 1 (เอกสารอ้างอิงข้อ 2.1)

1. smear เชื้อบนแผ่นกระจก ปล่อยให้แห้ง แล้ว fix ด้วยความร้อน
2. หยด methanol* ให้ท่วมบริเวณ smear ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที และเท methanol ออก ปล่อยให้แห้ง
3. หยด basic fuchsin staining solution หรือ TB carbolfuchsin ZN staining solution ให้ท่วม ลนใต้แผ่นกระจกด้วยไฟอ่อน ๆ จนเห็นไอระเหย
4. รอ 1-2 นาที จากนั้นหยด basic fuchsin staining solution หรือ TB carbolfuchsin ZN staining solution ซ้ำ และทำตามข้อ 3
5. ตั้งแผ่นกระจกทิ้งไว้ 30 วินาที เทสีออก และล้างแผ่นกระจกโดยนำไปผ่านน้ำประปา ปล่อยให้แห้ง
6. ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ภายใต้ oil immersion

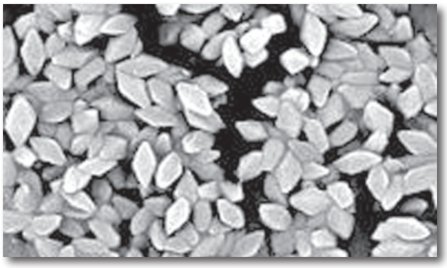
วิธีที่ 2 (เอกสารอ้างอิงข้อ 2.2)

1. smear เชื้อบนแผ่นกระจก ปล่อยให้แห้ง แล้ว fix ด้วยความร้อน
2. หยด malachite green staining solution (5%) ให้ท่วมบริเวณ smear
3. ลนใต้แผ่นกระจกด้วยเปลวไฟอ่อน ๆ หรืออังด้วยไอน้ำ จนขอบของหยดสีเริ่มแห้ง
4. หยด malachite green staining solution (5%) ซ้ำ และทำตามข้อ 3
5. ล้างสีเขียวออกโดยผ่านน้ำประปาแล้วซับให้แห้ง
6. ย้อมทับด้วย carbol fuchsin staining solution (0.1%) นาน 30 วินาที
7. ล้างแผ่นกระจกโดยนำไปผ่านน้ำประปา ซับหรือปล่อยให้แห้ง
8. ส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ภายใต้ oil immersion

การอ่านผล

วิธีที่ 1 สปอร์ไม่ติดสีและ endotoxin crystals ติดสีแดง

วิธีที่ 2 สปอร์ติดสีเขียว และ endotoxin crystals ติดสีชมพูเข้ม รูปร่างของ crystals ที่พบบ่อยเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมคล้ายเพชร (diamond-shaped)



หมายเหตุ * ระวังไม่ให้ methanol สัมผัสมือและไอระเหยของ methanol เป็นอันตรายต่อดวงตา

DMSc F 2002: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร
Analytical Method of *Clostridium perfringens* in Food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection) และการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001, Chapter 16 "*Clostridium perfringens*". [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 19 เมษายน 2556]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070878.htm.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 AnO_2	=	Anaerobic condition (สภาวะไร้ออกซิเจน)
3.2 *C. perfringens*	=	*Clostridium perfringens*

4. หลักการ (Principle)

C. perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) สามารถย่อย lecithin และ gelatin สามารถใช้น้ำตาล lactose และรีดิวซ์ nitrate ได้

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) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี

4.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) มี 2 วิธี คือ

4.2.1 วิธี pour plate

นำตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่ม นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี

4.2.2 วิธี spread plate

นำตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง นำไปบ่มนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Cooked meat medium (CMM) (modified)

5.1.2 Lactose-gelatin medium (for *C. perfringens*)

5.1.3 Motility-nitrate medium, buffered (for *C. perfringens*)

5.1.4 Spray's fermentation medium (for *C. perfringens*) (1% raffinose และ 1% salicin)

5.1.5 Thioglycollate medium (fluid) (FTG)

5.1.6 Tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar

5.1.7 Tryptose-sulfite-cycloserine containing egg yolk (TSC-EY) agar

5.1.8 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ได้แก่ 0.1% peptone water

5.2 สารเคมี

5.2.1 0.04% Bromthymol blue

5.2.2 Gram stain reagents

5.2.3 Nitrite detection reagents

5.2.4 TSC Supplement/D-cycloserine

5.2.5 Zinc dust

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 ตู้อบเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic incubator) 35 ± 1°C หรือ anaerobic jar

6.1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.5 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 35 ± 1°C

6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.7 ตู้เย็น (refrigerator)

6.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.9 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44 - 50°C

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.5 ปิเปต (pipette)

6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตามลำดับลำดับละ 10 เท่า (serial ten fold) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นหรือเครื่องตีผสมอาหาร 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10

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): ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตรใส่ใน CMM (Modified) (ที่เตรียมใหม่ ๆ หรือต้มไล่อากาศ 10 นาที) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 หลอด

7.3.2 บ่มที่ 35°C 24-48 ชั่วโมง

7.3.3 เขี่ยเชื้อจากก้นหลอดของแต่ละหลอด CMM (modified) ที่มีเชื้อเจริญ (ขุ่น) ขีดบนจานเพาะเชื้อ TSC-EY agar ห้ามเขย่าหลอด

7.3.4 บ่ม AnO_2 ที่ 35°C 24 ชั่วโมง

7.3.5 เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ 3-5 โคโลนี นำไปตรวจยืนยันต่อไป

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ สีเทาอมเหลือง มีโซนขุ่นรอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิลิตร

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate: ภาคผนวก 3 แผนภูมิที่ 2

7.4.1 ปิเปต TSC agar 6-7 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ และหมุนให้ TSC agar กระจายทั่ว ปล่อยให้แข็ง

7.4.2 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้า TSC agar ตรงกลางจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 7.4.1 ระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ

- ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 ลงใน CMM (modified) ที่เตรียมใหม่หรือต้มไล่อากาศ 10 นาที จำนวน 2 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร

7.4.3 เท TSC agar ประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปล่อยให้วุ้นแข็ง

7.4.4 บ่มจานเพาะเชื้อ AnO_2 ที่ 35°C 20-24 ชั่วโมง และบ่ม CMM (modified) ที่ 35°C 24-48 ชั่วโมง

7.4.5 นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-200 โคโลนี

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ สีดำ

  กรณีที่ไม่มีเชื้อลักษณะเฉพาะบนจานเพาะเชื้อ ให้นำเชื้อจาก CMM (modified) ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC-EY agar บ่ม AnO2 ที่ 35°C 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ สีเทาอมเหลือง มีโซนขุ่นรอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิลิตร

7.4.6 เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.4.5 ที่มีลักษณะเฉพาะ 10 โคโลนี นำไปตรวจยืนยันต่อไป (กรณีนำเชื้อจาก CMM (modified) ให้เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะอย่างน้อย 1 โคโลนี)

7.4.7 กรณีที่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะน้อยกว่า 10 โคโลนี ให้ทดสอบยืนยันทุกโคโลนี

7.5 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 4 แผนภูมิที่ 3

7.5.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้า TSC-EY agar 3 จานเพาะเชื้อ (0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) กรณีที่คาดว่าตัวอย่างมี *C. perfringens* จำนวนมาก ปิเปตลงบนผิวหน้า TSC-EY agar 2 จานเพาะเชื้อ (0.1 และ 0.1 มิลลิลิตร) ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง หลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อดูดซับตัวอย่าง (ประมาณ 5 นาที) เททับหน้าด้วย TSC agar ประมาณ 10 มิลลิลิตร รอจนวุ้นแข็งตัว

- ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 ลงใน CMM (modified) ที่เตรียมใหม่หรือต้มไล่อากาศ 10 นาที จำนวน 2 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร

7.5.2 บ่ม AnO_2 ที่ 35°C 24 ชั่วโมง (ไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ) และบ่ม CMM (modified) ที่ 35°C 24-48 ชั่วโมง

7.5.3 นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ 20-200 โคโลนี

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ สีดำ มีโซนขุ่นรอบโคโลนี
  กรณีที่ไม่มีเชื้อลักษณะเฉพาะบนจานเพาะเชื้อ ให้นำเชื้อจาก CMM (modified) ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC-EY agar บ่ม AnO_2 ที่ 35°C 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ สีเทาอมเหลือง มีโซนขุ่นรอบโคโลนี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิลิตร

7.5.4 เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.5.3 ที่มีลักษณะเฉพาะ 10 โคโลนี นำไปตรวจยืนยันต่อไป กรณีที่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะน้อยกว่า 10 โคโลนี ให้ทดสอบยืนยันทุกโคโลนี (กรณีนำเชื้อจาก CMM (modified) ให้เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะอย่างน้อย 1 โคโลนี)

7.6 การตรวจยืนยัน *C. perfringens*: ภาคผนวก 5 แผนภูมิที่ 4

7.6.1 นำเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะตามข้อ 7.3.5 หรือ 7.4.5 หรือ 7.5.3 ย้อมสีแกรม *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปท่อนสั้น ถ้าเชื้อไม่บริสุทธิ์แยกให้บริสุทธิ์บน TSC-EY agar บ่ม AnO_2 ที่ 35°C 24 ชั่วโมง โคโลนีของ *C. perfringens* มีสีเทาอมเหลือง มีโซนขุ่นรอบโคโลนี

7.6.2 ทดสอบทางชีวเคมี

7.6.2.1 นำเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะจากข้อ 7.6.1 stab ลงใน lactose-gelatin medium และ motility-nitrate medium บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง อ่านผล *C. perfringens* จะให้ผลดังนี้

♦ lactose-gelatin medium

ผลบวก:	lactose	เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเหลือง สร้างก๊าซ
	gelatin	อาหารเลี้ยงเชื้อไม่แข็งเมื่อแช่ที่อุณหภูมิ 5°C 1 ชั่วโมง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อยังไม่แข็ง ให้บ่มที่ 35°C ต่ออีก 24 ชั่วโมง และนำไปแช่เย็นที่ 5°C 1 ชั่วโมง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แข็ง ผลเป็นบวก ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ผลเป็นลบ
ผลลบ:	lactose	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง
	gelatin	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเมื่อแช่ที่อุณหภูมิ 5°C 1 ชั่วโมง

C. perfringens ให้ผล lactose และ gelatin บวก เนื่องจากสามารถใช้น้ำตาล lactose และสร้างเอนไซม์ gelatinase ได้

♦ motility-nitrate medium ทดสอบการรีดิวซ์ nitrates เป็น nitrites โดยเติม nitrite detection reagents A และ B ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลบวก:	motile	เชื้อเจริญแผ่ออกจากแนว stab
	nitrates	เกิดสีม่วงแดงภายใน 5 นาที
ผลลบ:	motile	เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab
	nitrates	สีไม่เปลี่ยน แสดงว่า nitrates อาจไม่ถูกรีดิวซ์หรือถูกรีดิวซ์จนกลายเป็นแก๊สไนโตรเจน ทดสอบต่อโดยเติม zinc dust ลงไป ถ้าเกิดสีม่วงแดงแสดงว่า nitrates ไม่ถูกรีดิวซ์ ดังนั้นผลเป็นลบถ้ายังคงไม่มีสีแสดงว่า nitrates ถูกรีดิวซ์เป็นแก๊สไนโตรเจนดังนั้นผลเป็นบวก

C. perfringens ให้ผล motile ลบ แต่ให้ผลการทดสอบ nitrates บวก

7.6.2.2 ในกรณีที่ผลไม่เป็นไปตามข้อ 7.6.2.1 ต้องทดสอบเพิ่มโดยเขี่ยเชื้อจากข้อ 7.6.1 ใส่ thioglycollate medium บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อใน thioglycollate medium ใส่ใน spray's fermentation medium (ที่ต้มไล่อากาศแล้ว) ที่มี 1% raffinose, 1% salicin และไม่มีคาร์โบไฮเดรต อย่างละ 1 หลอด โดยใส่เชื้อลงไปหลอดละ 0.1 มล. บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง ปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ หยด 0.04% bromthymol blue 1-2 หยด

กรณี 1% raffinose ให้ผลลบ ให้บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง และทดสอบอีกครั้ง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนหรือสีเหลืองอ่อน

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

C. perfringens ให้ผล raffinose บวก และ salicin ลบ แต่บางสายพันธุ์ให้ผลบวก

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันพบว่าเป็น *C. perfringens* บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น *C. perfringens* ไปคูณจำนวนที่นับได้และคูณ 1/d (d = dilution factor = ระดับความเจือจางแรกของการนับ) ตัวอย่างเช่น การตรวจโดยการใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} นับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้ 85 โคโลนี สุ่ม 10 โคโลนี และตรวจยืนยันว่าเป็น *C. perfringens* 8 โคโลนี ดังนั้นสัดส่วนเท่ากับ 8/10

จำนวน *C. perfringens* CFU/กรัม หรือมิลลิลิตร = โคโลนีที่นับได้ × สัดส่วน × 1/d

= 85 × (8/10) × 10,000 = 680,000

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

C. perfringens/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) รายงานเป็น

9.2.1 จำนวน *C. perfringens* CFU/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2.2 กรณีไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะหรือยืนยันแล้วไม่ใช่ *C. perfringens*

- ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร
  รายงานเป็น น้อยกว่า 1 × ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ
- ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 0.1 มิลลิลิตร
  รายงานเป็น น้อยกว่า 1 × ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ × 10

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

10.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *C. perfringens* ในอาหาร

10.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) *C. perfringens* ในอาหารโดยวิธี pour plate

10.4 ภาคผนวก 4: แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *C. perfringens* ในอาหารโดยวิธี spread plate

10.5 ภาคผนวก 5: แผนภูมิที่ 4 การตรวจยืนยันทางชีวเคมีของ *C. perfringens*

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Cooked meat medium (CMM) (Modified)

1.1 Cooked meat medium (CMM)

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

1.2 Diluent

Tryptone	10	กรัม
Sodium thioglycollate	1	กรัม
Soluble starch	1	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Neutral red (1% aqueous)	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ใส่ CMM (ข้อ 1.1) 1 กรัม ในหลอดทดลองฝาเกลียวเติม diluent (ข้อ 1.2) 9 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

2. Lactose-Gelatin Medium

Tryptose	15	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Phenol red (1% solution in 95% ethanol)	5	มิลลิลิตร
Gelatin	120	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย tryptose, yeast extract และ lactose ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 400 มิลลิลิตร และ gelatin ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 600 มิลลิลิตร ต้ม gelatin ที่อุณหภูมิ 50-60°C ให้ละลายผสมทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกัน ปรับ pH 7.5 ± 0.2 เติม phenol red ปิเปตใส่หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 10 นาที ถ้าไม่ใช้ภายใน 8 ชั่วโมง ต้องต้มไล่อากาศที่อุณหภูมิ 50-70°C นาน 2-3 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน

3. Motility-nitrate medium, buffered (for *C. perfringens*)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
KNO_3	1	กรัม
Na_2HPO_3	2.5	กรัม
Agar	3	กรัม
Galactose	5	กรัม
Glycerin (reagent grade)	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้น agar ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับ pH 7.3 ± 0.1 เติม agar และให้ความร้อนจน agar ละลาย ปิเปต 11 มิลลิลิตร ใส่หลอด 16 × 150 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ถ้าไม่ใช้ภายใน 4 ชั่วโมง ต้องต้มไล่อากาศในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็น

4. Spray's fermentation medium (1% raffinose และ 1% salicin)

4.1 Base medium

Tryptone	10	กรัม
Neopeptone	10	กรัม
Agar	2	กรัม
Sodium thioglycollate	0.25	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด ยกเว้น agar ปรับ pH 7.4 ± 0.2 เติม agar และให้ความร้อนจน agar ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

4.2 Sterile 10% carbohydrate solution

a) 10% raffinose

raffinose	10.0	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

b) 10% salicin

salicin	10.0	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

การใช้งาน

นำ base medium (ข้อ 4.1) 9 มิลลิลิตร (ถ้าไม่ใช้ภายใน 4 ชั่วโมง ต้องต้มไล่อากาศในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็น) เติม solution (ข้อ 4.2) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิเปตใส่หลอดทดลองตามปริมาตรที่ต้องการ

5. 0.1 % Peptone water

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

6. Thioglycollate Medium (Fluid) (FTG)

L-Cystine	0.5	กรัม
Agar (granulated)	0.75	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Dextrose	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	15	กรัม
Sodium thioglycollate or thioglycollic acid	0.5	กรัม
Resazurin, sodium solution (1:1000), fresh	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร จนละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 20 นาที pH 7.1 ± 0.2

7. Tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar

7.1 Base medium

Tryptose	15	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Soytone	5	กรัม
Ferric ammonium citrate (NF Brown Pearls)	1	กรัม
Sodium metabisulfite	1	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	900	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 900 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.6 ± 0.2

7.2 D-cycloserine solution

ละลาย D-cycloserine (white crystalline powder) 1 กรัม ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 200 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากโดยการกรอง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

การใช้งาน

ปิเปต D-cycloserine solution (ข้อ 6.2) 20 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 6.1) 250 มิลลิลิตร ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิ 50°C ผสมให้เข้ากัน เทลงจานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

8. Tryptose-sulfite-cycloserine agar containing egg yolk (TSC-EY)
   8.1 base medium (ข้อ 7.1)
   8.2 D-cycloserine solution (ข้อ 7.2)
   8.3 50% Egg yolk emulsion
   ล้างเปลือกไข่สดให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol 1 ชั่วโมง ตอกไข่ด้วยวิธี aseptic technique นำส่วนของไข่แดงใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ผสม sterile 0.85% saline ในปริมาตรที่เท่ากัน

   การใช้งาน

   เติม D-cycloserine solution (ข้อ 8.2) 20 มิลลิลิตร และ 50% Egg yolk emulsion (ข้อ 8.3) 20 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 8.1) 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเทลงจานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. 0.04% Bromthymol Blue Indicator

Bromthymol blue	0.2	กรัม
0.01 N NaOH	32	มิลลิลิตร

   ละลาย bromthymol blue ใน NaOH ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. Nitrite detection reagents
   A. Sulfanilic acid reagent

Sulfanilic acid	1	กรัม
5 N acetic acid	125	มิลลิลิตร

   ละลาย sulfanilic acid ใน 5 N acetic acid

   B. N-(l-naphthyl) ethylenediamine reagent

N-(l-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride	0.25	กรัม
5 N acetic acid	200	มิลลิลิตร

   ละลาย N-(l-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ใน 5 N acetic acid เตรียม 5 N acetic acid โดยเติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 71.25 มิลลิลิตร

4. Zinc dust

ภาคผนวก 2

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

↓ 1 มิลลิลิตร

10 มิลลิลิตร CMM (modified) ระดับความเจือจางละ 2 หลอด

↓ 35°C 24-48 ชั่วโมง

TSC-EY agar

↓ AnO_2 35°C 24 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ 3-5 โคโลนี

↓

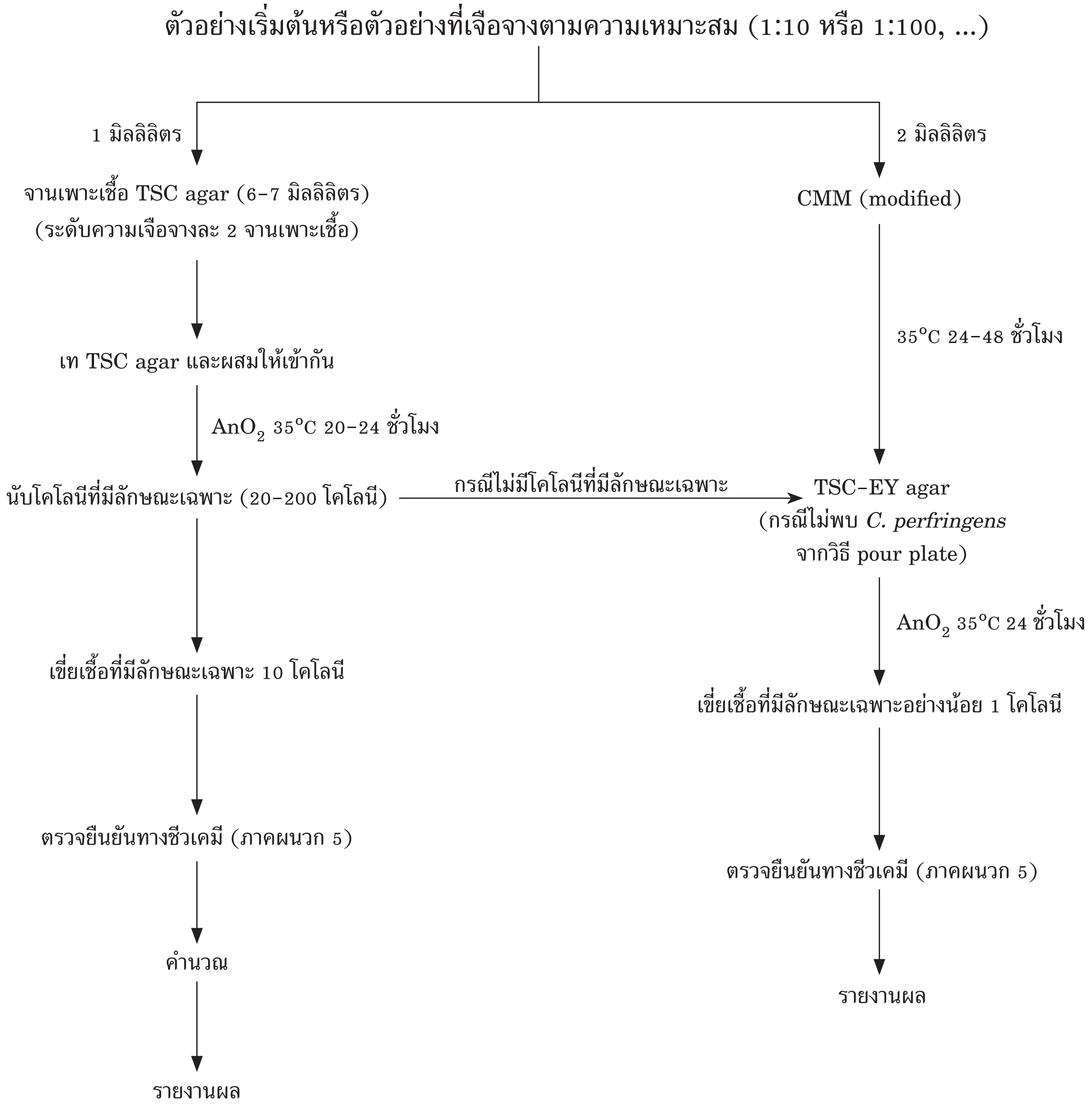
ตรวจยืนยันทางชีวเคมี (ภาคผนวก 5)

↓

รายงานผล

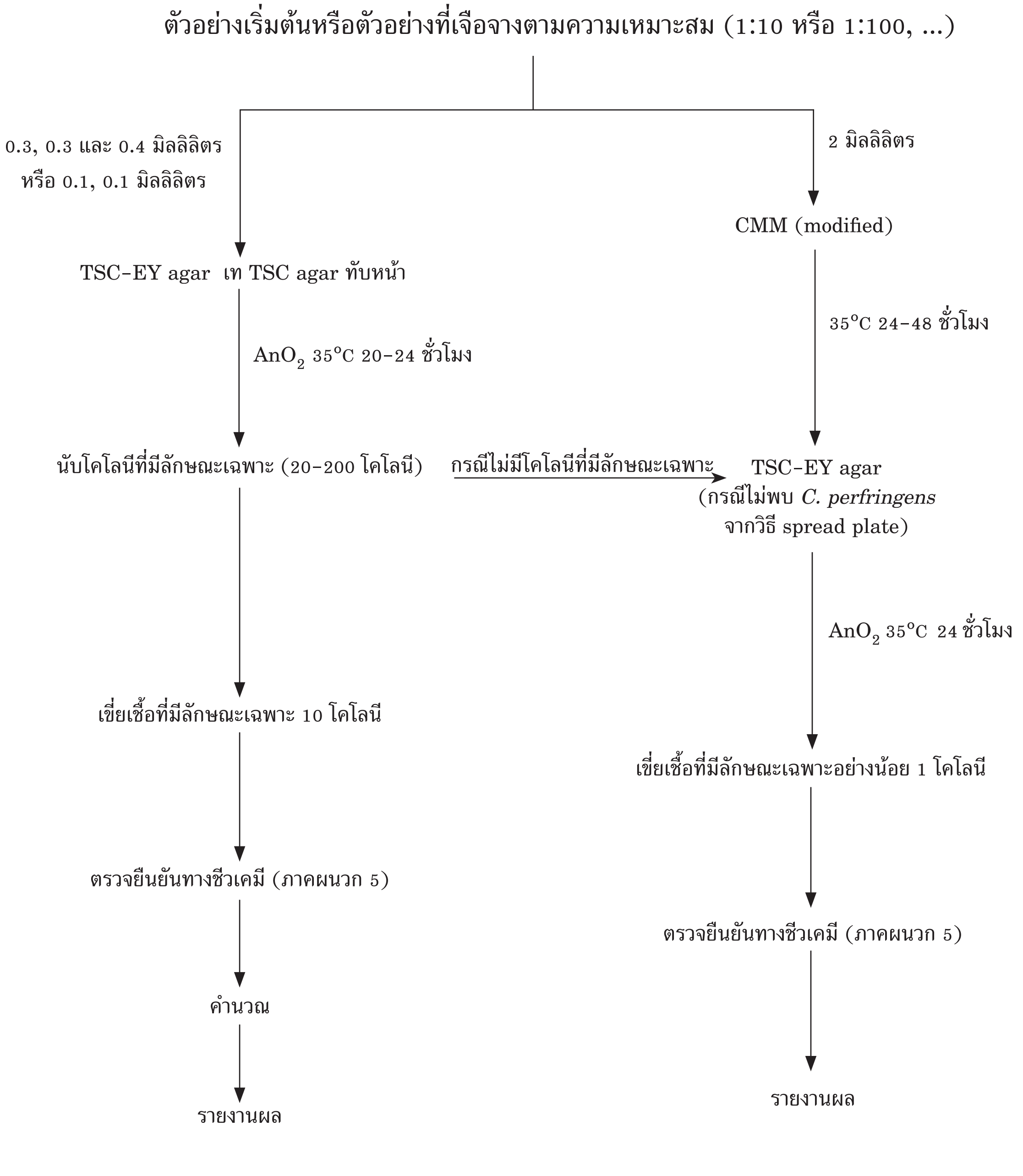
แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *C. perfringens* ในอาหาร

ภาคผนวก 3



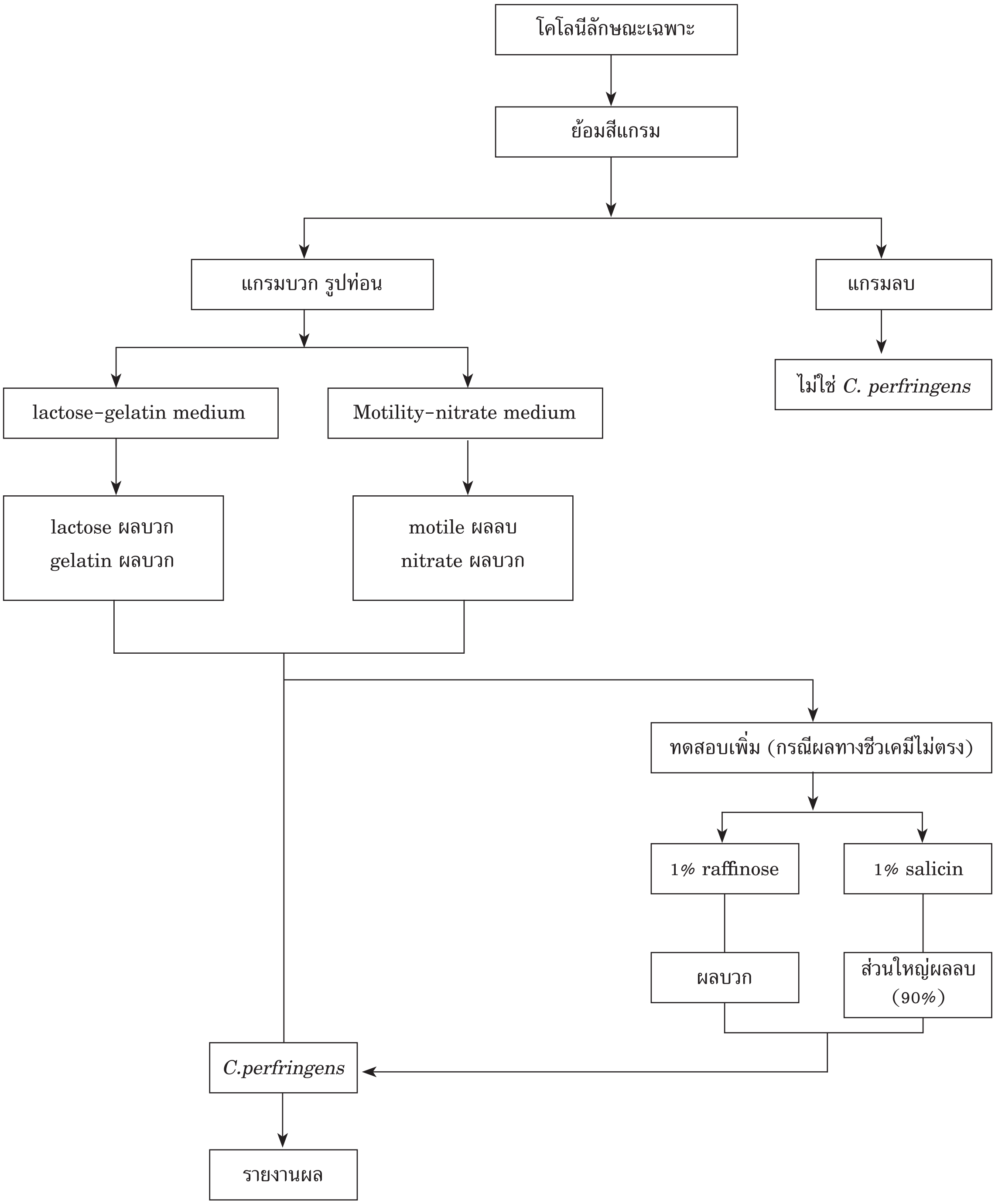
แผนภูมิที่ 2 การตรวจปริมาณ (enumeration) *C. perfringens* ในอาหารโดยวิธี pour plate

ภาคผนวก 4



แผนภูมิที่ 3 การตรวจปริมาณ (enumeration) *C. perfringens* ในอาหารโดยวิธี spread plate

ภาคผนวก 5



แผนภูมิที่ 4 การตรวจยืนยันทางชีวเคมีของ *C. perfringens*

DMSc F 2003: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร Analytical Method of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in Food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Listeria* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

2.1 ISO 11290-1: 1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 1: Detection method.

2.2 ISO 11290-1: 1996/Amd. 1: 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: Detection method/Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

2.3 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2011; updated 2013, Chapter 10 "*Listeria monocytogenes*". [ออนไลน์]. 2011; [สืบค้น 22 เมษายน 2556]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ ucm071400.htm.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1	CAMP	=	Christie, Atkins, Munch-Peterson
3.2	*L. innocua*	=	*Listeria innocua*
3.3	*L. grayi* subsp. *grayi*	=	*Listeria grayi* subspecies *grayi*
3.4	*L. grayi* subsp. *murrayi*	=	*Listeria grayi* subspecies *murrayi*
3.5	*L. ivanovii*	=	*Listeria ivanovii*
3.6	*L. monocytogenes*	=	*Listeria monocytogenes*
3.7	*L. seeligeri*	=	*Listeria seeligeri*
3.8	*L. welshimeri*	=	*Listeria welshimeri*
3.9	*R. equi*	=	*Rhodococcus equi*
3.10	*S. aureus*	=	*Staphylococcus aureus*

4. หลักการ (Principle)

Listeria spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถย่อย lecithin ในพืชได้

การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (primary enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่เติมสารยับยั้งเพียงเล็กน้อยแล้วบ่มข้ามคืน เพื่อให้ *Listeria* spp. ที่มีจำนวนน้อยหรือที่บาดเจ็บฟื้น

4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (secondary enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่นในปริมาณสูงขึ้นเพื่อให้ *Listeria* spp. ที่ฟื้นตัวสามารถเพิ่มจำนวนและเชื้ออื่นถูกยับยั้ง

4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar) 2 ชนิด

4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA) และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด

5.1.2 Carbohydrate utilization broth (rhamnose, xylose and mannitol)

5.1.3 Fraser broth

5.1.4 Half Fraser broth

5.1.5 Motility agar

5.1.6 Sheep blood agar

5.1.7 Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA)

5.2 สารเคมี

5.2.1 Gram stain reagents

5.2.2 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 25 ± 1°C, 30 ± 1°C, 35 ± 1°C และ 37 ± 1°C

6.1.3 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.5 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.6 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44 - 50°C

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.5 ปิเปต (pipette)

6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็งหรือของเหลวข้นหนืด ตัดตัวอย่างหรือเขย่าให้ทั่วจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

นำตัวอย่างที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์

7.3 การตรวจหา (detection): ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1

7.3.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (primary enrichment)

เติม half Fraser broth 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 30°C 24 ± 3 ชั่วโมง (กรณีสุ่มตัวอย่างนอกเหนือจาก 25 กรัม หรือมิลลิลิตร ให้เติม half Fraser broth เพื่อให้สัดส่วนของตัวอย่าง : half Fraser broth = 1 : 10)

7.3.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (secondary enrichment)

ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3.1 ใส่ใน Fraser broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 35°C หรือ 37°C 48 ± 3 ชั่วโมง

7.3.3 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.3.3.1 นำเชื้อ (จากข้อ 7.3.1 และ 7.3.2) ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.3.3.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง กรณีที่ไม่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีมีขนาดเล็กให้บ่มต่อ 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต)

ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Listeria* spp.

- ALOA โคโลนีสีเขียวอมฟ้า
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิตลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *L. monocytogenes*
- ALOA โคโลนีสีเขียวอมฟ้า มี zone ขุ่นทึบแสง แต่บางสายพันธุ์อาจไม่ให้ zone
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.4 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

7.4.1 การตรวจยืนยัน *Listeria* spp.

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Listeria* spp. 5 โคโลนี ขีดบนจานเพาะเชื้อ TSYEA บ่มที่ 35°C หรือ 37°C 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนี กลม นูน ขุ่น ไม่มีสี เพื่อทดสอบดังนี้

- Catalase reaction

  นำเชื้อที่แตะบนแผ่นกระจก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

  ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

  ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

  Listeria spp. ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้

- Gram staining

  Listeria spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์

- Motility test

  stab ลงใน motility agar บ่มที่ 25°C 48 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่พบการเจริญแบบร่มกาง ให้บ่มและสังเกตต่อจนครบ 5 วัน

  ผลบวก: เชื้อเจริญแผ่ออกจากแนว stab เป็นแบบร่มกาง (umbrella-like)

  ผลลบ: เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab

  Listeria spp. ให้ผลบวก

7.4.2 การตรวจยืนยัน *Listeria monocytogenes*: ภาคผนวก 3 (ตารางที่ 1)

กรณีเชื้อที่สงสัยให้ผลการทดสอบเป็น *Listeria* spp. ตามข้อ 7.4.1 ให้นำเชื้อเพื่อทดสอบดังนี้

- Haemolysis test

  แตะเชื้อที่สงสัยและเชื้อ control (*L. monocytogenes, L. ivanovii และ L. innocua*) บนผิวหน้าจานเพาะเชื้อ sheep blood agar บ่มที่ 35°C หรือ 37°C 24 ± 2 ชั่วโมง

  ผลบวก: เกิดโซนใสรอบโคโลนี

  ผลลบ: ไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนี

  การอ่านผล: เปรียบเทียบเชื้อที่ทดสอบกับเชื้อ control

  L. monocytogenes เกิดโซนใสแคบรอบโคโลนี

  L. ivanovii เกิดโซนใสกว้างรอบโคโลนี

  L. innocua ไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนี

- Carbohydrate utilization

  ทดสอบการใช้น้ำตาล rhamnose, xylose และ mannitol โดยเขี่ยเชื้อลงในน้ำตาลดังกล่าว บ่มที่ 35°C หรือ 37°C 24–48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่อจนครบ 5 วัน

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  L. monocytogenes ให้ผล rhamnose บวก แต่ให้ผลการทดสอบ xylose และ mannitol ลบ

- CAMP test: ภาคผนวก 4 รูปที่ 1

  นำ *S. aureus* และ *R. equi* ขีดเป็นแนวขนานกันบน sheep blood agar และนำเชื้อที่ต้องการทดสอบขีดตั้งฉากกับ *S. aureus* และ *R. equi* อย่าให้ชนแนวของเชื้อทั้งสอง ควรห่างประมาณ 1–2 มิลลิเมตร บ่มที่ 35°C หรือ 37°C 18–24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเสริมฤทธิ์การย่อยเม็ดเลือดแดง (β-haemolysis) ในกรณีเสริมฤทธิ์กับเชื้อใด (*S. aureus* และ *R. equi)* จะปรากฏโซนใสกว้างขึ้น

  L. monocytogenes: ส่วนใหญ่จะเสริมฤทธิ์การย่อยเม็ดเลือดแดงกับ *S. aureus* (ส่วนน้อยอาจเสริมฤทธิ์กับ *R. equi*) คือจะเห็นส่วนใสกว้างขึ้นด้าน *S. aureus*

  L. ivanovii: จะเสริมฤทธิ์การย่อยเม็ดเลือดแดงกับ *R. equi* คือจะเห็นส่วนใสคล้ายหัวลูกศร (arrow-head) ขนาดกว้าง (5–10 มิลลิเมตร) ด้าน *R. equi*

  L. innocua: ไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง

8. รายงานผลการทดสอบ (Test report)

Listeria spp./น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

L. monocytogenes/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture Media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes* ในอาหาร

9.3 ภาคผนวก 3: ตารางที่ 1 ปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ใช้ยืนยันเชื้อ *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes*

9.4 ภาคผนวก 4: รูปที่ 1 ปฏิกิริยา CAMP test ของเชื้อ *Listeria* spp.

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีการที่ผู้ผลิตระบุ

1. Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA)

1.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissues	18	กรัม
Enzymatic digest of casein	6	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium pyruvate	2	กรัม
Glucose	2	กรัม
Magnesium glycerophosphate	1	กรัม
Magnesium sulfate (anhydrous)	0.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Lithium chloride	10	กรัม
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	2.5	กรัม
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-glucopyranoside	0.05	กรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	930	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 930 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

1.2 Nalidixic acid solution

Nalidixic acid sodium salt	0.02	กรัม
Sodium hydroxide (0.05 mol/l)	5	มิลลิลิตร

1.3 Ceftazidime solution

Ceftazidime	0.02	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	5	มิลลิลิตร

1.4 Polymyxin B solution

Polymyxin B sulfate	76700	IU
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	5	มิลลิลิตร

*ขึ้นอยู่กับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

1.5 Antibiotic supplement

1.5.1 Cycloheximide solution

Cycloheximide	0.05	กรัม
Ethanol	2.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	2.5	มิลลิลิตร

1.5.2 Amphotericin B solution

Amphotericin B	0.01	กรัม
HCl (1 mol/l)	2.5	มิลลิลิตร
Dimethylformamide (DMF)	7.5	มิลลิลิตร

1.6 Supplement

ละลาย L-α-phosphatidylinositol (Sigma P6636®) 2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

การใช้งาน

Base medium (ข้อ 1.1)	930	มิลลิลิตร
Nalidixic acid solution (ข้อ 1.2)	5	มิลลิลิตร
Ceftazidime solution (ข้อ 1.3)	5	มิลลิลิตร
Polymyxin B solution (ข้อ 1.4)	5	มิลลิลิตร
Cycloheximide solution (ข้อ 1.5.1)	5	มิลลิลิตร
หรือ Amphotericin B solution (ข้อ 1.5.2)	10	มิลลิลิตร
Supplement (ข้อ 1.6)	50	มิลลิลิตร

เติมข้อ 1.2-1.6 ตามปริมาตรข้างต้นใน base medium (ข้อ 1.1) 930 มิลลิลิตร (หรือ 925 มิลลิลิตร กรณีที่ใช้ Amphotericin B solution) ผสมให้เข้ากัน pH 7.2 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

2. Fraser broth

2.1 Base medium

Meat peptone (peptic digest of animal tissue)	5	กรัม
Tryptone (peptic digest of casein)	5	กรัม
Meat extract	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	12	กรัม

Potassium dihydrogen phosphate	1.35	กรัม
Aesculin	1	กรัม
Lithium chloride	3	กรัม
Sodium salt of nalidixic acid	0.02	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

2.2 Acriflavine hydrochloride solution

Acriflavine hydrochloride	0.25	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

2.3 Ammonium iron (III) citrate solution

Ammonium iron (III) citrate	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

การใช้งาน

เติม Acriflavine hydrochloride solution (ข้อ 2.2) และ Ammonium iron (III) citrate solution (ข้อ 2.3) อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 2.1) 10 มิลลิลิตร ใช้งานทันที

3. Half Fraser broth

3.1 Base medium

Meat peptone (peptic digest of animal tissue)	5	กรัม
Tryptone (peptic digest of casein)	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	12	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.35	กรัม
Aesculin	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

3.2 Lithium chloride solution

Lithium chloride	3	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	10	มิลลิลิตร

3.3 Solution of sodium salt of nalidixic

sodium salt of nalidixic acid	0.1	กรัม
sodium hydroxide, 0.05 mol/l solution	10	มิลลิลิตร

การใช้งาน

Base medium (ข้อ 3.1)	100	มิลลิลิตร
Lithium chloride solution (ข้อ 3.2)	1	มิลลิลิตร
Solution of sodium salt of nalidixic (ข้อ 3.3)	0.1	มิลลิลิตร
Acriflavine hydrochloride solution (ข้อ 2.2)	0.5	มิลลิลิตร
Ammonium iron (III) citrate solution (ข้อ 2.3)	1	มิลลิลิตร

เติมข้อ 3.2-3.3 และ 2.2-2.3 ตามปริมาตรข้างต้นใน base medium (ข้อ 3.1) 100 มิลลิลิตร ใช้งานทันที

4. Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA)

Trypticase soy broth[1)]	30	กรัม
[1)]Tryptone	17	กรัม
Soya peptone	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

5. Sheep blood agar (SBA)

5.1 Base medium

Meat peptone	15	กรัม
Liver digest	2.5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

*ขึ้นอยู่กับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

5.2 Defibrinated sheep blood

การใช้งาน

เติม defibrinated sheep blood (ข้อ 5.2) 5-7 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 5.1) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. Carbohydrate utilization broth (rhamnose, xylose และ mannitol) base

6.1 Base

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

6.2 Carbohydrate solutions (rhamnose, xylose and mannitol)

Carbohydrate (rhamnose, xylose หรือ mannitol)	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลายน้ำตาลแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อโดยการกรอง

การใช้งาน

นำน้ำตาลแต่ละชนิด (rhamnose, xylose หรือ mannitol) ผสมลงใน base ในอัตราส่วน 1:9

7. Motility agar

Casein peptone	20	กรัม
Meat peptone	6.1	กรัม
Agar	3.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

สารเคมี

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. 3% hydrogen peroxide solution ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2

ตัวอย่าง 25 กรัม/มิลลิลิตร + half Fraser broth 225 มิลลิลิตร

30°C 24 ± 3 ชั่วโมง

0.1 มิลลิลิตร

Fraser broth 10 มิลลิลิตร

35°C หรือ 37°C

48 ± 3 ชั่วโมง

ALOA และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด

37°C 24 ± 3 ชั่วโมง บ่มเพิ่ม 24 ± 3 ชั่วโมง

(หากจำเป็น) และตามคำแนะนำของผู้ผลิต

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ หรือที่สงสัย 5 โคโลนี ลงบนจานเพาะเชื้อ TSYEA

35°C หรือ 37°C, 18-24 ชั่วโมง

ตรวจสอบยืนยัน *Listeria* spp

(Catalase reaction, Gram staining, Motility test)

รายงานผล *Listeria* spp.

ตรวจสอบยืนยัน L. monocytogenes

(Haemolysis test, Carbohydrate utilization, CAMP test)

รายงานผล *L. monocytogenes*

แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes* ในอาหาร

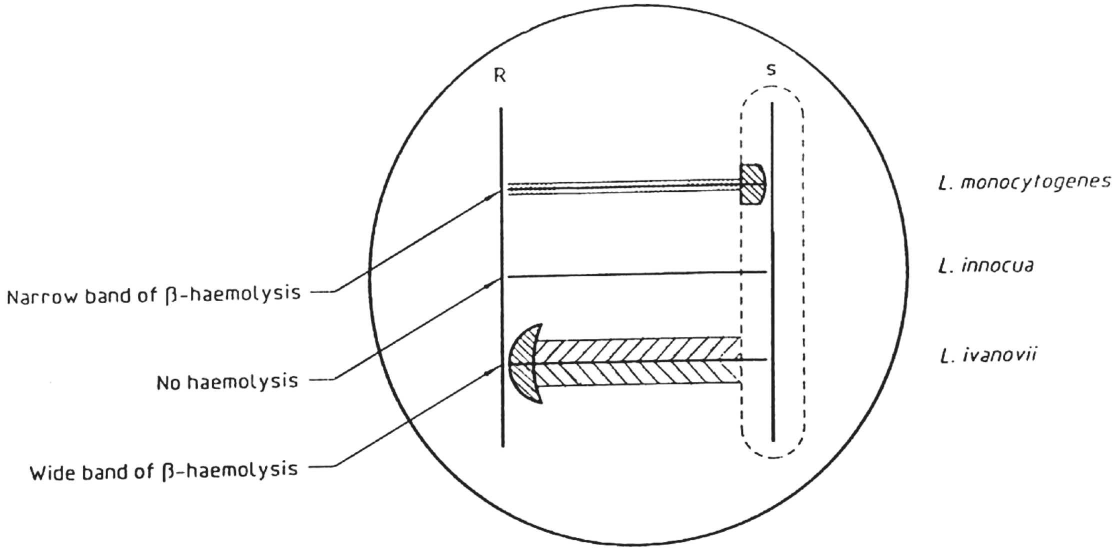
ภาคผนวก 3

Species	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	สร้างกรดจาก			CAMP test	
		Rhamnose	**Xylose**	**Mannitol**	***S. aureus***	***R. equi***
L. monocytogenes	+	+	–	–	+	–
L. innocua	–	V	–	–	–	–
L. ivanovii	+	–	+	–	–	+
L. seeligeri	(+)	–	+	–	(+)	–
L. welshimeri	–	V	+	–	–	–
L. grayi subsp. *grayi*	–	–	–	+	–	–
L. grayi subsp. *murrayi*	–	V	–	+	–	–

V : ไม่แน่นอน (Variable reaction)
(+) : ปฏิกิริยาบวกอย่างอ่อน (Weak reaction)
\+ : ปฏิกิริยาบวกมากกว่า 90%
– : ไม่เกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 1 : ปฏิกิริยาต่างๆ ที่ใช้ยืนยันเชื้อ *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes*

ภาคผนวก 4



รูปที่ 1 : ปฏิกิริยา CAMP test ของเชื้อ *Listeria* spp.

หมายเหตุ

1. รูปภาพแสดงการเพาะเชื้อลงใน sheep blood agar
   - แนวตั้ง แสดงรอยขีดของเชื้อ *S. aureus* (S) และ *R. equi* (R)
   - แนวขวาง แสดงรอยขีดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ
   - พื้นที่แรเงา แสดงการย่อยสลายของเม็ดเลือดแดง
2. พื้นที่เส้นประเป็นบริเวณอิทธิพล (influence) *S. aureus* ในการเสริมฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

DMSc F 2004: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร Analytical Method of *Salmonella* spp. in Food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative reference)

ISO 6579:2002/Cor.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 *E. coli* = *Escherichia coli*

3.2 H_2S = Hydrogen sulphide

3.3 *S.* Abortus-equi = *Salmonella* serovar Abortus-equi

3.4 *S.* Berta = *Salmonella* serovar Berta

3.5 *S.* Cholerae-suis = *Salmonella* serovar Cholerae-suis

3.6 *S.* Gallinarum = *Salmonella* serovar Gallinarum

3.7 *S.* Paratyphi A = *Salmonella* serovar Paratyphi A

3.8 *S.* Sendai = *Salmonella* serovar Sendai

3.9 *S.* Typhi = *Salmonella* serovar Typhi

4. หลักการ (Principle)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถใช้น้ำตาล glucose ได้

การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่เติมสารยับยั้ง แล้วบ่มข้ามคืนเพื่อให้ *Salmonella* spp. ที่มีจำนวนน้อยหรือที่บาดเจ็บฟื้นตัว

4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) 2 ชนิด ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่นในปริมาณที่ต่างกัน เพื่อให้ *Salmonella* spp. ที่ฟื้นตัวสามารถเพิ่มจำนวนและยับยั้งเชื้ออื่น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั้ง 2 ชนิด จะสนับสนุนหรือยับยั้งเชื้อต่างกัน

4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar) 2 ชนิด

4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Buffered peptone water (BPW)

5.1.2 L-Lysine decarboxylation medium

5.1.3 Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth

5.1.4 Nutrient agar (NA)

5.1.5 Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS) broth

5.1.6 Triple sugar iron (TSI) agar

5.1.7 Tryptone/tryptophan medium

5.1.8 Urea agar

5.1.9 VP medium

5.1.10 Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด

5.2 สารเคมี

5.2.1 β-galactosidase reagent

5.2.2 Kovacs reagent

5.2.3 Reagents for Voges-Proskauer (VP) reaction

5.2.4 *Salmonella* polyvalent anti-O-sera

5.2.5 *Salmonella* monovalent anti-O-sera

5.2.6 *Salmonella* anti-Vi-sera

5.2.7 Toluene

5.2.8 น้ำเกลือ 0.85%

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 37 ± 1°C

6.1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 115 ± 3°C และ 121 ± 3°C

6.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.4 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.5 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 41.5 ± 1°C และ 44 ± 50°C

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาดเล็ก (90 - 100 มม.) และหรือขนาดใหญ่ (140 มม.)

6.2.5 ปิเปต (pipette)

6.2.6 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.7 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างของเหลวข้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากันเทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ในกรณีที่ต้องการลดปริมาณงานสำหรับตัวอย่างรุ่นเดียวกัน (specified lot of food) สามารถนำตัวอย่างทดสอบรวมกันได้ (pooling the test portions) เช่น การตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง ให้สุ่มตัวอย่างละ 25 กรัม หรือมิลลิลิตร รวมเป็น 250 กรัม หรือมิลลิลิตรและตรวจวิเคราะห์ในคราวเดียวกันได้

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment)

7.3.1 เติม BPW 225 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่าง ข้อ 7.1 เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C 18 ± 2 ชั่วโมง (กรณีเตรียมตัวอย่างนอกเหนือจาก 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร เติม BPW ให้ได้สัดส่วนของตัวอย่าง : BPW = 1 : 10)

7.3.2 กรณีอาหารเฉพาะ แบ่งออกเป็น

- โกโก้และผลิตภัณฑ์ที่มีโกโก้เป็นองค์ประกอบมากกว่า 20% : เติม BPW (ที่มี casein ชนิดที่ไม่ใช่ acid casein 50 กรัมต่อลิตร หรือ sterile skim milk powder 100 กรัมต่อลิตร) 225 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C 18 ± 2 ชั่วโมง ถ้าคาดว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมบวกในปริมาณสูง ให้บ่มที่ 37°C 2 ชั่วโมง แล้วเติม brilliant green 0.018 กรัมต่อลิตร บ่มต่อที่ 37°C จนครบ 18 ± 2 ชั่วโมง
- อาหารที่มีความเป็นกรดหรืออาหารที่ปรับสภาพให้เป็นกรด :
  เติม BPW (ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า) 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C 18 ± 2 ชั่วโมง อย่าให้ค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ในขั้นตอน pre-enrichment

7.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (selective enrichment)

7.4.1 ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3.1 หรือ ข้อ 7.3.2 ใส่ใน RVS broth 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน MKTTn broth 10 มิลลิลิตร

7.4.2 บ่ม RVS broth ที่ 41.5°C 24 ± 3 ชั่วโมง และ MKTTn broth ที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

7.5 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.5.1 นำเชื้อ (จากข้อ 7.4.2) ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อขนาดใหญ่ (140 มม.) หรือ 2 จานเพาะเชื้อขนาดเล็ก (90-100 มม.)

7.5.2 บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง (อาหารเลี้ยงเชื้ออื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต) โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ

- XLD agar โคโลนีใสสีแดง มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางโคโลนี

  หมายเหตุ: *Salmonella* บางสายพันธุ์ไม่สร้าง H_2S เช่น *S.* Paratyphi A บน XLD โคโลนีมีสีชมพูและจุดตรงกลางมีสีชมพูเข้ม ส่วนโคโลนีของ *Salmonella* ที่เป็น lactose-positive บน XLD มีสีเหลืองและมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง

  กรณีที่ไม่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะ ให้เลือกโคโลนีบน XLD ที่มีสีเหลืองมีหรือไม่มีจุดดำ หรือโคโลนีสีชมพูที่มีจุดสีชมพูตรงกลางโคโลนี
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นเป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.5.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 5 โคโลนี กรณีน้อยกว่า 5 โคโลนีให้เลือกทั้งหมด ขีดบนจานเพาะเชื้อ NA บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

7.6 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

7.6.1 การยืนยันทางชีวเคมี

เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.5.3 ทดสอบทางชีวเคมีกับอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้

♦ TSI agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) และ stab ในส่วน butt บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

butt : สีเหลือง (ใช้น้ำตาล glucose)
: สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้น้ำตาล glucose)
: สีดำ (สร้าง H_2S)
: มีฟองอากาศหรือรอยแตกของวุ้น (สร้าง gas จากน้ำตาล glucose)

slant : สีเหลือง (ใช้น้ำตาล lactose และ-หรือ sucrose)
: สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาล lactose และ sucrose)

Salmonella spp. ที่มีลักษณะเฉพาะให้ผล slant สีแดง และ butt สีเหลือง สร้าง gas และประมาณ 90% สร้าง H_2S (วุ้นเปลี่ยนเป็นสีดำ)

♦ Urea agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง ปฏิกิริยามักเกิดภายใน 2-4 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

Salmonella spp. ให้ผลลบ

♦ L-Lysine decarboxylation medium

บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง ใช้อ่านผลปฏิกิริยา lysine decarboxylation

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Salmonella spp. ให้ผลบวก

♦ β-galactosidase

เขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอด เติม β-galactosidase reagent 0.25 มิลลิลิตร เขย่าหลอด บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก: น้ำเกลือ 0.85% เปลี่ยนเป็นสีเหลือง
ผลลบ: น้ำเกลือ 0.85% ไม่เปลี่ยนสี

Salmonella spp. ให้ผลลบ

กรณีใช้แผ่น ONPG disc สำเร็จรูป ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

♦ VP medium

บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง หยด creatine solution 2 หยด ethanolic solution of 1-naphthol 3 หยด และ potassium hydroxide solution 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง ภายใน 15 นาที

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

Salmonella spp. ให้ผลลบ

♦ Tryptone/tryptophan medium

บ่มที่ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง เติม Kovacs reagent 1 มิลลิลิตร เพื่ออ่านปฏิกิริยา

ผลบวก: เกิดวงแหวนสีแดง

ผลลบ: เกิดวงแหวนสีเหลือง

Salmonella spp. ให้ผลลบ

7.6.2 การยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

7.6.2.1 เขี่ยเชื้อมาแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยดน้ำเกลือ 0.85% 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากัน สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอนแสดงว่าเป็น auto-agglutination

7.6.2.2 ทดสอบเชื้อที่ไม่เกิด auto-agglutination หยด polyvalent anti-O-sera 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากันโดย เอียงหลอดไป-มา 30-60 วินาที สังเกตการจับกันเป็นตะกอน ถ้ามีตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก จากนั้น ให้ทดสอบต่อด้วย monovalent anti-O-sera ถ้ามีตะกอนกับ monovalent anti-O-serum ใด แสดงว่าให้ผลบวกกับ antiserum นั้น

7.6.2.3 ถ้าเชื้อไม่ตกตะกอนกับ polyvalent anti-O-sera ให้ทดสอบการตกตะกอนกับ anti-Vi-sera ถ้าผลเป็นบวก แสดงว่าอาจเป็น *Salmonella* Typhi (group D) หรือ Salmonella Paratyphi C (group C)

♦ การทดสอบ anti-Vi-sera โดยเขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือ 0.85% และต้มเดือด จากนั้นทดสอบต่อด้วย monovalent anti-O-serum group C และ group D

7.6.3 การแปลผล

โคโลนีที่เกิด auto-agglutination หรือโคโลนีที่ให้ผลทั้งทางชีวเคมีและหรือผลทางน้ำเหลืองวิทยาว่าเป็นหรือสงสัยว่าเป็น *Salmonella* spp. ส่งตรวจยืนยันที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

8. รายงานผลการทดสอบ (Test report)

Salmonella spp./น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Salmonella* spp. ในอาหาร

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีการที่ผู้ผลิตระบุ

1. Buffered peptone water

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

2. Buffered peptone water ที่มี casein 50 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 1 เติม casein 40 กรัมต่อลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

3. Buffered peptone water ที่มี skim milk powder 100 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 1 เติม skim milk powder 100 กรัมต่อลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

4. L-Lysine decarboxylation medium

L-Lysine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

5. Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth

5.1 Base medium

Meat extract	4.3	กรัม
Enzymatic digest of casein	8.6	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	2.6	กรัม
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	38.7	กรัม
Sodium thiosulfate pentahydrate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	47.8	กรัม
Ox bile for bacteriological use	4.78	กรัม
Brilliant green	9.6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือด 5 นาที pH 8.0 ± 0.2

5.2 Iodine-iodide solution

Iodine	20	กรัม
Potassium iodide (KI)	25	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย KI ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 10 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ iodine และเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง

5.3 Novobiocin solution

Novobiocin sodium salt	0.04	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	5	มิลลิลิตร

ละลาย Novobiocin sodium salt ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองเก็บอุณหภูมิตู้เย็น (3 ± 2°C) นาน 4 สัปดาห์

การใช้งาน

เติม Novobiocin solution (ข้อ 5.3) 5 มิลลิลิตร ใน Base medium (ข้อ 5.1) 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Iodine-iodide solution (ข้อ 5.2) 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง complete medium ควรเตรียมเมื่อใช้งาน

6. Nutrient agar (NA)

Meat extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

7. Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS) broth

7.1 Solution A

Enzymatic digest of soya	5	กรัม
Sodium chloride	8	กรัม
Potassium dihygrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.4	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนประมาณ 70°ซ เตรียมสารละลายนี้ในวันที่เตรียม complete medium

7.2 Solution B

Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2.6H_2O$)	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Magnesium chloride ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชาฝาปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

7.3 Solution C

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green oxalate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง ได้นาน 8 เดือน

การใช้งาน

Solution A (ข้อ 7.1)	1,000	มิลลิลิตร
Solution B (ข้อ 7.2)	100	มิลลิลิตร
Solution C (ข้อ 7.3)	10	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ฆ่าเชื้อที่ 115°C 15 นาที pH 5.2 ± 0.2

8. Triple sugar iron (TSI) agar

Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	20	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Glucose	1	กรัม
Iron (III) citrate	0.3	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2 ปล่อยให้ agar แข็งโดยการเอียงหลอด

9. Tryptone/tryptophan medium

Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
DL-Tryptophan	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.5 ± 0.2

10. Urea agar (Christensen)

10.1 Base medium

Peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

10.2 Urea solution

Urea	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Urea ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

การใช้งาน

เติม Urea solution (ข้อ 10.2) 50 มิลลิลิตร ใน Base medium (ข้อ 10.1) 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ aseptic technique แล้วปล่อยให้แข็งโดยการเอียงหลอด

11. VP medium

Peptone	7	กรัม
Glucose	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.9 ± 0.2

12. Xylose lysine desoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract powder	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
L-Lysine hydrochloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Iron (III) ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Sodium deoxycholate	1	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายไม่ให้ร้อนเกินไป pH 7.4 ± 0.2

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. β-galactosidase reagent

1.1 Buffer solution

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

ละลาย Sodium dihydrogen phosphate ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วย Sodium hydroxide ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

1.2 ONPG solution

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

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 50°C

การใช้งาน

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

2. Kovacs reagent

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

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน

3. น้ำเกลือ 0.85%

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

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

4. Reagent for Voges-Proskauer (VP) reaction

4.1 Creatine solution (N-amidinosarcosine)

Creatine monohydrate	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Creatine monohydrate ในน้ำกลั่น

4.2 1-Naphthol, ethanolic solution

1-Naphthol	6	กรัม
Ethanol, 96% (volume fraction)	100	มิลลิลิตร

ละลาย 1-Naphthol ใน Ethanol

4.3 Potassium hydroxide solution

Potassium hydroxide	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่น

5. Salmonella anti-sera ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2

ตัวอย่าง 25 กรัม/มิลลิลิตร + buffered peptone water 225 มิลลิลิตร

↓ 37°C 18 ± 2 ชั่วโมง

0.1 มิลลิลิตร ↓ ↓ 1 มิลลิลิตร

RVS broth 10 มิลลิลิตร MKTTn broth 10 มิลลิลิตร

41.5°C 24 ± 3 ชั่วโมง ↘ ↙ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

XLD agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด

↓ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมงและตามคำแนะนำของผู้ผลิต

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือที่สงสัย

↓

เขี่ยเชื้ออย่างน้อย 5 โคโลนี ลงบนจานเพาะเชื้อ NA

↓ 37°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ทดสอบทางชีวเคมี

↓

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *Salmonella* spp.

TSI agar				Urea agar	L-Lysine decarboxylation medium	น้ำเกลือ 0.85% (β-galactosidase)	VP medium	Tryptone/ tryptophan medium	Suspected pathogens
Slant	Butt	Gas	H_2S						
สีแดง	สีเหลือง	+	+ * (สีดำ)	–	+ (สีม่วง)	–	–	– (เกิดวงแหวนสีเหลือง)	*Salmonella* in general
สีแดง	สีเหลือง	–	+ W (–)	–	+	–	–	–	*S.* Typhi
สีแดง	สีเหลือง	+	– **	–	(สีเหลือง)	–	–	–	*S.* Paratyphi A

↓

ตกตะกอนกับ polyvalent anti-O-sera, monovalent anti-O-sera, anti-Vi-sera

↓

กรณีที่ต้องการทราบ serovar ใด
ส่งตรวจยืนยันที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

↓

รายงานผล

* = *S.* Sendai, *S.* Abortus-equi, *S.* Gallinarum, *S.* Berta และบางสายพันธุ์ของ *S.* Cholerae-suis ให้ผลลบ

** = Rarely positive W = Weakly positive

แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Salmonella* spp. ในอาหาร

DMSc F 2005: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำและน้ำแข็ง (Analytical Method of *Salmonella* spp. in Water and Ice)

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในน้ำและน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative references)

2.1 ISO 19250:2010. Water quality-Detection of *Salmonella* spp.

2.2 ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 *E. coli*	=	*Escherichia coli*
3.2 H_2S	=	Hydrogen sulfide
3.3 μ	=	ไมครอน (micron) หรือไมโครเมตร (micrometer)

4. หลักการ (Principle)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถใช้น้ำตาล glucose ได้

การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้เทคนิคการกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 μ จากนั้นนำแผ่นกรองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไม่เติมสารยับยั้ง แล้วบ่มเพาะเชื้อเพื่อให้ *Salmonella* spp. ที่มีจำนวนน้อยเพิ่มจำนวนหรือที่บาดเจ็บฟื้นตัว

4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) 2 ชนิด ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่นต่างชนิดกัน เพื่อให้ *Salmonella* spp. ที่ฟื้นตัวสามารถเพิ่มจำนวนและยับยั้งเชื้ออื่น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั้ง 2 ชนิด จะสนับสนุนหรือยับยั้งเชื้อต่างกัน

4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar) 2 ชนิด

4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ตรวจยืนยันทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Buffered peptone water (BPW) single strength

5.1.2 Buffered peptone water (BPW) double strength

5.1.3 L-Lysine decarboxylation medium

5.1.4 Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth

5.1.5 Nutrient agar (NA)

5.1.6 Rappaport-Vassiliadis broth with soya (RVS) broth

5.1.7 Triple sugar iron (TSI) agar

5.1.8 Urea agar (Christensen)

5.1.9 Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด เช่น brilliant green (BGA) agar, bismuth sulfite (BS) agar เป็นต้น

5.2 สารเคมี

5.2.1 น้ำเกลือ 0.85%

5.2.2 *Salmonella* polyvalent anti-O-sera

5.2.3 *Salmonella* monovalent anti-O-sera

5.2.4 *Salmonella* anti-Vi-sera

5.2.5 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่า

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 36 ± 2°C

6.1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 115 ± 3°C และ 121 ± 3°C

6.1.3 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)

6.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.5 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 41.5 ± 1°C และ 44 - 50°C

6.1.6 เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) 220 โวลต์ 50 เฮิรตซ์

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

6.2.2 แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร, pore size 0.45 µ

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.6 ปิเปต (pipette)

6.2.7 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

6.2.9 forceps ปากแบนและผิวเรียบ

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง เทตัวอย่างจากแต่ละหน่วยภาชนะบรรจุใส่รวมกัน ในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำให้ตัวอย่างละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ

7.2 การเตรียมชุดกรอง (Preparation of membrane filter unit)

7.2.1 เตรียมชุดกรองเมมเบรน 1 ชุด

7.2.2 ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ 1 แผ่น มาวางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาษ วางกรวยกรองรับน้ำครอบบนฐานรองรับกระดาษให้สนิท

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment)

7.3.1 เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วเทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อแล้วปิดฝาครอบ

7.3.2 เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมดแล้วปิดเครื่อง

7.3.3 ล้างรอบ ๆ กรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ และเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมดแล้วปิดเครื่อง

7.3.4 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองใส่ใน BPW, single strength 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 36 ± 2°C 18 ± 2 ชั่วโมง

7.3.5 หากไม่ใช้ชุดกรองเมมเบรน และมีตัวอย่างมากกว่า 10 มิลลิลิตร ให้เทตัวอย่างปริมาตรเท่ากับ BPW ความเข้มข้น 2 เท่า (double strength) ลงในขวดแก้วปราศจากเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 36 ± 2°C 18 ± 2 ชั่วโมง

ถ้าปริมาตรตัวอย่างน้อยกว่า 10 มิลลิลิตร ให้ผสมตัวอย่างกับ BPW ความเข้มข้น 1 เท่า 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปราศจากเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 36 ± 2°C 18 ± 2 ชั่วโมง

7.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (selective enrichment)

7.4.1 ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3.4 หรือข้อ 7.3.5 ใส่ใน RVS broth 10 มิลลิลิตร และปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ใน MKTTn broth 10 มิลลิลิตร

7.4.2 บ่ม RVS broth ที่ 41.5 ± 1°C 24 ± 3 ชั่วโมง และ MKTTn broth ที่ 36 ± 2°C 24 ± 3 ชั่วโมง ถ้าต้องการตรวจหา *Salmonella* spp. ที่เจริญเติบโตช้า (slow-growing) ให้บ่ม RVS broth ต่อที่ 41.5 ± 1°C จนครบ 48 ± 4 ชั่วโมง

7.5 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.5.1 นำเชื้อ (จากข้อ 7.4.2) ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด ชนิดละ 1 จานเพาะเชื้อ

7.5.2 XLD agar บ่มที่ 36 ± 2°C 24 ± 3 ชั่วโมง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น บ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ

- XLD agar โคโลนีใสสีแดง มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางโคโลนี

หมายเหตุ: *Salmonella* บางสายพันธุ์ไม่สร้าง H_2S เช่น *S.* Paratyphi A บน XLD โคโลนีมีสีชมพูและจุดตรงกลางมีสีชมพูเข้ม ส่วนโคโลนีของ *Salmonella* ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose-positive) บน XLD มีสีเหลือง และมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง ในกรณีที่พบโคโลนีลักษณะเหล่านี้ ให้นำไปตรวจสอบยืนยันด้วย

7.5.3 สำหรับงานที่วิเคราะห์เป็นประจำ (routine monitoring purpose) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 1 โคโลนี จากแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง นำไปตรวจวิเคราะห์ยืนยัน ถ้าโคโลนีแรกไม่ใช่ *Salmonella* ให้ทดสอบเพิ่มอีก 4 โคโลนี

7.5.4 กรณีการศึกษาด้านระบาดวิทยา (epidemilogical studies) เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 5 โคโลนี จากแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ถ้ามีน้อยกว่า 5 โคโลนี ให้เลือกทั้งหมดแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ยืนยัน

7.6 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (confirmation)

เขี่ยเชื้อที่สงสัยจากข้อ 7.5.3 หรือ 7.5.4 ขีดบนจานเพาะเชื้อ NA บ่มที่ 36 ± 2°C 24 ± 3 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจยืนยันทางชีวเคมีและทางน้ำเหลืองวิทยา

7.6.1 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี

ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้

♦ TSI agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) และ stab ในส่วน butt บ่มที่ 36 ± 2°C 24 ± 3 ชั่วโมง

butt : สีเหลือง (ใช้น้ำตาล glucose)
: สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้น้ำตาล glucose)
: สีดำ (สร้าง H_2S)
: มีฟองอากาศหรือรอยแตกของวุ้น (สร้าง gas จากน้ำตาล glucose)

slant : สีเหลือง (ใช้น้ำตาล lactose และ-หรือ sucrose)
: สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาล lactose และ sucrose)

Typical *Salmonella* ให้ผล slant สีแดง (ไม่ใช้น้ำตาล lactose และ sucrose) และ butt สีเหลือง (ใช้น้ำตาล glucose) สร้าง gas และประมาณ 90% สร้าง H_2S (วุ้นเปลี่ยนเป็นสีดำ)

♦ Urea agar

นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) บ่มที่ 36 ± 2°C 24 ชั่วโมง ปฏิกิริยามักเกิดภายใน 2-4 ชั่วโมง

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดง
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

Typical *Salmonella* ให้ผลลบ

♦ L-Lysine decarboxylation medium

บ่มที่ 36 ± 2°C 24 ± 3 ชั่วโมง ใช้อ่านผลปฏิกิริยา lysine decarboxylation

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง
ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Typical *Salmonella* ให้ผลบวก

โคโลนีที่ให้ผลทดสอบตาม typical reactions ในตารางที่ 1 จัดเป็น presumptive *Salmonella* spp.ให้ทดสอบยืนยันต่อทางน้ำเหลืองวิทยา และหากผลไม่เป็นไปตาม typical reactions (ตารางที่ 1) 1-2 ปฏิกิริยา ให้ทดสอบยืนยันต่อทางน้ำเหลืองวิทยาด้วย

ตารางที่ 1 Typical reactions ทางชีวเคมี ของ *Salmonella* spp.

การทดสอบ	ผล
TSI lactose	-
TSI glucose	+
TSI sucrose	-
TSI hydrogen sulfide	+
Urea splitting	-
L-Lysine decarboxylase	+

7.6.2 การยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

7.6.2.1 เขี่ยเชื้อมาแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยดน้ำเกลือ 0.85% 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากัน สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอน แสดงว่าเป็น auto-agglutination

7.6.2.2 ทดสอบเชื้อที่ไม่เกิด auto-agglutination โดยหยด polyvalent anti-O-sera 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากันโดย เอียงหลอดไป-มา 30-60 วินาที สังเกตการจับกันเป็นตะกอน ถ้ามีตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก จากนั้นให้ทดสอบต่อด้วย monovalent anti-O-sera ถ้ามีตะกอนกับ monovalent anti-O-serum ใด แสดงว่าให้ผลบวกกับ antiserum นั้น

7.6.2.3 ถ้าเชื้อไม่ตกตะกอนกับ polyvalent anti-O-sera ให้ทดสอบการตกตะกอนกับ anti-Vi-sera ถ้าผลเป็นบวก แสดงว่าอาจเป็น*Salmonella* Typhi (group D) หรือ *Salmonella* Paratyphi C (group C) ทดสอบต่อโดยเขี่ยเชื้อปริมาณมากลงในหลอดบรรจุน้ำเกลือ 0.85% และต้มเดือด แล้วตรวจสอบด้วย monovalent anti-O-serum group C และ group D

7.6.3 โคโลนีที่ให้ผลตาม typical reactions ของการทดสอบทางชีวเคมี และให้ผลบวกทางน้ำเหลืองวิทยาแสดงว่าเป็น *Salmonella* spp.

7.6.4 โคโลนีที่เกิด auto-agglutination หรือกรณีสงสัย และ/หรือต้องการทราบว่าเป็น serovar ใด ให้ส่งตรวจยืนยันที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

8. **รายงานผลการทดสอบ** (Test report)

Salmonella spp./100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่ทดสอบ พบหรือไม่พบ

9. **รายละเอียดอื่น** (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Salmonella* spp. ในน้ำและน้ำแข็ง

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีการที่ผู้ผลิตระบุ

1. Buffered peptone water (single strength)

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2 เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 3°C ได้นาน 3 เดือน

2. Buffered peptone water (double strength)

Enzymatic digest of casein	20	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	18	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	3	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2 เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 3°C ได้นาน 3 เดือน

3. L-Lysine decarboxylation medium

L-lysine monohydrochloride	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

4. Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth

4.1 Base medium

Enzymatic digest of meat extract	4.3	กรัม
Enzymatic digest of casein	8.6	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	2.6	กรัม
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	38.7	กรัม
Sodium thiosulfate pentahydrate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	47.8	กรัม
Ox bile for bacteriological use	4.78	กรัม
Brilliant green	9.6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือด 5 นาที pH 8.0 ± 0.2

4.2 Iodine-iodide solution

Iodine	20	กรัม
Potassium iodide (KI)	25	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย KI ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 10 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ iodine และเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง

4.3 Novobiocin solution

Novobiocin sodium salt	0.04	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	5	มิลลิลิตร

ละลาย Novobiocin sodium salt ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เก็บอุณหภูมิตู้เย็น (3 ± 2°C) นาน 4 สัปดาห์

4.4 Complete medium

เติม Novobiocin solution (ข้อ 4.3) 5 มิลลิลิตร ใน Base medium (ข้อ 4.1) 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Iodine-iodide solution (ข้อ 4.2) 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง เตรียม complete medium เมื่อใช้งาน

5. Nutrient agar (NA)

Enzymatic digest of meat extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

6. Rappaport-Vassiliadis broth with soya (RVS) broth

6.1 Basic medium, Solution A

Enzymatic digest of soya	5	กรัม
Sodium chloride	8	กรัม
Potassium dihygrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.4	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนประมาณ 70°C เตรียมสารละลายนี้ในวันที่เตรียม complete medium

6.2 Solution B

Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2.6H_2O$)	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Magnesium chloride ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชา ฝาปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

6.3 Solution C

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green oxalate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด อุณหภูมิห้อง ได้นาน 8 เดือน

6.4 Complete medium

Solution A (ข้อ 6.1)	1,000	มิลลิลิตร
Solution B (ข้อ 6.2)	100	มิลลิลิตร
Solution C (ข้อ 6.3)	10	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ฆ่าเชื้อที่ 115°C 15 นาที pH 5.2 ± 0.2

* ปริมาณ agar ขึ้นอยู่กับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

7. Triple sugar iron (TSI) agar

Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Enzymatic digest of peptone	20	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Glucose	1	กรัม
Iron (III) citrate	0.3	กรัม
Sodium thiosulfate ($Na_2S_2PO_4$)	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2 ถ่ายใส่หลอดทดลอง แล้วปล่อยให้ agar แข็ง โดยการเอียงหลอด

8. Urea agar (Christensen)

8.1 Base medium

Peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 6.8 ± 0.2

* ปริมาณ agar ขึ้นอยู่กับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

8.2 Urea solution

Urea	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับปริมาตรจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Urea ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 3°C ได้นาน 1 เดือน

การใช้งาน

เติม Urea solution (ข้อ 8.2) 50 มิลลิลิตร ใน Base medium (ข้อ 8.1) 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ aseptic technique

9. Xylose lysine desoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
D(+)- Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
L(+)-Lysine hydrochloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Iron (III) ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Sodium deoxycholate	1	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย pH 7.4 ± 0.2

* ปริมาณของ agar ขึ้นอยู่กับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

สารเคมี

1. น้ำเกลือ 0.85%

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

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

2. *Salmonella* anti-sera ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2

กรองตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่ต้องการทดสอบ + buffered peptone water (single strength)
หรือตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรที่ต้องการทดสอบ + buffered peptone water
(ตัวอย่างน้อยกว่า 10 มิลลิลิตร ใช้ single strength ถ้ามากกว่า 10 มิลลิลิตร ใช้ double strength)

$36 \pm 2^{o}C$ 18 ± 2 ชั่วโมง

0.1 มิลลิลิตร

RVS broth 10 มิลลิลิตร

$41.5 \pm 1^{o}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง

1 มิลลิลิตร

MKTTn broth 10 มิลลิลิตร

$36 \pm 2^{o}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง

XLD agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด

$36 \pm 2^{o}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง
และตามคำแนะนำของผู้ผลิต

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือที่สงสัย

เขี่ยเชื้อจากแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ลงบนจานเพาะเชื้อ NA

$36 \pm 2^{o}C$ 24 ± 3 ชั่วโมง

ทดสอบทางชีวเคมี

เกิดปฏิกิริยาเฉพาะ (typical reactions)
ของ *Salmonella* spp. หรือ
ไม่เกิดปฏิกิริยาเฉพาะ 1-2 ปฏิกิริยา

presumptive *Salmonella* spp.

ทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา

ไม่เกิดปฏิกิริยาเฉพาะ (typical reactions)
ของ *Salmonella* spp.

รายงานผล

แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Salmonella* spp. ในน้ำและน้ำแข็ง

DMSc F 2006: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร
Analytical Method of *Staphylococcus aureus* in Food

1. ขอบข่าย (Scope)

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

2. เอกสารอ้างอิง (Normative references)

2.1 American Society for Microbiology. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC. 9th Edition, volume 1, p.390-411.

2.2 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2001, Chapter 12 *"Staphylococcus aureus"*. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 19 เมษายน 2556]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm.

2.3 U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 2010. Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. [ออนไลน์]. 2010; [สืบค้น 22 เมษายน 2556]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/FoodScience Research/LaboratoryMethods/ ucm109656.htm.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 Coagulase plasma	=	Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
3.2 MPN	=	Most Probable Number
3.3 *S. aureus*	=	*Staphylococcus aureus*
3.4 AnO_2	=	Anaerobic condition (สภาวะไร้ออกซิเจน)

4. หลักการ (Principle)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10% สามารถย่อย tellurite, lecithin และสร้าง enzyme coagulase เมื่อเติม pyruvate ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อ *S. aureus* ที่บาดเจ็บฟื้นและแข็งแรงขึ้น

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 วิธี คือ

4.2.1 วิธี MPN

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

4.2.2 วิธี spread plate

นำตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม ปิเปตลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง นำไปบ่ม 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 Coagulase plasma (rabbit) with EDTA

5.1.4 Phenol red glucose broth

5.1.5 Phenol red mannitol broth

5.1.6 Toluidine blue-deoxyribonucleic acid (T-DNA) agar

5.1.7 Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

5.1.8 Trypticase (tryptic) soy broth containing 10% NaCl and 1% sodium pyruvate (TSB 10% NaCl)

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

5.2 สารเคมี

5.2.1 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

5.2.2 Gram stain reagents

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 118 ± 3°C และ 121 ± 3°C

6.1.2 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.3 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.4 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 35 ± 1°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°C

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 แท่งแก้วงอ (glass spreader)

6.2.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.6 ปิเปต (pipette)

6.2.7 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็งหรือของเหลวข้นหนืด ตัดตัวอย่างหรือเขย่าให้ทั่วจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial ten fold) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจางดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดปั่นหรือเครื่องตีผสมอาหาร 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10

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): ภาคผนวก 2 แผนภูมิที่ 1

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ใน TSB 10% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 หลอด

7.3.2 บ่มที่ 35°C 48 ± 2 ชั่วโมง

7.3.3 กรณีที่หลอดขุ่น ให้ขีดบนจานเพาะเชื้อ BP agar

7.3.4 บ่มที่ 35°C 48 ชั่วโมง

7.3.5 เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยแต่ละลักษณะจำนวนมากกว่า 1 โคโลนีไปตรวจยืนยัน

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ กลม นูน สีเทาถึงสีดำ ขนาด 2–3 มิลลิเมตร มีโซนขุ่นรอบโคโลนี อาจมีโซนใสชั้นนอก

อาหารหลายประเภทและผลิตภัณฑ์นมอาจพบ nonlipolytic strain ที่ไม่ให้โซนขุ่นและใสรอบโคโลนี สำหรับอาหารแช่แข็งหรืออาหารแห้งที่เก็บไว้นาน พบโคโลนีที่มีสีดำอ่อนกว่าอาจมีผิวขรุขระและแห้ง

7.4 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี MPN: ภาคผนวก 3 แผนภูมิที่ 2

7.4.1 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 7.2 ที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1,000 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม อย่างน้อย 3 ระดับติดต่อกัน ปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB 10% NaCl 10 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

7.4.2 เหมือนข้อ 7.3.2–7.3.5

7.5 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี spread plate: ภาคผนวก 4 แผนภูมิที่ 3

7.5.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้า BP agar จำนวน 3 จานเพาะเชื้อ (0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) ต่อระดับความเจือจาง กรณีที่คาดว่าตัวอย่างมี *S. aureus* จำนวนมาก ปิเปตสารละลายตัวอย่างลงบนผิวหน้า BP agar จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ (0.1 และ 0.1 มิลลิลิตร) ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง

7.5.2 บ่มที่ 35°C 45–48 ชั่วโมง

7.5.3 นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อลักษณะเฉพาะ (ข้อ 7.3.5) 20-200 โคโลนี กรณีที่มีโคโลนีหลายลักษณะให้นับและบันทึกจำนวนโคโลนีแต่ละลักษณะ

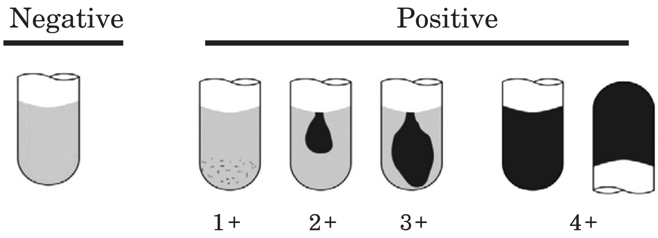
7.5.4 เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.5.3 ลักษณะละมากกว่า 1 โคโลนี นำไปตรวจยืนยันต่อไป

7.6 การตรวจยืนยัน

7.6.1 Coagulase test

เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะลงใน BHI 0.2-0.3 มิลลิลิตร และ TSA slant บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง (เก็บ TSA slant ที่อุณหภูมิห้องเพื่อตรวจวิเคราะห์เพิ่มหรือทดสอบ coagulase ซ้ำ) เติม coagulase plasma (rabbit) with EDTA 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 35°C สังเกตการจับตัวกันเป็นลิ่ม (clot) ในหลอด (รูปที่ 1) เป็นระยะ ๆ ภายใน 6 ชั่วโมง ในกรณีที่จับเป็นลิ่มแข็ง คือเอียงหรือคว่ำหลอดแล้วยังอยู่ในสภาพเดิม (4+) สรุปว่าพบ *S. aureus* แต่กรณีที่เป็นลิ่มบางส่วนในระดับ 2+ และ 3+ ให้บ่มต่ออีก 18-48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้าผลไม่เป็น 4+ ให้ตรวจวิเคราะห์เพิ่มในข้อ 7.4.2

ถ้าไม่มีการจับตัวกันเป็นลิ่มเกิดขึ้น หรือเกิดในลักษณะ 1+ ให้สรุปเป็นผลลบ



รูปที่ 1 แสดงชนิดปฏิกิริยาการจับตัวกันเป็นลิ่มในหลอด

7.6.2 การตรวจวิเคราะห์เพิ่ม (Ancillary tests):

เขี่ยเชื้อจาก TSA slant (ข้อ 7.6.1) ทดสอบเพิ่มดังนี้

❖ Gram staining

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปกลม เกาะกันเป็นคู่ หรือเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (ขนาดไม่แน่นอน)

❖ Catalase test

เขี่ยเชื้อแตะบนแผ่นกระจก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้

❖ Carbohydrate utilization

เขี่ยเชื้อลงใน phenol red glucose broth และ phenol red mannitol broth หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่มี glucose และ mannitol ตามความเหมาะสมบ่ม AnO_2 ที่ 37°C 5 วัน

ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้

❖ Thermostable nuclease production

- หยด T-DNA agar 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าแผ่นกระจก หรือเตรียมจานเพาะเชื้อ T-DNA agar ปล่อยให้แข็ง เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (10-12 หลุมต่อแผ่น)
- เลี้ยงเชื้อใน BHI บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง ต้มเดือด 15 นาที
- ปิเปตเชื้อ 0.01 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มที่ 35°C 4 ชั่วโมง ใน moist chamber

ผลบวก: เกิดโซนสีชมพูล้อมรอบหลุม ขนาดกว้างอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร

ผลลบ: ไม่เกิดโซนล้อมรอบหลุม

S. aureus ให้ผลบวก

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณปริมาณ (MPN)

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

8.1.2 กรณีจำนวนหลอด TSB 10% NaCl ที่ให้ผลบวกไม่เป็นไปตามตาราง MPN ให้ใช้สูตรการคำนวณดังนี้

MPN/กรัม = $P/\sqrt{NT}$

P = จำนวนหลอดทั้งหมดที่ให้ผลบวก

N = น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดที่ให้ผลลบ

T = น้ำหนักรวมเป็นกรัมของตัวอย่างในหลอดทั้งหมด

ค่าความไม่แน่นอน = Log MPN/กรัม ± (1.96) (standard error)

(95% confidence intervals)

เช่น ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1,000 มีหลอดที่ให้ผลบวก 2/3, 0/3 และ 3/3

$\therefore$ MPN/กรัม $= 5/\sqrt{(0.1+0.03+0.000)\ (0.3+0.03+0.003)}$

$= 5/\sqrt{(0.13)\ (0.333)}$

$= 24$

ค่าความไม่แน่นอน $= \log 24 \pm (1.96)\ (0.1973)$

(95% confidence intervals)

$= 1.3802 \pm 0.3867$

$=$ 0.9935 ถึง 1.7669

Lower limit $=$ antilog $0.9935 = 9.9$

Upper limit $=$ antilog $1.7669 = 58.5$

8.1.3 ในกรณีที่ระดับความเจือจางเริ่มต้นไม่ใช่ 1:10 (0.1 กรัม) สามารถหาค่า MPN ได้ดังนี้

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

เช่น ระดับความเจือจาง 1: 1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 ให้ผลบวก 3-2-1

ดังนั้น ค่าที่อ่านได้จากตาราง = 150

ระดับความเจือจางกลาง = 10,000

$$\therefore \text{MPN/กรัม} = \frac{150 \times 10{,}000}{100} = 15{,}000$$

8.2 การคำนวณปริมาณ (spread plate)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันพบว่าเป็น *S. aureus* บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น *S. aureus* ไปคูณจำนวนที่นับได้และคูณ 1/d (d = dilution factor = ระดับความเจือจางแรกของการนับจำนวน)

ตัวอย่างเช่น การตรวจโดยใช้ปริมาตรตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} นับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้ 65 โคโลนี สุ่ม 5 โคโลนี และตรวจยืนยันว่าเป็น *S. aureus* 4 โคโลนี ดังนั้น สัดส่วนเท่ากับ 4/5

จำนวน *S. aureus* CFU/กรัม หรือมิลลิลิตร = (โคโลนีที่นับได้ × สัดส่วน) × 1/d × 10

= (65 × 4/5) × 10,000 × 10 = 5,200,000

9. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

9.1 การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

S. aureus/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9.2 การตรวจปริมาณ (enumeration) รายงานเป็น

9.2.1 *S. aureus* MPN/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2.2 จำนวน *S. aureus* CFU/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2.3 กรณีไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะหรือยืนยันแล้วไม่ใช่ *S. aureus*

- ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร
  รายงานเป็น น้อยกว่า 1 × ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ
- ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 0.1 มิลลิลิตร
  รายงานเป็น น้อยกว่า 1 × ระดับความเจือจางแรกของการทดสอบ × 10

10. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

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. Brain heart infusion (BHI) broth

สูตร 1

Calf brain, infusion form	200	กรัม
Beef heart, infusion form	250	กรัม
Proteose peptone (Difco) or polypeptone (Bioquest)	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

2. Baird-Parker medium (BP)

2.1 base medium

Tryptone	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Lithium chloride.$_6H_2O$	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 950 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

2.2 1% potassium tellulite solution

potassium tellulite trihydrate	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย potassium tellulite trihydrate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรอง

2.3 Egg yolk emulsion

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

การใช้งาน

เติม 1% potassium tellulite solution (ข้อ 2.2) 10 มิลลิลิตรและ egg yolk emulsion 50 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 2.1) 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อตามปริมาตรที่ต้องการ

3. Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPB)

3.1 Stock solution

KH_2 PO_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) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อ 121°C 15 นาที

3.2 Diluent

ปิเปต stock solution (ข้อ 3.1) 1.25 มิลลิลิตร นำมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปิเปตใส่หลอดทดลองหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการและนำไปฆ่าเชื้อ 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 แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 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 แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 118°C 10 นาที pH 7.4 ± 0.2

6. 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 เติมส่วนประกอบอื่น ๆ ลงไป ยกเว้น toluidine blue O ให้ความร้อนจน agar ละลาย และละลาย toluidine blue O ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากใช้ทันทีไม่จำเป็นต้อง sterile หากเข้าฆ่าเชื้อสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 4 เดือน

7. 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 ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

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

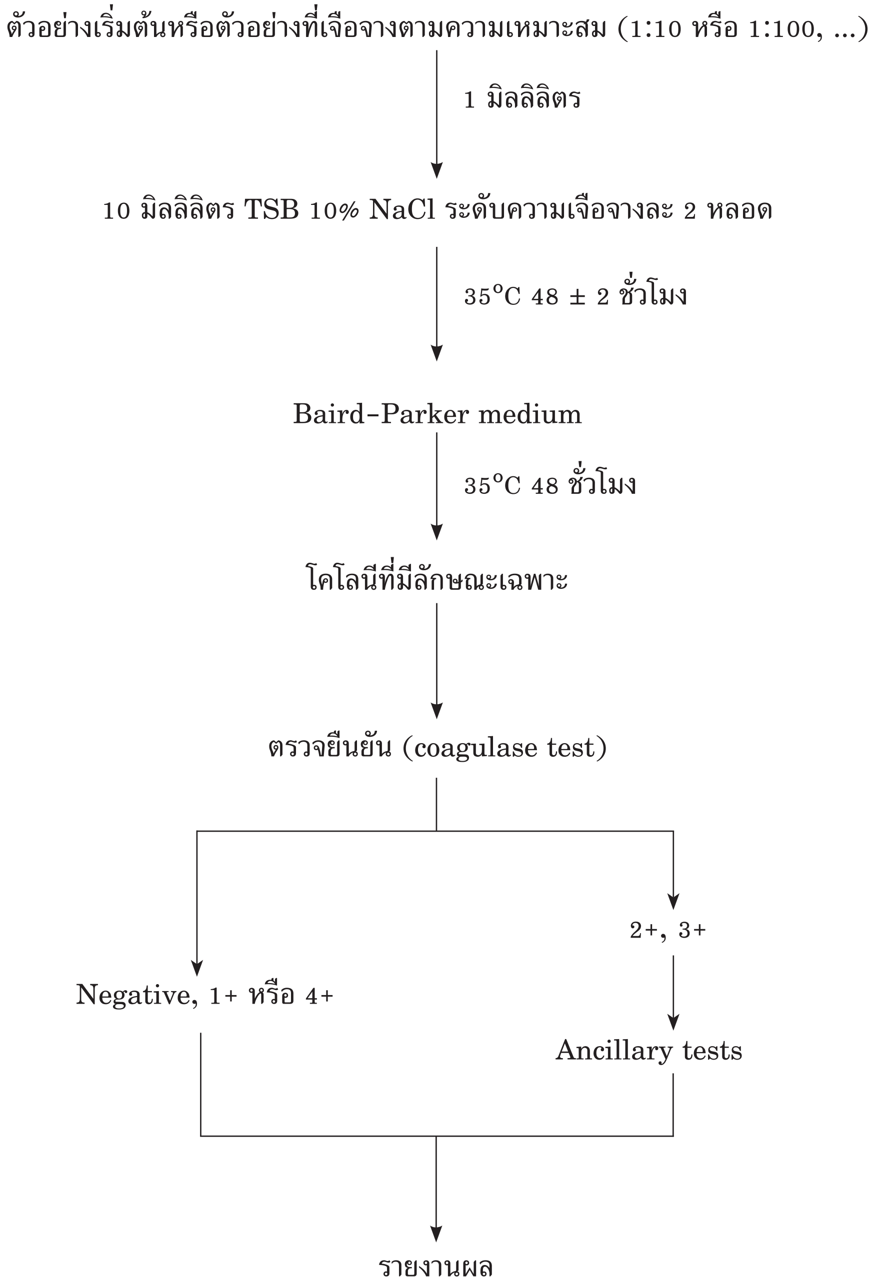
Trypticase or tryptose (pancreatic digest of casein)	17	กรัม
Phytone (papaic digest of soya meal)	3	กรัม
NaCl	100	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 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



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

ภาคผนวก 3

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

↓ 1 มิลลิลิตร

10 มิลลิลิตร TSB 10% NaCl ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

↓ 35°C 4 8± 2 ชั่วโมง

Baird-Parker medium

↓ 35°C 48 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ

↓

ตรวจยืนยัน (coagulase test)

- Negative, 1+ หรือ 4+
- 2+, 3+ → Ancillary tests

↓

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^oC 45 - 48 ชั่วโมง

นับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ (20-200 โคโลนี)

↓

ตรวจยืนยัน (coagulase test)

Negative, 1+ หรือ 4+

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 2007: วิธีตรวจวิเคราะห์ *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, Chapter 12 *"Staphylococcus aureus"*. [ออนไลน์]. 2001; [สืบค้น 21 กันยายน 2554]. เข้าถึงได้ที่ http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/Laboratory Methods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.

2.3 American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington DC.; 2001. Chapter 39, p 391.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1	Coagulase plasma	=	Coagulase plasma (rabbit) with EDTA
3.2	*S. aureus*	=	*Staphylococcus aureus*
3.3	AnO_2	=	Anaerobic condition (สภาวะไร้ออกซิเจน)
3.4	µ	=	ไมครอน (micron) หรือไมโครเมตร (micrometer)

4. หลักการ (Principle)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10% สามารถย่อย tellurite, lecithin และสร้าง enzyme coagulase

การตรวจหา (detection) ทำได้ 2 วิธีคือ

4.1 วิธี Single-plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็ง 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 จึงใช้แผ่นกรองที่มีขนาดรูเล็กลง) หลังกรองน้ำนำแผ่นกรองไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง หลังจากบ่มเพาะเชื้อนำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะไปตรวจยืนยัน

4.2 วิธี Two-plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็ง 2 ชนิด

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

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Baird-Parker medium (BP)

5.1.2 R2A agar

5.1.3 Brain heart infusion (BHI) broth

5.1.4 Phenol red glucose broth

5.1.5 Phenol red mannitol broth

5.1.6 Trypticase (tryptic) soy agar (TSA)

5.1.7 Toluidine blue-deoxyribonucleic acid (T-DNA) agar

5.2 สารเคมี

5.2.1 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

5.2.2 Gram stain reagents

5.2.3 Coagulase plasma (rabbit) with EDTA

5.2.4 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่า

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.3 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 35 ± 0.5°C และ 37 ± 0.5°C

6.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.6 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44-50°C

6.1.7 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)

6.1.8 เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) 220 โวลต์ 50 เฮิรตซ์

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

6.2.2 แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร, pore size 0.22 μ

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (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 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อให้ได้ไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ

7.1.2 ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง เทตัวอย่างจากแต่ละหน่วยภาชนะบรรจุใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำให้ตัวอย่างละลายจนหมด สุ่มให้ได้ปริมาตรไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ

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

7.2.1 เตรียมชุดกรองเมมเบรน 1 ชุด

7.2.2 ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อที่มีรู (pore size) ขนาด 0.22 μ 1 แผ่น วางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาษ วางกรวยกรองรับน้ำครอบบนฐานรองรับกระดาษให้สนิท

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

7.2.4 เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.2.5 ล้างรอบกรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร และปิดฝาครอบ จากนั้นเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.2.6 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองเมมเบรนวางบนจานเพาะเชื้อ BP agarระวังอย่าให้มีอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่ม 35 ± 0.5°C 48 ± 4 ชั่วโมง

7.2.7 เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยแต่ละลักษณะจำนวนมากกว่า 1 โคโลนีไปตรวจยืนยัน

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

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

7.3.1 เตรียมชุดกรองเมมเบรน 1 ชุด

7.3.2 ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนที่มีรู (pore size) ขนาด 0.22 μ ปราศจากเชื้อ 1 แผ่น มาวางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาษ วางกรวยกรองรับน้ำครอบบนฐานรองรับกระดาษให้สนิท

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

7.3.4 เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.3.5 ล้างรอบกรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ และเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.3.6 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองเมมเบรนวางบนจานเพาะเชื้อ R2A agar (ระวังอย่าให้มีอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อ) แล้วนำไปบ่มที่ 37 ± 0.5°C 24 ชั่วโมง

7.3.7 ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองเมมเบรนจากจานเพาะเชื้อ R2A agar มาวางบนจานเพาะเชื้อ BP agar (ระวังอย่าให้มีอากาศแทรกระหว่างแผ่นกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อ) แล้วนำไปบ่มที่ 35 ± 0.5°C ต่ออีก 24 ชั่วโมง

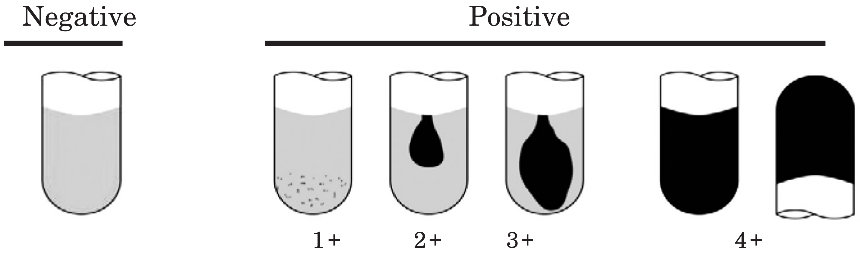
7.3.8 เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยจำนวนมากกว่า 1 โคโลนี ไปตรวจยืนยัน

♦ โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* คือ กลม นูน ผิวเรียบ สีเทาถึงสีดำ *S. aureus* สามารถย่อยไข่แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารวุ้นใสบริเวณที่เจริญ สังเกตได้โดยยกแผ่นเมมเบรนขึ้น

7.4 การตรวจยืนยัน

7.4.1 Coagulase test:

เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะลงใน BHI 0.2-0.3 มิลลิลิตร และ TSA slant บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง (เก็บ TSA slant ที่อุณหภูมิห้องเพื่อตรวจวิเคราะห์เพิ่มหรือทดสอบ coagulase ซ้ำ) เติม coagulase plasma (rabbit) with EDTA 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 35°C สังเกตการจับตัวกันเป็นลิ่ม (clot) ในหลอด (รูปที่ 1) เป็นระยะ ๆ ภายใน 6 ชั่วโมง ในกรณีที่จับเป็นลิ่มแข็ง คือเอียงหรือคว่ำหลอดแล้วยังอยู่ในสภาพเดิม (4+) สรุปว่าพบ *S. aureus* แต่กรณีที่เป็นลิ่มบางส่วนในระดับ 2+ และ 3+ ให้บ่มต่ออีกจนครบ 18-48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้าผลไม่เป็น 4+ ให้ตรวจวิเคราะห์เพิ่มในข้อ 7.4.2
ถ้าไม่มีการจับตัวกันเป็นลิ่มเกิดขึ้น หรือเกิดในลักษณะ 1+ ให้สรุปเป็นผลลบ



รูปที่ 1 แสดงระดับการจับตัวกันเป็นลิ่มในหลอดของการทดสอบ coagulase

7.4.2 การตรวจวิเคราะห์เพิ่ม (Ancillary tests):

- ย้อมสีแกรม

  S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (สีม่วง) รูปกลม เกาะกันเป็นคู่ หรือเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (ขนาดไม่แน่นอน)

- Catalase test

  เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะแตะบนแผ่นกระจก หยด 3% H_2O_2 สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

  ผลบวก: มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

  ผลลบ: ไม่มีฟองก๊าซ

  S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากสร้างเอนไซม์ catalase ได้

- Carbohydrate utilization

  ทดสอบการใช้น้ำตาล phenol red glucose broth และ phenol red mannitol broth หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นที่มี glucose และ mannitol ตามความเหมาะสม บ่ม AnO_2 ที่ 37°C 5 วัน

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  S. aureus ให้ผลบวก เนื่องจากใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้

- Thermostable nuclease production

  - หยด T-DNA agar 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าแผ่นกระจก หรือเตรียมจานเพาะเชื้อ T-DNA agar ปล่อยให้แข็ง เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (10-12 หลุมต่อแผ่น)
  - เลี้ยงเชื้อใน BHI บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง ต้มเดือด 15 นาที
  - ปิเปตเชื้อ 0.01 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มที่ 35°C 4 ชั่วโมง ใน moist chamber

    ผลบวก: เกิดโซนสีชมพูล้อมรอบหลุม ขนาดกว้างอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร

    ผลลบ: ไม่เกิดโซนล้อมรอบหลุม

    S. aureus ให้ผลบวก

8. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

S. aureus/100 มิลลิลิตรหรือปริมาตรที่ทดสอบ พบหรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิที่ 1 การตรวจหา (detection) Staphylococcus aureus ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี Single-plate

9.3 ภาคผนวก 3: แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) Staphylococcus aureus ในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี 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_2O	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 950 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7. 0± 0.2

1.2 Enrichment

1.2.1 1% potassium tellurite solution

potassium tellurite trihydrate	1.0	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 มิลลิลิตร ลงใน egg yolk emulsion 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1°C

การใช้งาน

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

2. 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_2HPO_4	0.3	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
Sodium pyruvate	0.3	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1 ลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

3. Brain heart infusion (BHI) broth

สูตร 1

Calf brain, infusion form	200	กรัม
Beef heart, infusion form	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 ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

สูตร 2

Brain heart-infusion	6	กรัม
Peptic digest of animal tissue	6	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Dextrose	3.0	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	14.5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

4. Coagulase plasma (rabbit) with EDTA ใช้ชนิดสำเร็จรูป

5. 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 แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 118°C 10 นาที pH 7.4 ± 0.2

6. 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 แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 118°C 10 นาที pH 7.4 ± 0.2

7. 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 ละลายฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที pH 7.3 ± 0.2

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

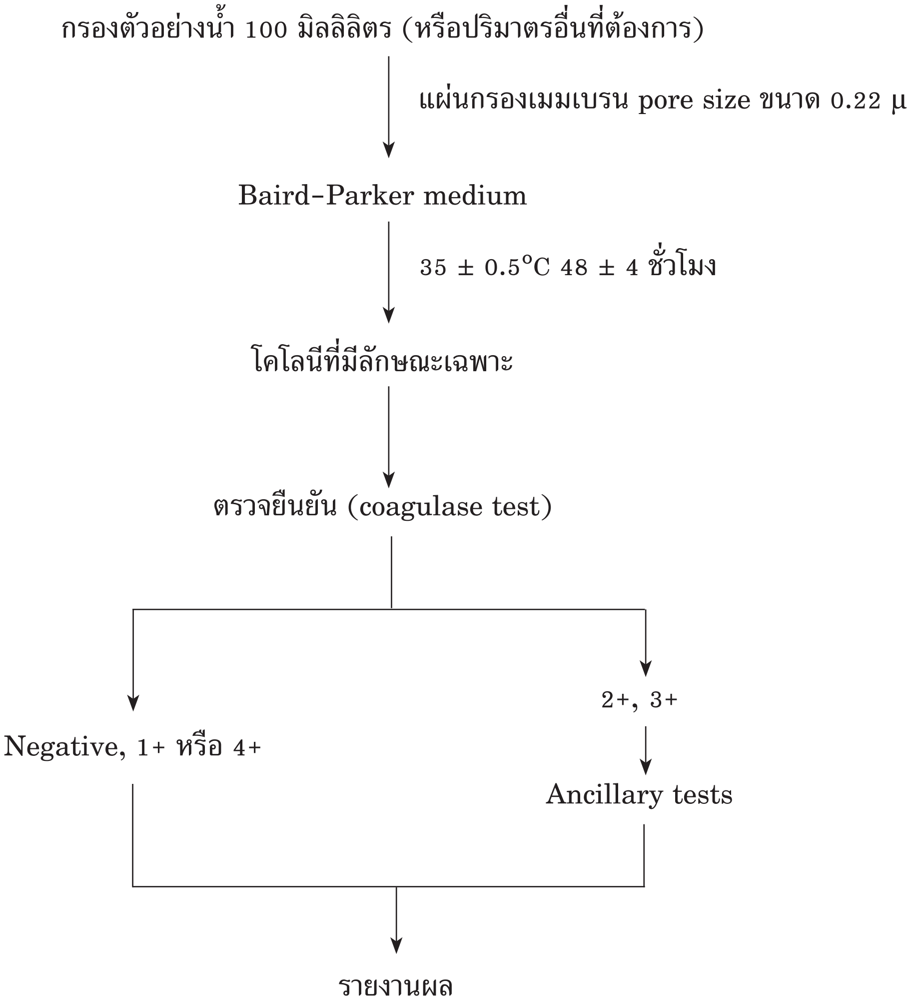
Deoxyribonucleic acid (DNA)	0.3	กรัม
Agar	10	กรัม
$CaCl_2$ (anhydrous)	1.1	มิลลิกรัม
NaCl	10	กรัม
Toluidine blue O	0.083	กรัม
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร pH 9.0 เติมส่วนประกอบอื่นๆ ลงไป ยกเว้น toluidine blue O ให้ความร้อนจน agar ละลาย และละลาย toluidine blue O ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากใช้ทันทีไม่จำเป็นต้อง sterile หากเข้าฆ่าเชื้อสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 4 เดือน

สารเคมี

1. 3% hydrogen peroxide solution ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



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

ภาคผนวก 3

กรองตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร (หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการ)

↓ แผ่นกรองเมมเบรน pore size ขนาด 0.22 μ

R2A agar

↓ 37 ± 0.5°C 24 ชั่วโมง

Baird-Parker medium

↓ 35 ± 0.5°C 24 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ

↓

ตรวจยืนยัน (coagulase test)

Negative, 1+ หรือ 4+

2+, 3+

↓

Ancillary tests

↓

รายงานผล

แผนภูมิที่ 2 การตรวจหา (detection) *Staphylococcus aureus* ในน้ำและน้ำแข็งโดยวิธี Two-plate

DMSc F 2008: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Cronobacter sakazakii* ในนมและผลิตภัณฑ์นม
Analytical Method of *Cronobacter sakazakii* in Milk and Milk Products

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Cronobacter sakazakii* ในนมดัดแปลงสำหรับทารก นมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก อาหารทารก อาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก และอาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Normative references)

2.1 ISO/TS 22964 | IDF/RM 210: 2006 (E). Milk and milk products-Detection of *Enterobacter sakazakii.*

2.2 API 20E Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious gram-negative rods. REF 20 100/20 160, 07584E-GB-2004/05.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 *C. sakazakii* = *Cronobacter sakazakii*

3.2 *E. sakazakii* = *Enterobacter sakazakii*

4. หลักการ (Principle)

C. sakazakii เดิมเรียก *E. sakazakii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเฉพาะบน chromogenic isolation agar โคโลนีบน tryptone soya agar มีสีเหลือง

การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดเหลว (non-selective broth) เพื่อให้ *C. sakazakii* ที่มีจำนวนน้อยหรือที่บาดเจ็บฟื้น

4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นขั้นตอนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดเหลว (selective broth) ซึ่งเติมสารยับยั้งเชื้ออื่น เพื่อให้ *C. sakazakii* ที่ฟื้นตัวสามารถเพิ่มจำนวนและเชื้ออื่นถูกยับยั้ง

4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar)

4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) ดูการสร้างรงควัตถุสีเหลือง (yellow pigment) บน tryptone soya agar และเลือกโคโลนีสีเหลือง ตรวจยืนยันทางชีวเคมี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 API 20E

5.1.2 Buffered peptone water (BPW)

5.1.3 *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA™)

5.1.4 L-Arginine dihydrolation medium

5.1.5 L-Lysine decarboxylation medium

5.1.6 L-Ornithine decarboxylation medium

5.1.7 Media for fermentation of carbohydrates (D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, D-melibiose, amygdaline)

5.1.8 Modified lauryl sulfate tryptose broth (mLST)/vancomycin medium

5.1.9 Simmons citrate medium

5.1.10 Tryptone soya agar (TSA)

5.1.11 Vancomycin solution

5.2 สารเคมี

5.2.1 Oxidase reagent

6. เครื่องมือและเครื่องใช้ (Equipment and materials)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 25 ± 1°C, 37 ± 1°C และ 44 ± 1°C

6.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.4 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44 ± 0.5°C และ 44-50°C

6.2 เครื่องใช้

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.4 ปิเปต (pipette)

6.2.5 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.6 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

เขย่าหรือคนตัวอย่างแต่ละภาชนะบรรจุให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาณเท่า ๆ กัน สุ่มตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ในกรณีที่ต้องการลดปริมาณงานสำหรับตัวอย่างรุ่นเดียวกันที่มีความเฉพาะเจาะจง (specified lot of food) สามารถนำตัวอย่างทดสอบรวมกันได้ (pooling the test portions) และตรวจวิเคราะห์ในคราวเดียวกันได้

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อขั้นต้น (pre-enrichment)

7.3.1 เติม BPW 90 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่างข้อ 7.1 ปล่อยให้ตัวอย่างกระจายตัว (disperse) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ต้องเขย่า 30 นาที ถ้าตัวอย่างละลายไม่หมดเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

7.3.2 บ่มที่ 37°C 18 ± 2 ชั่วโมง

7.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment)

7.4.1 ปิเปต 0.1 มิลลิลิตร จากข้อ 7.3 ใส่ใน mLST/vancomycin medium 10 มิลลิลิตร

7.4.2 บ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 44 ± 0.5°C 24 ± 2 ชั่วโมง

7.5 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (isolation)

7.5.1 นำเชื้อ (จากข้อ 7.4.2) ขีด (streak) บนจานเพาะเชื้อ ESIA™

7.5.2 บ่มที่ 44 ± 1°C 24 ± 2 ชั่วโมง

7.5.3 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 5 โคโลนี กรณีน้อยกว่า 5 โคโลนีให้เลือกทั้งหมด

- โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือโคโลนีมีสีเขียวถึงสีเขียวแกมน้ำเงิน ขนาดเล็กถึงปานกลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร

7.6 การตรวจยืนยัน (confirmation): ภาคผนวก 3

7.6.1 เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.5.3 ขีดบนจานเพาะเชื้อ TSA

7.6.2 บ่มที่ 25°C 44 - 48 ชั่วโมง

7.6.3 เลือกโคโลนีสีเหลืองบน TSA การสร้างรงควัตถุ ลักษณะโคโลนีบน TSA มีสีเหลือง

7.6.4 กรณีที่ไม่พบโคโลนีสีเหลือง ควรทดสอบต่อตามข้อ 7.6.5

หมายเหตุ: *C. sakazakii* บางสายพันธุ์อาจไม่สร้างรงควัตถุสีเหลืองหรืออาจสูญเสียรงควัตถุสีเหลืองเมื่อมีการถ่ายเชื้อ

7.6.5 ทดสอบทางชีวเคมี หรือใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

นำเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะบนจานเพาะเชื้อ TSA จากข้อ 7.6.3 ทดสอบทางชีวเคมีกับอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้

- Oxidase test

  นำเชื้อขีดบนกระดาษกรองที่หยด oxidase reagent (อย่าใช้ห่วงหรือเข็มเขี่ยเชื้อที่ทำด้วยเหล็กหรือนิโครม)

  ผลบวก: กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงชีด ม่วงหรือน้ำเงินเข้มภายใน 10 นาที

  ผลลบ: กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

  C. sakazakii ให้ผลลบ

- L-Lysine decarboxylation medium

  บ่มที่ 30°C 24 ± 2 ชั่วโมง

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

  C. sakazakii ให้ผลลบ

- L-Ornithine decarboxylation medium

  บ่มที่ 30°C 24 ± 2 ชั่วโมง

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

  C. sakazakii ให้ผลบวก

- L-Arginine dihydrolation medium

  บ่มที่ 30°C 24 ± 2 ชั่วโมง

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

  C. sakazakii ให้ผลบวก

- Carbohydrates (D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, D-melibiose, amygdaline)

  บ่มที่ 30°C 24 ± 2 ชั่วโมง

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  C. sakazakii ให้ผลบวก ยกเว้น D-sorbitol ให้ผลลบ

- Simmons citrate medium

  นำเชื้อขีดบนผิวหน้า (slant) บ่มที่ 30°C 24 ± 2 ชั่วโมง

  ผลบวก: อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

  ผลลบ: อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  C. sakazakii ให้ผลบวก

8. การรายงานผลการทดสอบ (Test report)

การตรวจหา (detection) รายงานเป็น

C. sakazakii/น้ำหนักหรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบหรือไม่พบ

9. รายละเอียดอื่น (Supplementary notes)

9.1 ภาคผนวก 1: อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

9.2 ภาคผนวก 2: แผนภูมิการตรวจหา (detection) *C. sakasakii* ในนมและผลิตภัณฑ์นม

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีการที่ผู้ผลิตระบุ

1. Buffered peptone water (BPW)

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	9	กรัม
Potassium dihygrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

2. *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA™)

Pancreatic peptone of casein	7	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Sodium desoxycholate	0.5	กรัม
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α-D-Glucopyranoside ($C_{14}H_{15}BrClNO_6$)	0.15	กรัม
Crystal violet	2	มิลลิกรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

3. L-Arginine dihydrolation medium

L-Arginine monohydrochloride ($C_6H_{14}N_4O_2$.HCL)	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

4. L-Lysine decarboxylation medium

L-Lysine monohydrochloride ($C_6H_{14}N_2O_2$.HCL)	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิเมตร

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

5. L-Ornithine decarboxylation medium

L-Ornithine monohydrochloride ($C_5H_{12}N_2O_2$.HCL)	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิเมตร

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

6. Media for fermentation of carbohydrates (D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, D-melibiose, amygdaline)

6.1 Basic medium

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Phenol red	0.02	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิเมตร

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

6.2 Carbohydrate solution (D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, D-melibiose, amygdaline)

Carbohydrate	8	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยการกรอง

การใช้งาน

เติมสารละลาย Carbohydrate solution (ข้อ 6.2) 125 มิลลิลิตร ลงใน Basic medium (ข้อ 6.1) 875 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ

7. Modified lauryl sulfate tryptose broth (mLST)/vancomycin medium

7.1 modified lauryl sulfate tryptose broth (mLST)

sodium chloride (NaCl)	34	กรัม
enzymatic digest of animal and plant tissue	20	กรัม
lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	5	กรัม
potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75	กรัม
dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75	กรัม
sodium lauryl sulfate ($C_{12}H_{25}NaO_5S$)	0.1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

7.2 Vancomycin solution

Vancomycin	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลาย vancomycin ในน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อโดยการกรอง เก็บที่ 0-5°C ได้นาน 15 วัน

7.3 mLST/vancomycin medium

เติมสารละลาย vancomycin (ข้อ 7.2) 0.1 มิลลิลิตร ลงใน mLST (ข้อ 7.1) 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ vancomycin/mLST เป็น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เก็บที่ 0-5°C ได้ 1 วัน

8. Simmons citrate medium

Sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7$)	2	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$)	1	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

9. Tryptone soya agar (TSA)

Enzymatic digest of casein	15	กรัม
Enzymatic digest of soya	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

สารเคมี

1. Oxidase reagent

N, N, N´, N´ - tetramethyl- *p* -phenylenediamine Dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2.2HCl$)	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

ภาคผนวก 2

ตัวอย่าง 10 กรัม + BPW 90 มิลลิลิตร

↓ 37°C 18 ± 2 ชั่วโมง
0.1 มิลลิลิตร

mLST/ vancomycin medium 10 มิลลิลิตร

↓ 44°C 24 ± 2 ชั่วโมง

ESIA™

↓ 44°C 24 ± 2 ชั่วโมง

โคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 5 โคโลนี
กรณีน้อยกว่า 5 โคโลนีให้เลือกทั้งหมด
เขี่ยเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ TSA

↓ 25°C 44 – 48 ชั่วโมง

โคโลนีสีเหลือง

↓

ทดสอบทางชีวเคมี หรือใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

↓

แปลผล

↓

รายงานผล

แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *C. sakazakii* ในนมผงและอาหารสูตรสำหรับทารกชนิดผงหรือแห้ง

ภาคผนวก 3

ตารางที่ 1: ผลการตรวจยืนยันทางชีวเคมีของ *C. sakazakii*

Confirmatory test	Positive or negative reaction	Percent of *C. sakazakii* strains showing the reaction
Production of yellow pigment	+	> 99
Oxidase	–	> 99
L–Lysine decarboxylase	–	> 99
L–Ornithine decarboxylase	+	± 90
L–Arginine dihydrolase	+	> 99
Acid from		
– fermentation of D–sorbitol	–	± 95
– fermentation of L–rhamnose	+	> 99
– fermentation of D–sucrose	+	> 99
– fermentation of D–melibiose	+	> 99
– fermentation of amygdaline	+	> 99
– hydrolysis of citrate	+	> 95

คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ที่ 224/2554

คณะทำงานวิชาการกำหนดหลักเกณฑ์และเงื่อนไขในการคัดเลือกวิธีวิเคราะห์อาหาร

คณะที่ 1

1.	ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร	ที่ปรึกษาคณะทำงาน
2.	นางเพ็ญศรี รอดมา	ประธานคณะทำงาน
3.	นางลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์	คณะทำงาน
4.	นายปรีชา จึงสมานุกูล	คณะทำงาน
5.	นางกนกพร อธิสุข	คณะทำงาน
6.	นางสาวทิพวรรณ นิ่งน้อย	คณะทำงาน
7.	นายทนงพันธ์ สัจจปาละ	คณะทำงาน
8.	นางสาวอุรารัตน์ วุฒิกรภัณฑ์	คณะทำงาน
9.	นางอุมา บริบูรณ์	คณะทำงาน
10.	นางนิภาภรณ์ ลักษณ์สมยา	คณะทำงาน
11.	นางลดาพรรณ แสงคล้าย	คณะทำงาน
12.	นางวันทนีย์ ขำเลิศ	คณะทำงาน
13.	นางลดาวัลย์ จึงสมานุกูล	คณะทำงาน
14.	นางนิตยา พันธุ์บัว	คณะทำงานและเลขานุการ
15.	นางปวีณา พานิชกุล	คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ