วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 4

Standard Methods for Food Analysis

Volume IV

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
www.dmsc.moph.go.th

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4

Standard Methods for Food Analysis Volume IV

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

วิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์อาหาร

เล่มที่ 4

Standard Methods for Food Analysis

Volume IV

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 4

Standard Methods for Food Analysis, Volume IV

รหัส : DMScBQSF-201601-A

พิมพ์ครั้งที่ 1 : กรกฎาคม 2559 จำนวน 1,000 เล่ม

ISBN: 978-616-11-2979-8

สงวนลิขสิทธิ์

จัดพิมพ์เผยแพร่โดย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี

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

โทรศัพท์/โทรสาร 0 2951 1021

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

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด สาขา 4

44/16-17 ถนนเลี่ยงเมืองฯ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

โทรศัพท์ 0-2525-4807-9

โทรสาร 0-2525-4855

คำปรารภ

การวิเคราะห์คุณภาพอาหารทางห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ในการกำกับดูแล ควบคุมคุณภาพอาหารให้ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดกฎหมาย และใช้เป็นหลักฐานทางคดีในกรณีที่คุณภาพอาหารไม่เป็นไปตามมาตรฐานกำหนด หรือเมื่อเกิดปัญหาความขัดแย้ง ด้านคุณภาพความปลอดภัยอาหาร ทั้งในระดับประเทศ และต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์อาหารของประเทศไทยให้เป็นวิธีมาตรฐานเดียวกัน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการสร้างความเชื่อถือ และการยอมรับในระดับนานาชาติ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เป็นหน่วยงานในสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO 9001:2015, ISO/IEC 17043:2010, ISO/IEC 17025:2005 และเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านการตรวจสอบรับรองคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร มีอำนาจหน้าที่ในการกำหนดมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ และพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการ จึงได้จัดทำวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหารอย่างต่อเนื่องมาแล้วจำนวน 3 เล่ม เล่มนี้เป็นเล่มที่ 4 มีการกำหนดวิธีมาตรฐานเพิ่มขึ้นทั้งด้านเคมี จุลชีววิทยา กายภาพ และชีวโมเลกุล เพื่อให้หน่วยงานในสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ห้องปฏิบัติการภาครัฐและเอกชน ผู้ประกอบการอาหาร สถาบันการศึกษา และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง นำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐาน และอ้างอิงในการวิเคราะห์คุณภาพความปลอดภัยอาหารของประเทศไทยต่อไป

(นายแพทย์อภิชัย มงคล)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
25 เมษายน 2559

สารบัญ

หน้า

วิธีมาตรฐานทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ **9**

นิยามและคำย่อ **11**

รหัสวิธี **13**

DMSc F 1055: การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองโดย Kjeldahl method 15

DMSc F 1056: การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในเนย 23

DMSc F 1057: การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในเนย 27

DMSc F 1058: การตรวจวิเคราะห์ไขมันในเนยโดยการคำนวณ 31

DMSc F 1059: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในครีม 33

DMSc F 1060: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในกะทิและผลิตภัณฑ์ 37

DMSc F 1061: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในกะทิและผลิตภัณฑ์ 41

DMSc F 1062: การทดสอบน้ำมันแร่ในน้ำมันและไขมัน 45

DMSc F 1063: การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในเกลือบริโภคที่เสริมไอโอเดต โดยวิธีไตเตรชั่น 47

DMSc F 1064: การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์และตับโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 51

DMSc F 1065: การตรวจวิเคราะห์แรคโตพามีนในเนื้อสัตว์และตับโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 61

DMSc F 1066: การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลตกค้างในอาหาร โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 67

หน้า

DMSc F 1067: การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol) ในเนื้อสัตว์และตับ โดยเทคนิค LC-MS/MS 75

DMSc F 1068: การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล ในเนื้อสัตว์ โดยเทคนิค LC-MS/MS 87

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ **95**

นิยามและคำย่อ **97**

รหัสวิธี **97**

DMSc F 2020: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Shigella* spp. ในอาหาร 99

DMSc F 2021: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Escherichia coli* O157 ในอาหาร 121

DMSc F 2022: วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterobacteriaceae ในอาหาร 133

DMSc F 2023: วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterococci ในอาหาร 139

DMSc F 2024: วิธีตรวจวิเคราะห์ mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 30˚C 151

DMSc F 2025: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในน้ำและน้ำแข็ง 161

วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ **175**

รหัสวิธี **176**

DMSc F 3003: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (ภายนอก) ในเมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืช 177

หน้า

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุลสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ **181**

รหัสวิธี **182**

DMSc F 4010: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from Genetically modified GTS 40-3-2 (Roundup Ready® soya beans) by means of Polymerase Chain Reaction 183

DMSc F 4011: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Bt11 maize by means of Polymerase Chain Reaction 189

DMSc F 4012: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Event176 (Bt176) maize by means of Polymerase Chain Reaction 195

DMSc F 4013: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified T25 maize by means of Polymerase Chain Reaction 201

DMSc F 4014: Event-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified MON810 maize by means of Polymerase Chain Reaction 207

ภาคผนวก

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1 213

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2 215

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3 217

วิธีมาตรฐานทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

1. นางกนกพร อธิสุข	ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมาตรฐานของอาหาร (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)
2. นางนิภาภรณ์ ลักษณ์สมยา	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
3. นางสาวสุวรรณี ธีรภาพธรรมกุล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
4. นางกัญญา พุกสุ่น	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
5. นางสาวปุษยา แสงวิรุฬห์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
6. นางสาวจิตผกา สันทัดรบ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
7. นางสาวอรุณี ดนุดล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
8. นางสาวกรรณิกา จิตติยศรา	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

1. "H_2O" หมายถึง น้ำกลั่น (distilled water) ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ
2. สารเคมี (reagents) ทั้งหมดเป็น reagent grade ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ
3. กรด และด่าง หมายถึง กรด และด่าง ที่มีความเข้มข้นดังในตาราง ยกเว้นที่กำหนดไว้เฉพาะในวิธีนั้นๆ

	ความเข้มข้น
Sulfuric acid	95.0-98.0% H_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

Abbreviation	Word/คำเต็ม
kg	kilogram
L	liter
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
MΩ	megaohm
N	Normal
ng	nanogram
-OAc	acetate
-OCN	cyanate
od	outer diameter or dimension
ppm	part per million
rpm	round per minute
ppb	part per billion
v/v	Volumeper 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 1055	ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง	ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีน (Nitrogen contents and protein)	I	15
DMSc F 1056	เนย	ความชื้น (moisture)	I	23
DMSc F 1057	เนย	ของแข็งไม่รวมไขมัน (Non fat solid)	I	27
DMSc F 1058	เนย	ไขมัน (Fat)	I	31
DMSc F 1059	ครีม	ไขมัน (Fat)	I	33
DMSc F 1060	กะทิ และผลิตภัณฑ์	ไขมัน (Fat)	I	37
DMSc F 1061	กะทิ และผลิตภัณฑ์	ของแข็งทั้งหมด (Total solids)	I	41
DMSc F 1062	น้ำมันและไขมัน	น้ำมันแร่ (Mineral oil)	III	45
DMSc F 1063	เกลือบริโภคที่เสริมไอโอเดต	ไอโอดีน (Iodine)	II	47
DMSc F 1064	เนื้อสัตว์ ตับ	สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (Beta Agonists - Screening test by ELISA technique)	III	51
DMSc F 1065	เนื้อสัตว์ ตับ	แรคโตพามีน (Ractopamine - Screening test by ELISA technique)	III	61
DMSc F 1066	เนื้อสัตว์ นม ไข่ และน้ำผึ้ง	คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol - Screening test by ELISA technique)	III	67
DMSc F 1067	เนื้อสัตว์ ตับ	บรอมบิวเทอรอล เคลนบิวเทอรอล แรคโตพามีน และซาลบิวเทอมอล (Brombuterol, Clenbuterol,	III	75

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	สารที่ต้องการวัด	Method Type	หน้า
		Ractopamine and Salbutamol - Quantitative analysis by LC-MS/MS)		
DMSc F 1068	เนื้อสัตว์ นม ไข่ เนยแข็ง และน้ำผึ้ง	คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol - Quantitative analysis by LC-MS/MS)	III	87

DMSc F 1055: **การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง โดย Kjeldahl method**

Determination of nitrogen contents and protein in seasoning soy sauce by the Kjeldahl method

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง เช่น ซอสปรุงรส ซีอิ๊ว ซีอิ๊วหวาน

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.

2.4 นิภาภรณ์ ลักษณ์สมยา และ จินตนา กิจเจริญวงศ์. การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองโดยการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ. ว กรมวิทย พ 2558 ฉบับพิเศษ 1: 67-74.

3. หลักการ (Principle)

โปรตีนในตัวอย่างถูกย่อยใน H_2SO_4 ใช้ $CuSO_4.5H_2O$ เป็น catalyst และ K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของ K_2SO_4 ไนโตรเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเกลือแอมโมเนียม เติม NaOH มากเกินพอ และกลั่นด้วยไอน้ำ NH_3 ถูกจับไว้ใน H_3BO_3 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยการไทเทรตด้วยหลักการเดียวกันสามารถดำเนินการได้ 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 flasks – Kjeldahl flask ขนาด 500 หรือ 800 ml ที่มีจุกยาง สามารถต่อกับ trap ที่ป้องกัน NaOH ล้นระหว่างการกลั่น และต่อกับ condenser ใช้ graduated Erlenmeyer titration flask ขนาด 500 ml เก็บ distillate

4.4 Digestion/distillation system – Traditional apparatus สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

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

Block digestion/Steam distillation method

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 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)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

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 ด้วยน้ำเจือจางจนครบปริมาตร 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 หยดจะได้สารละลายสีส้มอ่อน นำไปไทเทรตกับ 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 ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปไทเทรตต่อกับ 0.1000 M HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม บันทึกปริมาตรรวมของ 0.1000 M HCl ที่ใช้ไทเทรต 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 ที่ใช้ไทเทรต (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 (Sample preparation)

สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วย เทผสมลงในภาชนะสะอาด ให้ได้ปริมาตรรวมประมาณ 200-300 ml คนหรือกวนหรือเทกลับไปมา ให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

Traditional method

7.1 ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใส่ใน beaker ประมาณ 1-2 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 หลังจากนั้น ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 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 หลังจากนั้น เขย่าอย่างแรงเพื่อให้สารละลายผสมกัน ให้ความร้อนจนกระทั่ง NH_3 ถูกกลั่นออกมา ($\geq$ 150 ml distillate หรือ $\geq$ 200 ml total volume) ระหว่างกลั่นต้องเฝ้าดูตลอดเวลา เนื่องจากอาจเกิดการ bump ที่จุดนี้ เมื่อการกลั่นสมบูรณ์ ยก receiving flask ออก หยุดให้ความร้อน ไทเทรต 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 ไทเทรต 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 ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (ml)

V_B = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไทเทรต blank (ml)

M = Molarity ของ HCl solution

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 คำนวณปริมาณโปรตีนจากสูตร

โปรตีน (g/100 g) = ไนโตรเจน × 6.25

โดย 6.25 คือ factor ในการคำนวณปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมดในซอสปรุงรส

8.3 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไม่เกินเกณฑ์ดังนี้

8.3.1 ตัวอย่างที่มีโปรตีน ตั้งแต่ 10 กรัมต่อ 100 กรัม ค่าต่างกันไม่เกิน 0.5 กรัมต่อ 100 กรัม

8.3.2 ตัวอย่างที่มีโปรตีน ตั้งแต่ 4 กรัมต่อ 100 กรัม แต่ไม่ถึง 10 กรัมต่อ 100 กรัม ค่าต่างกันไม่เกิน 0.2 กรัมต่อ 100 กรัม

8.3.3 ตัวอย่างที่มีโปรตีนน้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 กรัม ค่าต่างกันไม่เกิน 0.1 กรัมต่อ 100 กรัม

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 และไทเทรต เช่นเดียวกับตัวอย่าง recovery ที่ได้ควรมีค่าระหว่าง 98-101% โดย lysine monohydrochloride มีไนโตรเจน = 15.34% และ tryptophan มีไนโตรเจน = 13.72% ถ้าค่า recovery ที่ได้ต่ำกว่า 98% ให้ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจนในข้อ 9.3

9.2 ทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไทเทรต

ชั่ง ammonium sulfate (อบที่ 102˚C นาน 3 hr เก็บใน desiccator) 0.12 g ลงในหลอดย่อย นำไปกลั่นและไทเทรต 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 และไทเทรต เช่นเดียวกับตัวอย่าง 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 ผล Collaborative study แสดงเป็นปริมาณโปรตีน (N × 6.25)

	Sample 1	**Sample 2**	**Sample 3**	**Sample 4**	**Sample 5**
Laboratories remaining after eliminating outliers (outlier)	11(0)	10(1)	10(1)	11(0)	10(0)
Mean value, g/100g	10.26	11.76	5.93	8.85	1.82
Repeatability standard deviation, S_r, g/100g	0.16	0.08	0.06	0.05	0.03
Repeatability relative standard deviation, RSD_r, %	1.60	0.71	0.94	0.57	1.72
Repeatability limit, r (=2.8S_r), g/100g	0.46	0.23	0.16	0.14	0.09
Reproducibility standard deviation, S_R, g/100g	0.21	0.16	0.09	0.13	0.07
Reproducibility relative standard deviation, RSD_R, %	2.06	1.39	1.49	1.44	3.78
Reproducibility limit, R (=2.8S_R), g/100g	0.59	0.46	0.25	0.36	0.19

10.2 ถ้า blank มีสีชมพูก่อนการไทเทรต แสดงว่าอาจเกิดข้อผิดพลาด เช่น titration vessel ไม่สะอาด ให้เปลี่ยน blank ใหม่

10.3 สาเหตุ และการแก้ไขข้อผิดพลาดต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้น

10.3.1 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

10.3.2 ระหว่างการกลั่น และการไทเทรต

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

DMSc F 1056: การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในเนย
Determination of moisture content in butter

1. ขอบข่าย (Scope)
ใช้วิเคราะห์ปริมาณความชื้นในเนย

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)
ISO 3727-1/IDF 80-1:2001, 1st edition, 2001-12-15. Part 1: Butter-Determination of moisture content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)
ตัวอย่างถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนด น้ำหนักที่หายไปคือความชื้น

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)
4.1 เครื่องชั่งละเอียด (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 ถ้วยอะลูมิเนียม (flat bottom aluminium dish) od ≥ 5 cm
4.6 quartz sand หรือ acid washed sea sand ขนาด 100 - 315 μm

5. สารเคมี
-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)
6.1 การสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ให้ตัดแบ่งเป็น 4 ส่วน เก็บสองส่วนที่อยู่ตรงข้ามกัน (จนได้ตัวอย่างประมาณ 250 g) ใส่ในขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝาให้สนิท ห่อขวดแก้วด้วย

กระดาษเพื่อกันแสง ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กให้เก็บในภาชนะบรรจุเดิมประมาณ 50-100 g หรือใส่ในขวดปากกว้าง เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8˚C

6.2 นำตัวอย่างที่เก็บไว้ออกจากตู้เย็น หลอมเนยโดยแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ ≤ 39˚C (อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 24-30˚C) ขณะหลอมให้เขย่าขวดบ่อย ๆ เอาออกจากอ่างน้ำร้อน เขย่าขวดอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 เตรียมถ้วยอะลูมิเนียม : เขียนรหัสบนถ้วยอะลูมิเนียมที่มีทรายอยู่ประมาณ 10 g พร้อมแท่งแก้ว อบในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2˚C เป็นเวลา 2 hr เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 g ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่เตรียมไว้ (7.1) บันทึกน้ำหนัก (W_2) คลุกตัวอย่างกับทรายให้เข้ากัน และเกลี่ยให้ทั่วถ้วยอะลูมิเนียม นำไปอบในตู้อบร้อนที่ 102 ± 2˚C เป็นเวลา 2 hr เอาออกจากตู้อบร้อน เก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก และ อบอีกครั้งละ 30 min จนได้น้ำหนักคงที่ (W_3)

7.3 วิเคราะห์ blank โดยปฏิบัติตามข้อ 7.1 และ 7.2 แต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

ปริมาณความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก) = $(W_2 - W_3 - W_B) \times 100/W$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม แท่งแก้วและทราย หลังอบ (g)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม แท่งแก้ว ทรายหลังอบและตัวอย่างก่อนอบ (g)

W_3 = น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม แท่งแก้ว ทราย และตัวอย่างหลังอบ (g)

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

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g) = $W_2 - W_1$

8.2 รายงานปริมาณความชื้นในหน่วย ร้อยละของน้ำหนัก หรือกรัมต่อ 100 กรัม (g/100g) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง ปริมาณความชื้นในตัวอย่าง 100 g ต่างกันไม่เกิน 0.1g

10. รายละเอียดอื่น

10.1 น้ำหนักคงที่ หมายถึงน้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้ง ติดต่อกันต่างกันไม่เกิน 0.001 g หรือเมื่อน้ำหนักที่ชั่งได้เพิ่มขึ้น และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.2 ให้ใช้ tong หรือสวมถุงมือที่สะอาดจับถ้วยอะลูมิเนียม

10.3 ในการวิเคราะห์นี้ใช้ quartz sand หรือ acid washed sea sand ขนาด 100-315 μm แทนการใช้ Pumice stone, granular, with diameter between 0.8 mm and 8 mm

DMSc F 1057: การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในเนย
Determination of non-fat solids content in butter

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในเนย

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 3727-2/IDF 80-2: 2001, 1st edition, 2001-12-15. Part 2: Butter-Determination of non-fat solids content (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

สกัดไขมันออกจากตัวอย่างที่ได้ระเหยน้ำออกแล้ว ส่วนที่เหลืออยู่คือของแข็งไม่รวมไขมัน ในกรณี เนย (butter) หรือเนยจืด (unsalted butter) ของแข็งไม่รวมไขมัน คือธาตุน้ำนมไม่รวมไขมัน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่งละเอียด (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 ถ้วยอะลูมิเนียม (flat bottom aluminium dish) od ≥ 5 cm

4.6 filter crucible ทำจาก sintered glass (fritted glass crucible, gooch) pore diameters 16 to 40 μm (No.3) with suction flask

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.1 Petroleum ether (boiling range 30-60°C)

5.2 10% NH_4OH

5.3 conc. H_2SO_4

5.4 cleaning solution: ละลาย Sodium dichromate ($Na_2Cr_2O_7$) 92 g หรือ Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ใน H_2O 458 ml ค่อย ๆ เติม H_2SO_4 800 ml คนด้วยแท่งแก้ว (ควรเตรียมในตู้ดูดควันเพราะอาจมีไอร้อนเกิดขึ้น)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 การสุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ให้ตัดแบ่งเป็น 4 ส่วน เก็บสองส่วนที่อยู่ตรงข้ามกัน (จนได้ตัวอย่างประมาณ 250 g) ใส่ในขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝาให้สนิทห่อขวดแก้วด้วยกระดาษเพื่อกันแสง ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กให้เก็บในภาชนะบรรจุเดิมประมาณ 50-100 g หรือใส่ในขวดปากกว้าง เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8˚C

6.2 นำตัวอย่างที่เก็บไว้ออกจากตู้เย็น หลอมเนยโดยแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ ≤39˚C (อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 24-30˚C) ขณะหลอมให้เขย่าขวดบ่อยๆ เอาออกจากอ่างน้ำร้อน เขย่าขวดอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยกระเบื้อง แท่งแก้ว และ fritted glass crucible อบถ้วยกระเบื้อง แท่งแก้ว และ fritted glass crucible ในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2˚C เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องใน desiccator (ประมาณ 30-45 min) ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมแท่งแก้ว และ fritted glass crucible (W_0)

7.2 ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องและแท่งแก้วในข้อ 7.1 (W_1)

7.3 ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 g ลงในถ้วยกระเบื้องที่เตรียมไว้ในข้อ 7.2 บันทึกน้ำหนัก (W_2) ตั้งบนอ่างน้ำร้อนโดยคนตัวอย่างเสมอๆ เป็นเวลา 30 min อบตัวอย่างในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2˚C เป็นเวลา 30 min ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง

7.4 เติม petroleum ether ที่อุ่น (ประมาณ 25˚C) 15 ml ลงในตัวอย่างในข้อ 7.3 เพื่อละลายไขมันแล้วใช้แท่งแก้วคนให้ petroleum ether สัมผัสกับสารในถ้วย (ดูว่า petroleum ether ละลายไขมันจนหมด) เท petroleum ether ที่ละลายไขมันลงใน fritted glass crucible (ใช้ suction ช่วยในการกรอง)

7.5 ทำซ้ำในข้อ 7.4 อีก 4 ครั้ง หรือมากกว่า จนสังเกตว่าไม่มีไขมันติดอยู่ที่ถ้วยกระเบื้อง เทสารในถ้วยกระเบื้องลงใน fritted glass crucible จนหมด

7.6 ล้างสิ่งที่ติดอยู่ใน fritted glass crucible ด้วย petroleum ether ที่อุ่นประมาณ 25 ml (ไม่ใช้ suction)

7.7 อบถ้วยกระเบื้องพร้อมแท่งแก้ว และ fritted glass crucible ในตู้อบที่ 102 ± 2 ˚C เป็นเวลา 30 min ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก

7.8 ทำซ้ำในข้อ 7.7 จนได้น้ำหนักคงที่ (W_3)

7.9 ทำ blank โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่างแต่ไม่ต้องใช้ตัวอย่าง ค่าที่ได้จะต้องน้อยกว่า 0.0004 g

หมายเหตุ : อบจนได้น้ำหนักคงที่ หมายถึง เมื่อนำไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต้องต่างกันไม่เกิน 0.001 g หรือได้น้ำหนักเพิ่มขึ้น และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยในการคำนวณ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมัน} = \frac{(W_3 - W_0) \times 100}{(W_2 - W_1)}$$

เมื่อ W_0 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมแท่งแก้วและ fritted glass crucible

W_1 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมแท่งแก้ว

W_2 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมแท่งแก้ว และตัวอย่าง

W_3 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมแท่งแก้วและ fritted glass crucible ที่มีสารที่เหลืออยู่

8.2 รายงานปริมาณ ของแข็งไม่รวมไขมัน และธาตุน้ำนมไม่รวมไขมัน ในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก และรายงานทศนิยม 2 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกตัวอย่าง ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในตัวอย่าง 100 g ต่างกันไม่เกิน 0.15 g

10. รายละเอียดอื่น

10.1 การล้าง fritted glass crucible

fritted glass crucible ใหม่ที่ยังไม่เคยใช้งาน : ล้างโดยการ suction ด้วย HCl ที่ร้อน และล้างด้วย H_2O ให้สะอาด อาจจะล้างโดยกลับด้านของ crucible ด้วย

10.2 ก่อนทำการวิเคราะห์ แช่ใน cleaning solution ประมาณ 1 hr แล้วล้างให้สะอาดด้วย H_2O (โดยแช่ใน H_2O และล้าง 2-3 ครั้ง อาจจะล้างโดยใช้ suction ช่วย และล้างโดยกลับด้าน fritted crucible) เผา fritted glass crucible ในเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 500˚C หลังจากทิ้งให้เย็น แล้วล้างใน H_2O อีก 2-3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง

10.3 หลังการวิเคราะห์ ล้าง fritted glass crucible ทันที โดยมีขั้นตอนดังนี้

10.3.1 เอาสารตกค้าง (ตะกอนต่าง ๆ) ที่อยู่ใน fritted glass crucible ออกให้หมด (อาจใช้แปรงถูเพียงเบา ๆ มิฉะนั้น fritted อาจเสียหายได้ และล้างด้วยน้ำประปา)

10.3.2 แช่ fritted glass crucible ใน conc H_2SO_4 โดยแช่ไว้ค้างคืน

10.3.3 ล้าง fritted glass crucible โดยแช่ใน H_2O, dil NH_4OH (ประมาณ 10%) และใน H_2O ตามลำดับ

10.3.4 ล้างด้วย H_2O โดยใช้ suction 3 ครั้ง

10.3.5 เผาในเตาเผาที่ 500˚C เป็นเวลา 5 hr ทิ้งให้เย็นและนำมาล้างด้วย H_2O อีก 3 ครั้ง โดยการ suction

10.3.6 ทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บไว้ในที่ปลอดจากฝุ่นและแมลง เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

DMSc F 1058: การตรวจวิเคราะห์ไขมันในเนยโดยการคำนวณ
Determination of fat in butter

1. ขอบข่าย (Scope)

เพื่ออธิบายวิธีการคำนวณปริมาณไขมันในเนย โดยคำนวณจากปริมาณความชื้น และปริมาณของแข็งไม่รวมไขมัน

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 3727-3. IDF 80-3, 1st edition, 2003-02-01. Part 3: Butter-Calculation of fat content

3. หลักการ (Principle)

สกัดไขมันออกจากตัวอย่างที่ได้ระเหยน้ำออกแล้ว ส่วนที่เหลืออยู่คือของแข็งไม่รวมไขมัน คำนวณปริมาณไขมันในตัวอย่าง โดยการนำปริมาณน้ำ และของแข็งไม่รวมไขมันลบออกจาก 100

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

-

5. สารเคมี (Reagent)

-

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

-

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ ISO 3727-1. IDF 80-1 และวิเคราะห์ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันตามวิธีของ ISO 3727-2. IDF 80-2 ในตัวอย่าง นำมาคำนวณปริมาณไขมัน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

ไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = 100 – M – SNF

เมื่อ M = ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

SNF = ของแข็งไม่รวมไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

8.2 รายงานผลปริมาณไขมัน หน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

DMSc F 1059: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในครีม
Determination of fat content in milk

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในครีม โดยใช้หลักการ Roese-Gottlieb

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 2450: 2008(E)/IDF16: 2008(E). Cream - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)

3. หลักการ (Principle)

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

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (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)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

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)

6.1 การสุ่มตัวอย่าง ให้สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วย เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด (ให้ได้ตัวอย่าง ประมาณ 200-300 ml) คนให้เข้ากัน ปิดปากขวดให้สนิท เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 ºC

6.2 การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างที่สุ่มไว้ออกจากตู้เย็น อุ่นตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35-40 ºC (ยกเว้นตัวอย่างครีมเปรี้ยว) ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงพลิกขวดกลับไปมา หรือคน หรือกวนตัวอย่างด้วยวัสดุที่สะอาด เพื่อให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การเตรียมถ้วยระเหย อบถ้วยระเหยในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2˚C เป็นเวลา 1 hr เอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งในโถดูดความชื้น (ประมาณ 1 hr) ชั่งน้ำหนัก (W_1)

7.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-5 g (ให้มีไขมันระหว่าง 0.3-0.6 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 เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 min เติม petroleum ether 25 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหย ระเหย solvent ออกจากไขมันโดยตั้งถ้วยระเหยบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-60˚C

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

7.5 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 3 โดยการเติม diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 min เติม petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 min ตั้งทิ้งให้

แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหย 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 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 = น้ำหนักสารที่เหลืออยู่ ที่ได้จากการวิเคราะห์ blank = $W_{B2} - W_{B1}$ (g)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

8.2 รายงานปริมาณไขมันในหน่วย กรัมต่อ 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 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณไขมันในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไม่เกินเกณฑ์ดังนี้

10.1.1 ตัวอย่างที่มีไขมัน ไม่เกิน 20 g/100 g ค่าต่างกันไม่เกิน 0.1 g/100 g

10.1.2 ตัวอย่างที่มีไขมัน มากกว่า 20 g/100 g ค่าต่างกันไม่เกิน 0.4 g/100 g

10.2 ทดสอบ peroxide ใน diethyl ether โดยการปิเปต diethyl ether 10 ml ลงใน cylinder ชนิดที่มีจุกปิดซึ่งผ่านการ rinse ด้วย diethyl ether เติมสารละลาย 10% KI 1 ml เขย่า และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 min จะต้องไม่เกิดสีเหลืองในชั้นของ diethyl ether ทดสอบเมื่อเปิดใช้งานครั้งแรก ทดสอบครั้งต่อไปสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

10.3 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่าย จึงควรทำในที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้

10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน

DMSc F 1060: การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในกะทิและผลิตภัณฑ์
Determination of fat content in coconut milk and products

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันในกะทิและผลิตภัณฑ์ ตามมาตรฐานโคเด็กซ์ (CODEX STAN 240-2003: Codex standard for aqueous coconut products - coconut milk and coconut cream) ได้แก่ กะทิชนิดเจือจาง (light coconut milk) กะทิ (coconut milk) ครีมกะทิ (coconut cream) และกะทิผง (coconut powder) โดยใช้หลักการ Roese-Gottlieb

2. เอกสารอ้างอิง (Reference).

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

2.2 Lakshanasomya N, Danudol A, Ningnoi T. Method performance study for total solids and total fat in coconut milk and products. Journal of Food Composition and Analysis 2012; 24: 650-655.

3. หลักการ (Principle)

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

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (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 Fat-extraction flasks ชนิดมีจุกปิดที่ทำด้วยวัสดุที่ไม่มีผลต่อ solvent ที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น PTFE

4.5 ถ้วยระเหย (evaporating dish) ขนาดความจุประมาณ 125 ml

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

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)

6.1 กะทิผงให้สุ่มตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของภาชนะบรรจุให้ได้ประมาณ 250 g เก็บในขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝาขวดให้แน่น กวน คน ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 กะทิชนิดเหลวให้สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วย เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด (ให้ได้ตัวอย่าง ประมาณ 200-300 ml) คนให้เข้ากัน นำไปตรวจวิเคราะห์ทันที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

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

7.2 ชั่งตัวอย่าง กะทิชนิดเจือจาง 6 g หรือกะทิ 3 g หรือครีมกะทิ 2 g หรือกะทิผง 1 g (ให้มีไขมันระหว่าง 0.3-0.6 g) ลงใน beaker บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) ถ่ายตัวอย่างลงใน extracting flask โดยใช้น้ำร้อนประมาณ 4-9 ml (ให้ได้ปริมาตรรวม 10 ml) เติม ammonia solution 2 ml ผสมให้เข้ากัน เติม ethanol 10 ml ผสมให้เข้ากัน

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

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

7.5 สกัดไขมันออกจากตัวอย่างครั้งที่ 3 โดยการเติม diethyl ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 min เติม petroleum ether 15 ml ปิดจุก เขย่าอย่างแรงประมาณ 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น เทชั้น organic solvent ลงในถ้วยระเหย 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 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 = น้ำหนักสารที่เหลืออยู่ ที่ได้จากการวิเคราะห์ blank = $W_{B2} - W_{B1}$ (g)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

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

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

วิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ในทุกตัวอย่าง

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ในการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (duplicate) ปริมาณไขมันในตัวอย่าง 100 g ควรต่างกันไม่เกิน 0.5 g (น้ำกะทิชนิดเจือจาง), 1.0 g (น้ำกะทิ) 1.0 g (ครีมกะทิ) และ 0.5 g (กะทิผง)

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 อบถ้วยระเหยจนได้น้ำหนักคงที่หมายถึง เมื่อนำถ้วยระเหยไปอบซ้ำที่สภาวะเดิมนาน 30 min น้ำหนักที่ได้จากการอบ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 g และให้ใช้น้ำหนักของค่าที่น้อยกว่าในการคำนวณ

10.4 ether เป็นสารที่ระเหยง่าย และมีอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ จึงควรทำการวิเคราะห์ในตู้ดูดควัน และเนื่องจากสารทั้งสองติดไฟง่าย จึงควรทำในที่ไม่มีเปลวไฟอยู่ใกล้

10.5 ไขมันที่สกัดได้จะต้องใส ไม่มีสิ่งอื่นเจือปน

10.6 ผล collaborative study

Test material	**Light coconut milk**		**Coconut milk**		**Coconut cream**		**Coconut milk powder**	
Laboratories remaining after eliminating outliers	15	13	16	16	13	-	13	14
Mean value, %	5.88	8.28	16.85	21.83	23.02	-	42.90	42.44
Repeatability standard deviation, S_r, %	0.03	0.16	0.76	0.23	0.28	-	0.11	0.17
Repeatability relative standard deviation, RSD_r, %	0.59	1.88	4.49	1.04	1.22	-	0.26	0.41
Repeatability limit, r (=2.8S_r),%	0.10	0.44	2.12	0.63	0.79	-	0.31	0.49
Reproducibility standard deviation, S_R, %	0.16	0.15	0.89	0.74	0.46	-	0.34	0.40
Reproducibility relative standard deviation, RSD_R, %	2.70	1.77	5.30	3.40	2.02	-	0.80	0.94
Reproducibility limit, R (=2.8S_R), %	0.44	0.41	2.50	2.08	1.30	-	0.97	1.11

DMSc F 1061: การวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมดในกะทิและผลิตภัณฑ์ Determination of total solids content in coconut milk and products

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดในกะทิและผลิตภัณฑ์ ตามมาตรฐาน โคเด็กซ์ (CODEX STAN 240-2003: Codex standard for aqueous coconut products - coconut milk and coconut cream) ได้แก่ น้ำกะทิชนิดเจือจาง (light coconut milk) น้ำกะทิ (coconut milk) ครีมกะทิ (coconut cream) และกะทิผง (coconut powder)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

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

2.2 Lakshanasomya N, Danudol A, Ningnoi T. Method performance study for total solids and total fat in coconut milk and products. Journal of Food Composition and Analysis 2012; 24: 650-655.

3. หลักการ (Principle)

ระเหยน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอ่างน้ำร้อน และทำตัวอย่างให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ $102 \pm 2^{\circ}C$ สารที่เหลืออยู่คือของแข็งทั้งหมด

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 ตู้อบร้อน (drying oven) ซึ่งสามารถปรับตั้งอุณหภูมิได้ที่ $102 \pm 2^{\circ}C$

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)

6.1 กะทิผงให้สุ่มตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของภาชนะบรรจุ ให้ได้ประมาณ 250 g เก็บในขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝาขวดให้แน่น กวน คน ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 กะทิชนิดเหลวให้สุ่มตัวอย่างมาประมาณ 2-3 หน่วย เทผสมลงในภาชนะที่สะอาด (ให้ได้ตัวอย่าง ประมาณ 200-300 ml) คนให้เข้ากัน นำไปตรวจวิเคราะห์ทันที

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

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

7.2 ชั่งตัวอย่างน้ำกะทิชนิดเจือจาง 5 g หรือน้ำกะทิ 3 g หรือครีมกะทิ 2 g หรือกะทิผง 1 g ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่เตรียมไว้ บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) แล้วนำไประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำร้อน (ยกเว้นตัวอย่างกะทิผงไม่ต้องนำไประเหย) อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมตัวอย่างโดยเปิดฝาขณะอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 102 ± 2°C เป็นเวลา 2 hr ปิดฝาถ้วยอบ เอาออกจากตู้อบร้อนเก็บในโถดูดความชื้นทันที ทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 30 min) ชั่งน้ำหนัก อบซ้ำอีกครั้งละ 30 min 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 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 ต่างกันไม่เกิน 0.1 g (น้ำกะทิชนิดเจือจาง), 0.5 g (น้ำกะทิ) 1.0 g (ครีมกะทิ) และ 0.3 g (กะทิผง)

10.4 ผล collaborative study

Test material	Light coconut milk		Coconut milk		Coconut cream		Coconut milk powder	
Laboratories remaining after eliminating outliers	16	16	14	17	15	-	17	17
Mean value, %	8.84	10.57	20.90	27.01	28.93	-	98.82	99.25
Repeatability standard deviation, S_r, %	0.02	0.03	0.12	0.49	0.21	-	0.04	0.10
Repeatability relative standard deviation, RSD_r, %	0.21	0.30	0.60	1.83	0.74	-	0.04	0.10
Repeatability limit, r (=2.8S_r), %	0.05	0.09	0.35	1.38	0.6	-	0.12	0.28
Reproducibility standard deviation, S_R, %	0.04	0.11	0.22	0.60	0.33	-	0.21	0.31
Reproducibility relative standard deviation, RSD_R, %	0.50	1.05	1.06	2.24	1.12	-	0.21	0.32
Reproducibility limit, R (=2.8S_R), %	0.12	0.31	0.62	1.69	0.91	-	0.59	0.88

DMSc F 1062: การทดสอบน้ำมันแร่ในน้ำมันและไขมัน
Qualitative Test of Mineral Oil in Oils and Fats

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ในการทดสอบการปนเปื้อนของน้ำมันแร่ในน้ำมันและไขมัน ที่มีน้ำมันแร่ปนเปื้อนมากกว่าร้อยละ 0.5

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

AOAC Official Method 945.102 Oil (Mineral) in Fats A. Qualitative test

3. หลักการ (Principle)

น้ำมันและไขมันเมื่อถูกทำปฏิกิริยา saponification จะละลายได้ดีในน้ำเป็นสารละลายใส หากมีการปนเปื้อนของน้ำมันแร่ในน้ำมันและไขมัน สารละลายที่ได้จะไม่ใส

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 g หรือ 0.001 g

4.2 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.3 beaker ขนาด 25 และ 250 ml

4.4 condenser

4.5 cylinder ขนาด 25 ml

4.6 Erlenmeyer flask with glass stoppered ขนาด 125 ml

4.7 micropipette ขนาด 100 – 1,000 µl พร้อม tip

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.1 KOH solution (3+2): ผสม KOH 3 g และ H_2O 2 ml ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2 Ethanol (absolute)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างที่เป็นน้ำมัน (oils) ให้คว่ำภาชนะบรรจุกลับไปกลับมาประมาณ 10 ครั้ง

6.2 ตัวอย่างที่เป็นไขมัน (fats) ให้สุ่มตัวอย่างลงใน beaker ประมาณ 100 g นำไปอุ่นให้หลอมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปทดสอบในขณะที่ยังหลอม

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ปิเปตตัวอย่าง 1 ml ลงใน Erlenmeyer flask with glass stoppered ขนาด 125 ml

7.2 เติม KOH solution 1 ml และ ethanol (absolute) 25 ml แกว่งเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปต่อเข้ากับ condenser ที่ไม่ได้ต่อกับสายน้ำหล่อเย็น วางบนเตาไฟฟ้าให้ความร้อนจนสารละลายเริ่มเดือด จับเวลาของการ reflux ประมาณ 5 นาที โดยแกว่ง flask เป็นระยะ ๆ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์

7.3 ถอด flask ออก เติมน้ำลงไป 25 ml แกว่งผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นสังเกตความใสของสารละลาย

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

รายงาน พบ หรือไม่พบ

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 ทำ blank ตามวิธีทดสอบโดยไม่มีตัวอย่าง หากสารละลายไม่ใสให้ทบทวนวิธีการทดสอบและสารเคมีที่ใช้

9.2 จัดหาตัวอย่างทั้งที่พบและไม่พบการปนเปื้อนของน้ำมันแร่เพื่อทำเป็น QC sample สำหรับการตรวจสอบวิธีทดสอบ

DMSc F 1063: การวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในเกลือบริโภคที่เสริมไอโอเดตโดยวิธีไตเตรชั่น

Determination of Iodine in Iodated Salt by Titration

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนในเกลือบริโภคที่เสริมไอโอเดต

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers. 3rd ed. Geneva: World Healh Organization; 2007. Annex 1 Titration method for determining salt iodate and salt iodine content.

3. หลักการ (Principle)

ไอโอเดตในเกลือบริโภคที่เสริมไอโอดีนด้วย potassium iodate (KIO_3) จะถูกรีดิวซ์ด้วยไอโอไดด์เกิดเป็นไอโอดีนอิสระในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีนอิสระได้โดยการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.005 M ของ sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$)โดยมีน้ำแป้ง เป็น indicator ดังสมการ

$$IO_3^- + 5\ I^- + 6\ H^+ \longrightarrow 3\ I_2 + 3\ H_2O$$

$$2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \longrightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.2 นาฬิกาจับเวลา

4.3 เตาไฟฟ้า (hot plate)

4.4 อุปกรณ์

4.4.1 beaker ขนาด 50 ml และขนาดอื่นที่จำเป็น

4.4.2 buret ขนาด 10, 25 และ 50 ml

4.4.3 cylinder ขนาด 50 และ 100 ml

4.4.4 Erlenmyer flask ขนาด 125 ml

4.4.5 glass bead

4.4.6 Iodine flask ชนิดใส ไม่มีสี ขนาด 250 ml

4.4.7 pipette ขนาด 1, 2, 5 และ 25 ml

4.4.8 volumetric flask ขนาด 100, 500 ml และ 1 L

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่า

5.1 hydrochloric acid, HCl (37%)

5.2 starch, soluble

5.3 sulfuric acid, H_2SO_4 (96 - 98%)

5.4 sodium chloride, NaCl (99.9%)

5.5 H_2O ที่ต้มเดือดแล้ว ปิดฝา และตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (เตรียมใหม่ ๆ)

5.6 potassium iodide, KI

5.7 sodium carbonate, Na_2CO_3

5.8 การเตรียมสารเคมี

5.8.1 1 M HCl: เจือจาง HCl 10 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

5.8.2 0.1 M HCl: เจือจาง 1 M HCl 10 ml ด้วย H_2O ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

5.8.3 NaCl, saturated solution: ละลาย NaCl ใน beaker ที่มี H_2O 100 ml กวนขณะเติม NaCl ปริมาณมากเกินพอจนเกลือไม่ละลาย วาง beaker บน hot plate ให้ความร้อนจน NaCl ละลายหมด วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง รินเฉพาะส่วนที่ใสลงในขวดที่สะอาด (เก็บไว้ใช้ได้นาน 12 เดือน)

5.8.4 starch solution ใช้เป็น indicator

ชั่ง starch 1 g ลงใน beaker ขนาด 100 ml เติม H_2O 10 ml วาง beaker บน hot plate ให้ความร้อนและกวนจนแป้งละลาย เติม NaCl, saturated solution จนมีปริมาตรรวมประมาณ 100 ml มิลลิลิตร (เก็บไว้ใช้ได้นาน 1 เดือน)

5.8.5 0.005 M $Na_2S_2O_3$: สามารถเตรียมโดยตรงหรือเตรียมจาก 0.1 M $Na_2S_2O_3$

5.8.5.1 0.1 M sodium thiosulfate: ชั่ง $Na_2S_2O_3$ .5 H_2O ประมาณ 25 – 26 g และ Na_2CO_3 0.2 g ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1 L และปรับปริมาตรด้วย H_2O ที่ต้มเดือดและเย็นแล้วใหม่ๆ (5.5)

5.8.5.2 การ Standardization: ชั่ง $K_2Cr_2O_7$ ที่ผ่านการอบที่ 100˚C นาน 2 hr น้ำหนัก 0.20 – 0.23 g (บันทึกน้ำหนักแน่นอน, W) ลงใน Iodine flask ขนาด 250 ml ละลายด้วย H_2O ที่ต้มเดือดและเย็นแล้วใหม่ๆ (5.5) 80 ml ที่มี KI 2 g ละลายอยู่ แล้วเติม 1 M HCl 20 ml ปิดจุกให้แน่น และแกว่งขวด $K_2Cr_2O_7$ ให้ละลาย วางไว้ในที่มืดนาน 10 min และไทเทรตทันที ด้วย 0.1 M $Na_2S_2O_3$ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนๆ เติม starch solution 1 ml ไทเทรตต่อจนสีม่วงน้ำเงินจางหายไป (เขย่าแรงๆ ขณะไทเทรต) บันทึกปริมาตร $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ (V)

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ (M) $= \frac{W \times 1000}{V \times 49.032}$

เมื่อ W คือ น้ำหนัก $K_2Cr_2O_7$
V คือ ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไทเทรต

5.8.5.3 0.005 M $Na_2S_2O_3$: ปิเปต 0.1 M $Na_2S_2O_3$ 25 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 500 ml และปรับปริมาตรด้วย H_2O ที่ต้มเดือดและเย็นแล้วใหม่ ๆ (5.5)

5.8.6 2 N H_2SO_4: ปิเปต H_2SO_4 15 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 250 ml ที่มี H_2O ประมาณ 200 ml ผสมให้เข้ากัน วางไว้ให้เย็นและปรับปริมาตรให้ครบด้วย H_2O

5.8.7 10 % KI: ละลาย KI 100 g ใน H_2O ที่ต้มเดือดและเย็นแล้วใหม่ ๆ (5.5) 1 L เก็บในที่เย็น และป้องกันแสง (เก็บไว้ใช้ได้นาน 1 เดือน)

5.9 สารมาตรฐาน

5.9.1 sodium thiosulfate pentahydrate, $Na_2S_2O_3 .5 H_2O$

5.9.2 potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$ (primary standard, purity ≥ 99.9%)

5.9.3 potassium iodate, KIO_3 (purity ≥ 95.5%)

5.10 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Iodine (จาก KIO_3) 200 µg/ml (เตรียมใหม่ทุกครั้ง): ชั่ง KIO_3 0.0169 g ลงใน beaker ละลายด้วย H_2O ที่ต้มเดือดและเย็นแล้วใหม่ๆ (5.5) และถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย H_2O ที่ต้มเดือดและเย็นแล้วใหม่ๆ (5.5)

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

สุ่มตัวอย่างเกลือ ประมาณ 200 g ถ้าตัวอย่างเป็นเม็ดหยาบ บดให้ละเอียดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในขวดปิดสนิท

7. ขั้นตอนการวิเคราะห์ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่าง 10 g ลงใน beaker ขนาด 50 ml ถ่ายลงใน Iodine flask ละลายด้วย H_2O 50 ml เขย่าหรือกวนจนตัวอย่างละลายหมด

7.2 เติม 2 N H_2SO_4 ปริมาตร 1 ml เติม 10% KI 5 ml ปิดจุก แกว่งขวดให้สารละลายเข้ากันดี และวางในที่มืด จับเวลานาน 10 min

7.3 นำมาไทเทรตทันทีด้วย 0.005 M $Na_2S_2O_3$ จนสารละลายเป็นสีเหลืองอ่อน จึงเติม starch soltion 1 ml ถ้ามีไอโอดีนจะเกิดสีน้ำเงิน ไทเทรตต่อพร้อมเขย่า ทำเช่นนี้จนสารละลายไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.005 M $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไป (V) คำนวณปริมาณไอโอดีนโดย 1 ml ของ 0.005 M $Na_2S_2O_3$ สมมูลกับ 0.1058 มิลลิกรัม ไอโอดีน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

$$\text{ไอโอดีน (mg/kg)} = \frac{V \times M \times 0.1058 \times 1,000}{W \times 0.005}$$

เมื่อ V คือ ปริมาตรของ 0.005 M $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไทเทรต

M คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

8.2 รายงานผล ปริมาณไอโอดีน หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับ 20 และ 40 mg/kg ก่อนเริ่มวิเคราะห์ตัวอย่าง เกณฑ์ยอมรับ recovery อยู่ระหว่าง 80-110%

9.2 วิเคราะห์ซ้ำ (duplicate analysis) ทุกตัวอย่าง เกณฑ์ยอมรับ RPD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10%

9.3 วิเคราะห์ control sample (ร้อยละ 10 ของจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์) นำมาสร้าง control chart

DMSc F 1064: การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ในเนื้อสัตว์และตับ โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
Determination of β-agonists in animal tissue and liver by ELISA

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่ม β-agonists ในเนื้อสัตว์และตับ ซึ่งสารกลุ่ม β-agonists ประกอบด้วย salbutamol, clenbuterol, bromobuterol, cimbuterol, mapenterol, mabuterol, tulobuterol, clenpenterol, clenproperol, carpenterol, terbutaline และ cimaterol โดยชุดตรวจแจ้งว่ามีการศึกษาค่า cross-reactivity ดังนี้

β-agonists	cross-reactivity
salbutamol	100%
clenbuterol	100%
bromobuterol	100%
cimbuterol	75%
mapenterol	70%
mabuterol	60%
tulobuterol	50%
clenpenterol	50%
clenproperol	50%
carbuterol	40%
terbutaline	40%
cimaterol	10%

การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้น มี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.5 μg/kg และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 1.0 μg/kg
ในกรณีที่ต้องการนำผลไปใช้ในทางกฎหมาย ต้องมีการตรวจเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ LC-MS/MS

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

A microtitre plate based competitive enzyme immunoassay for analysis and screening of urine, faeces, feed, bile, tissue, plasma, hair and choroid/retina samples. Arnhem, The Netherlands. Euro-Diagnostica B.V.5061BAG1p[19]09.05

3. หลักการ (Principle)

เป็นวิธี immunoassay ที่อาศัยความจำเพาะระหว่างสารที่เป็น antigen กับ specific antibodies ต่อสารชนิดนั้น ๆ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า competitive enzyme linked immunosorbent assay ซึ่งปริมาณ β-agonists ในตัวอย่าง และ β-agonists ในรูปของ enzyme conjugate จะแย่งกันจับกับ

specific antibodies ที่ตรึงบนผิว microtitre plate จากนั้นตรวจหาปริมาณโดยเติม substrate chromogen ทำให้สารละลายเกิดสี ในลักษณะผกผันกับปริมาณของ β-agonists ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณได้โดยเปรียบเทียบกับ calibration curve

วิธีนี้อ้างอิงวิธี Liquid extraction method สำหรับ muscle samples ของชุดตรวจ β-agonists - EIA (Euro-Diagnostica B.V.5061BAG1p[19]09.05) สำหรับตัวอย่างเนื้อสัตว์ เพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (clean up) โดยใช้ SPE: Waters Oasis HLB extraction cartridges 3 cc/60 mg และได้แสดงข้อมูลผลการทดสอบความใช้ได้โดยห้องปฏิบัติการเดียว (Single laboratory method validation) ในข้อ 10.3

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 ชุดตรวจ β-agonists-EIA ประกอบด้วย

- 4.1.1 microtitre plate (12 แถว แถวละ 8 หลุม) coated ด้วย antibodies to rabbit IgG พร้อมใช้งาน
- 4.1.2 zero standard solution พร้อมใช้งาน standard salbutamol solution ความเข้มข้น 0.062, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000 และ 2.000 ng/ml จำนวน 6 ขวด พร้อมใช้งาน
- 4.1.3 standard salbutamol solution ความเข้มข้น 100 ng/ml พร้อมใช้งาน
- 4.1.4 lyophilised conjugate (horseradish peroxidase conjugated salbutamol)
- 4.1.5 lyophilised antibody
- 4.1.6 substrate solution (peroxide/TMB) พร้อมใช้งาน (12 ml)
- 4.1.7 dilution buffer พร้อมใช้งาน (20 ml)
- 4.1.8 stop solution พร้อมใช้งาน (15 ml)

4.1.9 concentrated rinsing buffer (30 ml, ก่อนใช้ต้องเจือจาง 20 เท่า ด้วย H_2O)

4.2 การเก็บรักษาชุดตรวจ β-agonists-EIA

4.2.1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 ˚C และในที่มืด เมื่อใช้เสร็จแล้วต้องกลับไปเก็บในตู้เย็นทันที

4.2.2 นำ microtitre plate ออกมาใช้เท่าที่ต้องการ เก็บ microtitre plate ที่เหลือในถุงที่ปิดสนิททันที และไม่จับที่พื้นผิวด้านล่างของ microtitre plate

4.2.3 ไม่เปิดถุงที่บรรจุ microtitre plate ทันทีหลังจากที่นำออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนเพื่อป้องกันการเกิดการควบแน่นของน้ำ (condensation) ใน microtitre plate

4.2.4 หลังจากละลาย (reconstitute) lyophilised conjugate และ lyophilised anti-clenbuterol/salbutamol antibodies แล้ว เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8˚C ในที่มืด จะมีอายุการใช้งาน 1 สัปดาห์ หากเก็บ reconstituted conjugate หลังจากใช้งานเสร็จแล้ว ทันทีในตู้แช่แข็งอุณหภูมิน้อยกว่า -20˚C จะมีอายุการใช้งาน 1 ปี

4.2.5 substrate solution และ standard solution สามารถเก็บได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8˚C และมีอายุการใช้งาน ตามที่กำหนดในฉลาก

4.2.6 substrate/chromogen solution เป็นสารที่ไวต่อแสง ควรเก็บรักษาในที่มืดหลีกเลี่ยงแสง การใช้ควรทำในที่มืด และรวดเร็ว

4.2.7 หลังจากนำชุดตรวจ β-agonists-EIA ออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

4.2.8 ไม่นำสารเคมีที่เหลือในแต่ละ lot มาผสมกัน เพื่อนำมาใช้ต่อ

4.2.9 เมื่อสังเกตเห็น chromogen solution เปลี่ยนเป็นสีฟ้า หรือค่า O.D. ของ zero standard ที่ 450 nm น้อยกว่า 0.8 แสดงว่าชุดตรวจชุดนั้นไม่ควรนำมาใช้ต่อไป

4.3 ความปลอดภัย (Safety)

4.3.1 stop reagent เป็น 0.5M sulfuric acid ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสผิวหนัง

4.3.2 substrate เป็นสาร tetramethylbenzidine (TMB) ควรหลีกเลี่ยงการสูดดม

4.3.3 สารที่ใช้ส่วนมากเป็น biological materials ควรระมัดระวังการสัมผัสทางผิวหนังและทางเดินหายใจ

4.3.4 ไม่ใช้ปากในการดูดสาร

4.4 เครื่องมือ

4.4.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.4.2 microplate reader พร้อม filter 450 nm

4.4.3 automated strip washer

4.4.4 เครื่องบดเนื้อ

4.4.5 centrifuge สามารถทำความเร็วได้ 3,000 รอบต่อนาที (rpm)

4.4.6 nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box

4.4.7 SPE vacuum manifold

4.4.8 vortex mixer

4.4.9 incubator หรือ water bath อุณหภูมิ 37°C และ 55°C

4.4.10 ตู้เย็น ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ได้

4.4.11 pH meter และ pH paper

4.5 อุปกรณ์อื่น

4.5.1 multichannel pipette ขนาด 10-200 µl (8/12 channel)

4.5.2 autopipetteขนาด 10-100 µl และ 100-1000 µl

4.5.3 screw cap centrifuge tube ขนาด 30 และ 35 ml

4.5.4 screw cap test tube ขนาด 10 และ 20 ml

4.5.5 screw cap vial ขนาด 5 ml

4.5.6 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

4.5.7 volumetric flask ขนาด 100 และ 200 ml

4.5.8 parafilm

5. สารเคมี (Reagent)

สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.1 acetic acid

5.2 calcium chloride, CaCl2

5.3 disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4

5.4 Helix pomatic juice (Merck Art No. 4114)

5.5 hydrochloric acid, HCl

5.6 isobutyl alcohol

5.7 methanol, MeOH (HPLC grade)

5.8 potassium chloride, KCl

5.9 potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4

5.10 pronase E (Sigma)

5.11 sodium acetate

5.12 sodium carbonate

5.13 sodium chloride, NaCl

5.14 sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4

5.15 sodium hydroxide, NaOH

5.16 trizma base [tris (hydroxymethyl) amino methane] (Sigma)

5.17 tween 20

5.18 solid phase extraction, SPE: Waters Oasis HLB extraction cartridges 3 cc/60 mg

5.19 วิธีเตรียมสารละลาย

5.19.1 tris buffer pH 8: ชั่ง trizma base 24.2 g และ $CaCl_2$ 14.7 g ละลาย trizma base และ $CaCl_2$ รวมกัน ด้วย H_2O ปรับ pH โดยใช้ pH meter ให้ได้ pH 8 (ปรับ pH โดยใช้ HCl เข้มข้น) จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O

5.19.2 dilution buffer: ชั่ง Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 30.0 g และ KCl 0.2 g แล้วละลายสารทั้งหมดรวมกันด้วย H_2O เติม tween 20 ปริมาตร 0.5 ml จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O

5.19.3 rinsing buffer: เจือจาง concentrated rinsing buffer ด้วย H_2O 20 เท่า ก่อนนำมาใช้

5.19.4 0.2 M acetate buffer pH 4.8: ชั่ง sodium acetate 16.4 g ละลายด้วย H_2O ปรับ pH โดยใช้ pH meter ให้ได้ pH 4.8 (ปรับ pH โดยใช้ acetic acid) จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 L ml ด้วย H_2O

5.19.5 1 M sodium carbonate: ชั่ง sodium carbonate 10.599 g ละลายด้วย H_2O จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย H_2O

5.20 สารมาตรฐาน (อยู่ในชุดตรวจ)

5.20.1 standard solution ความเข้มข้น 100 ng/ml

5.20.2 standard solution ความเข้มข้น 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 ng/ml

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่าง น้ำหนักอย่างน้อย 300 g ตัดส่วนที่เป็นไขมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

6.2 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด น้ำหนัก 1.0 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 35 ml ส่วนที่เหลือเก็บไว้เป็น reserved portion เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด - เนื้อสัตว์

7.1.1 ละลาย pronase E 1.25 mg ด้วย tris buffer (pH 8) 4 ml แล้วเติมลงในหลอดตัวอย่าง แล้วนำไปบ่ม (incubate) ใน incubator หรือ water bath ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 16-18 hr (overnight)

7.1.2 เมื่อครบเวลา นำหลอดตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นผสมด้วย vortex mixer เป็นเวลาอย่างน้อย 30 sec แล้ว centrifuge หลอดตัวอย่างที่ 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.3 ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 2 ml ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 20 ml ปรับ pH ให้ได้ pH 9.4 ± 0.2 โดยเติม 10 M NaOH (ประมาณ 1-2 หยด)

7.1.4 เติม isobutyl alcohol ปริมาตร 4 ml นำไปปั่นผสมด้วย vortex mixer นาน 30 sec แล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น (ประมาณ 30 min)

7.1.5 ปิเปตสารละลาย isobutyl alcohol (ชั้นบน) ปริมาตร 2 ml ใส่ใน screw cap vial ขนาด 5 ml แล้วนำไประเหยจนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 60°C

7.1.6 ละลายตะกอน (residue) ด้วย H_2O ปริมาตร 3 ml และนำไปปั่นผสมด้วย vortex mixer นาน 30 sec นำไปวิเคราะห์ต่อในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (7.3)

7.2 การสกัด – ตับ

7.2.1 เติม 0.1 M HCl 5 ml ลงในหลอดตัวอย่างแล้วนำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min และนำตัวอย่างไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.2.2 ปิเปตสารละลายส่วนใส 2 ml ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 30 ml เติม 0.2 M acetate buffer (pH 4.8) 2 ml และ Helix pomatia juice 20 µl นำไป incubate ใน incubator หรือ water bath ที่ 37°C นาน 16-18 hr (overnight)

7.2.3 เมื่อครบเวลา นำหลอดตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นด้วย vortex mixer เป็นเวลาอย่างน้อย 30 sec ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ± 0.2 โดยเติม 1 M sodium carbonate 250 µl และเติม 1 M NaOH (ประมาณ 1-2 หยด) เติม isobutyl alcohol 4 ml นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 30 sec แล้ว centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 5 min

7.2.4 ปิเปตสารละลาย isobutyl alcohol (ชั้นบน) ปริมาตร 2 ml ใส่ใน screw cap test tube ขนาด 10 ml แล้วนำไประเหยจนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C

7.2.5 ละลายตะกอน (residue) ด้วย dilution buffer 500 µl และปั่นด้วย vortex mixer นาน 30 sec นำไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นการตรวจหาปริมาณ (7.4)

7.3 การทำให้บริสุทธิ์ – เนื้อสัตว์

7.3.1 เตรียม SPE vacuum manifold และ SPE ให้พร้อมใช้ โดยปรับ flow rate ประมาณ 2 ml/min

7.3.2 ล้าง SPE ด้วย MeOH ปริมาตร 2 ml และ H_2O ปริมาตร 5 ml

7.3.3 ถ่ายสารที่สกัดได้จากข้อ 7.1 ทั้งหมด ลงใน SPE (ทิ้ง eluate)

7.3.4 ล้าง screw cap vial ด้วยสารละลายผสม MeOH/H2O (10%) ปริมาตร 5 ml และถ่ายลงใน SPE (ทิ้ง eluate)

7.3.5 ชะ (elute) SPE ด้วย MeOH ปริมาตร 3 ml เก็บ eluateใน screw cap test tube ขนาด 10 ml

7.3.6 ระเหย eluate ด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 60˚C จนแห้ง

7.3.7 ละลาย residue ด้วย dilution buffer 500 µl และปั่นผสมด้วย vortex mixer 30 sec นำไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นตอนการหาปริมาณ (7.4)

7.4 การหาปริมาณ

7.4.1 นำ microtitre plate ออกมาเท่าที่จะใช้ ที่เหลือเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็น

7.4.2 ปิเปต zero standard 100 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ (well A1, A2) ใช้เป็น blank ปิเปต zero standard 50 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ (well B1, B2) ปิเปตสารมาตรฐานที่มาในชุดตรวจ 50 µl แต่ละความเข้มข้น (0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 ng/ml) 2 ซ้ำ (well C1, 2 ถึง H1, 2) ปิเปตสารตัวอย่างที่สกัดได้ 50 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ

7.4.3 ผสม lyophilised conjugate ด้วย dilution buffer 4 ml แล้วปิเปต conjugate 25 µl ใส่ลงในหลุมที่ทดสอบทุกหลุม ยกเว้นหลุม A1 และ A2

7.4.4 ผสม lyophilised antibody ด้วย dilution buffer 4 ml แล้วปิเปต antibody 25 µl ใส่ลงในหลุมที่ทดสอบทุกหลุม ยกเว้นหลุม A1 และ A2

7.4.5 ใช้ parafilm ปิด microtitre plate แล้ว เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min นำ plate ไปบ่ม (incubate) ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4˚C (2˚C ถึง 8˚C) นาน 1 hr

7.4.6 เมื่อครบเวลา เทสารละลายใน microtitre plate ทิ้ง และล้าง microtitre plate ด้วย rinsing solution 3 ครั้ง ครั้งละ 300 µl ด้วย automated strip washer ทำ plate ให้แห้ง โดยคว่ำ plate ลงบนกระดาษเนื้อนุ่มและไม่มีขน เคาะ plate จนแน่ใจว่าไม่มีหยดน้ำเกาะใน plate

7.4.7 ปิเปต substrate solution 100 µl ลงในทุกหลุม เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min ปิด microtiter plate ด้วย parafilm แล้วบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 20-25˚) ในที่มืด นาน 30 min

7.4.8 เมื่อครบเวลา ปิเปต stop solution 100 µl ลงในทุกหลุม เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance value) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ทันที

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 หาค่าเฉลี่ยของ optical density (O.D.) ของ well A1, A2 (blank)

8.2 หาค่าเฉลี่ยของ O.D. ของ well B1, B2 (zero standard)

8.3 นำ O.D. well A1, A2 (blank) ลบออกจากค่าเฉลี่ยของ O.D. ที่อ่านได้จากทุกหลุม (ทั้งสารมาตรฐานและตัวอย่าง)

$$\%\ \text{maximal absorbance} = \frac{\text{O.D. standard (สารมาตรฐานหรือ ตัวอย่าง)} \times 100}{\text{O.D. zero standard}}$$

8.4 สร้าง calibration curve ระหว่าง % maximum absorbance (หรือ %B/Bo) บนแกน Y กับ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน salbutamol บนแกน X

8.5 ปริมาณ β-agonist ที่ตรวจพบ คำนวณได้จากความสัมพันธ์ของ % maximum absorbance และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยตัวอย่างเนื้อสัตว์ใช้ multiplying factor เท่ากับ 0.5 และตัวอย่างเนื้อสัตว์ใช้ multiplying factor เท่ากับ 0.4

8.6 รายงาน สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ที่ตรวจพบ หน่วย ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 การควบคุมคุณภาพขั้นตอนการหาปริมาณ (Assay)

9.1.1 O.D. ของ zero standard ที่ 450 nm ต้องไม่น้อยกว่า 0.8

9.1.2 ค่า Correlation coefficient, r ของ calibration curve ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 98

9.1.3 วิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ (duplicate well) ทุกตัวอย่าง ถ้าผลการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกัน หรือตรวจพบปริมาณสารกลุ่ม β-agonists ที่มีปริมาณสูงกว่าค่า LOQ แต่ปริมาณที่ตรวจพบมีความแตกต่างกัน (% RPD > 30) ตัวอย่างนั้น ต้องลง plate ใหม่

9.2 การควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์

9.2.1 วิเคราะห์ method blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยค่า method blank ที่อ่านได้ต้องน้อยกว่าค่า LOD

9.2.2 ก่อนใช้งานทุก Lot ของ SPE โดยผ่าน H_2O ที่เติม standard salbutamol ที่ระดับ 1.0 ng/ml คำนวณ % recovery (เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 80-120%)

9.2.3 วิเคราะห์ duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อยร้อยละ 10 ของตัวอย่าง กรณี duplicate sample ตรวจพบปริมาณสารกลุ่ม β-agonists มีปริมาณสูงกว่าค่า LOQ ให้คำนวณ %RPD โดย % RPD ต้องน้อยกว่า 30

9.2.4 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับ 2.5 μg/kg โดยใช้ negative sample อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ใน 1 ชุดของการวิเคราะห์ คำนวณ % recovery (เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 60-120 %)

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ลงวันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2549 กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 1 μg/kg

10.2 เมื่อต้องการนำผลการวิเคราะห์ไปดำเนินคดีทางกฎหมาย ต้องตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่น เช่น การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS

10.3 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ (Method validation) ของวิธี โดยห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ใน matrix เนื้อหมู ดำเนินการเมื่อพฤศจิกายน 2547

10.3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (standard curve) ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ng/ml ได้ค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ -0.9933

10.3.2 การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 μg/kg ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน clenbuterol และ salbutamol ลงในตัวอย่างเนื้อหมูชนิดละ 10 ตัวอย่าง ผลตรวจพบทุกตัวอย่าง

10.3.2 การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 μg/kg ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน clenbuterol และ salbutamol ลงในตัวอย่างเนื้อหมูชนิดละ 10 ตัวอย่าง ผลตรวจพบทุกตัวอย่าง

Sample No.	ปริมาณที่พบ (μg/kg)	
	clenbuterol	salbutamol
1	0.50	0.43
2	0.57	0.42
3	0.52	0.49
4	0.42	0.53
5	0.54	0.52
6	0.62	0.47
7	0.64	0.47
8	0.78	0.54
9	0.73	0.61
10	0.52	0.50

10.3.3 การยืนยันค่า Limit of Quantitation (LOQ) ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน clenbuterol และ salbutamol ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 μg/kg ลงในตัวอย่างเนื้อหมู ชนิดละ 7 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	% Recovery		% RSD
	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
Clenbuterol	89.5 – 129.6	110.5 ± 13.6	12.3
Salbutamol	94.8 – 115.8	105.2 ± 6.3	6.0

10.3.4 Accuracy และ Precision ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน clenbuterol และ salbutamol ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 μg/kg ลงในตัวอย่างเนื้อหมู ชนิดละ 7 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	% Recovery		% RSD
	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
Clenbuterol	72.8 – 97.1	80.5 ± 8.7	10.8
Salbutamol	80.1 – 109.9	89.1 ± 10.1	11.4

DMSc F 1065: การตรวจวิเคราะห์แรคโตพามีนในเนื้อสัตว์และตับโดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
Determination of Ractopamine in animal tissue and liver by ELISA

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารแรคโตพามีน (Ractopamine) ในเนื้อสัตว์และตับ โดยชุดตรวจแจ้งว่ามีการศึกษาค่า cross-reactivity ดังนี้

	cross-reactivity
ractopamine	100%
clenbuterol	< 0.1%
fenoterol	< 0.1%
ritodrine	< 0.1%
salbutamol	< 0.1%
salmeterol	< 0.1%
isoxsuprine	< 0.1%

การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้น มี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.5 μg/kg และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 1.0 μg/kg
ในกรณีที่ต้องการนำผลไปใช้ในทางกฎหมาย ต้องมีการตรวจเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ LC-MS/MS

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

A competitive enzyme immunoassay for screening and quantitative analysis of ractopamine in various matrices. Arnhem, The Netherlands. Euro-Diagnostica B.V.5061RACT[11]01.15

3. หลักการ (Principle)

เป็นวิธี immunoassay ที่อาศัยความจำเพาะระหว่างสารที่เป็น antigen กับ specific antibodies ต่อสารชนิดนั้น ๆ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า competitive enzyme linked immunosorbent assay ซึ่งปริมาณ Ractopamine ในตัวอย่าง และ Ractopamine ในรูปของ enzyme conjugate จะแย่งกันจับกับ specific antibodies ที่ตรึงบนผิว microtitre plate จากนั้นตรวจหาปริมาณโดยเติม substrate chromogen ทำให้สารละลายเกิดสี ในลักษณะผกผันกับปริมาณของ Ractopamine ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณได้โดยเปรียบเทียบกับ calibration curve

4. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

4.1 ชุดตรวจ RACTOPAMINE-ELISA ประกอบด้วย

4.1.1 microtitre plate (12 แถว แถวละ 8 หลุม) coated ด้วย specific antibodies (rabbit anti-ractopamine) พร้อมใช้งาน

4.1.2 zero standard solution พร้อมใช้งาน standard ractopamine solution ความเข้มข้น 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 ng/ml จำนวน 6 ขวดพร้อมใช้งาน

4.1.3 standard ractopamine solution ความเข้มข้น 100 ng/ml พร้อมใช้งาน

4.1.4 lyophilised conjugate (horseradish peroxidase conjugated ractopamine)

4.1.5 substrate solution (peroxide/TMB) พร้อมใช้งาน (12 ml)

4.1.6 dilution buffer พร้อมใช้งาน (20 ml)

4.1.7 stop solution พร้อมใช้งาน (15 ml)

4.1.8 concentrated rinsing buffer (30 ml, ก่อนใช้ต้องเจือจาง 20 เท่า ด้วย H_2O)

4.2 การเก็บรักษาชุดตรวจ RACTOPAMINE ELISA

4.2.1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C และในที่มืด เมื่อใช้เสร็จแล้วต้องกลับไปเก็บในตู้เย็นทันที

4.2.2 นำ microtitre plate ออกมาใช้เท่าที่ต้องการ เก็บ microtitre plate ที่เหลือในถุงที่ปิดสนิททันที และไม่จับที่พื้นผิวด้านล่างของ microtitre plate

4.2.3 ไม่เปิดถุงที่บรรจุ microtitre plate ทันทีหลังจากที่นำออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนเพื่อป้องกันการเกิดการควบแน่นของน้ำ (condensation) ใน microtitre plate

4.2.4 หลังจากละลาย (reconstitute) lyophilised conjugate แล้ว เก็บในที่มืด จนกว่าจะใช้งาน และเก็บ reconstituted conjugate หลังจากใช้งานเสร็จแล้ว ทันทีในตู้แช่แข็งอุณหภูมิน้อยกว่า -20°C มีอายุการใช้งานตามที่ระบุบนฉลาก

4.2.5 substrate solution และ standard solution สามารถเก็บได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C และมีอายุการใช้งาน ตามที่ระบุบนฉลาก

4.2.6 substrate/chromogen solution เป็นสารที่ไวต่อแสง ควรเก็บรักษาในที่มืดหลีกเลี่ยงแสง การใช้ควรทำในที่มืด และรวดเร็ว

4.2.7 หลังจากนำชุดตรวจ RACTOPAMINE ELISA ออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

4.2.8 ไม่นำสารเคมีที่เหลือในแต่ละ lot มาผสมกัน เพื่อนำมาใช้ต่อ

4.2.9 เมื่อสังเกตเห็น chromogen solution เปลี่ยนเป็นสีฟ้า หรือค่า O.D. ของ zero standard ที่ 450 nm น้อยกว่า 0.8 แสดงว่าชุดตรวจชุดนั้นไม่ควรนำมาใช้ต่อไป

4.3 ความปลอดภัย (Safety)

4.3.1 stop reagent เป็น 0.5M sulfuric acid ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสผิวหนัง

4.3.2 substrate เป็นสาร tetramethylbenzidine (TMB) ควรหลีกเลี่ยงการสูดดม

4.3.3 สารที่ใช้ส่วนมากเป็น biological materials ควรระมัดระวังการสัมผัสทางผิวหนังและทางเดินหายใจ

4.3.4 ไม่ใช้ปากในการดูดสาร

4.4 เครื่องมือ

4.4.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.4.2 microplate reader พร้อม filter 450 nm

4.4.3 automated strip washer

4.4.4 เครื่องบดเนื้อ

4.4.5 centrifuge สามารถทำความเร็วได้ 3,000 รอบต่อนาที (rpm)

4.4.6 nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box

4.4.7 vortex mixer

4.4.8 ตู้เย็นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ได้

4.4.9 เครื่องเขย่า ใช้กับ screw cap centrifuge tube ขนาด 30 ml

4.5 อุปกรณ์อื่น

4.5.1 multichannel pipette ขนาด 10-200 µl (8/12 channel)

4.5.2 autopipette ขนาด 10-100 µl และ 100-1000 µl

4.5.3 screw cap centrifuge tube ขนาด 30 ml

4.5.4 screw cap test tube ขนาด 10 ml

4.5.5 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

4.5.6 volumetric flask ขนาด 100 และ 200 ml

4.5.7 parafilm

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 acetonitrile, HPLC grade

5.2 วิธีเตรียมสารละลาย

5.2.1 dilution buffer : เจือจาง concentrated dilution buffer ด้วย H_2O 4 เท่า ก่อนนำมาใช้

5.2.2 rinsing buffer: เจือจาง concentrated rinsing buffer ด้วย H_2O 20 เท่า ก่อนนำมาใช้

5.3 สารมาตรฐาน (อยู่ในชุดตรวจ)

5.3.1 standard solution ความเข้มข้น 100 ng/ml

5.3.2 standard solution ความเข้มข้น 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 ng/ml

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่าง น้ำหนักอย่างน้อย 300 g ตัดส่วนที่เป็นไขมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

6.2 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด น้ำหนัก 1.0 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 35 ml ส่วนที่เหลือเก็บไว้เป็น reserved portion เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด

7.1.1 ชั่งตัวอย่าง 1 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 ml เติม acetonitrile 4 ml ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 min แล้วนำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 20-25°C และความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 min

7.1.2 ปิเปตสารสกัดส่วนใส ปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน test tube ขนาด 10 ml ระเหยสารสกัดจนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C

7.1.3 ละลาย residue ด้วย dilution buffer 500 µl และ นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min จากนั้นปิเปตสารสกัดที่ได้ 50 µl เจือจางด้วย dilution buffer 50 µl นำไปปั่นด้วย vortex mixer อีกครั้ง นาน 1 min สารละลายที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นการตรวจหาปริมาณ

7.2 การหาปริมาณ

7.2.1 นำ microtiter plate ออกมาเท่าที่จะใช้ ที่เหลือเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็น

7.2.2 ปิเปต zero standard 100 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ (well A1, A2)
ปิเปต zero standard 50 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ (well B1, B2)
ปิเปตสารมาตรฐานที่มาในชุดตรวจ 50 µl แต่ละความเข้มข้น (0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 ng/ml) 2 ซ้ำ (well C1, 2 ถึง H1, 2)
ปิเปตสารตัวอย่างที่สกัดได้ 50 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ

7.2.3 ผสม lyophilised conjugate ด้วย dilution buffer 4 ml แล้วปิเปต conjugate 25 µl ใส่ลงในหลุมที่ทดสอบทุกหลุม ยกเว้นหลุม A1 และ A2

7.2.4 ผสม lyophilised antibody ด้วย dilution buffer 4 ml แล้วปิเปต antibody 25 µl ใส่ลงในหลุมที่ทดสอบทุกหลุม ยกเว้นหลุม A1 และ A2

7.2.5 ใช้ parafilm ปิด microtiter plate แล้ว เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min นำ plate ไปบ่ม (incubate) ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C (2°C ถึง 8°C) นาน 1 hr

7.2.6 เมื่อครบเวลา เทสารละลายใน microtiter plate ทิ้ง และล้าง microtiter plate ด้วย rinsing solution 3 ครั้ง ครั้งละ 300 µl ด้วย automated strip washer ทำ plate ให้แห้งโดยคว่ำ plate ลงบนกระดาษเนื้อนุ่มและไม่มีขน เคาะ plate จนแน่ใจว่าไม่มีหยดน้ำเกาะใน plate

7.2.7 ปิเปต substrate solution 100 µl ลงในทุกหลุม เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min ปิด microtiter plate ด้วย parafilm แล้วบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 20-25°C) ในที่มืด นาน 30 min

7.2.8 เมื่อครบเวลาปิเปต stop solution 100 µl ลงในทุกหลุม เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance value) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ทันที

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 หาค่าเฉลี่ยของ optical density (O.D.) ของ well A1, A2 (blank)

8.2 หาค่าเฉลี่ยของ O.D. ของ well B1, B2 (zero standard)

8.3 นำ O.D. well A1, A2 (blank) ลบออกจากค่าเฉลี่ยของ O.D. ที่อ่านได้จากทุกหลุม (ทั้งสารมาตรฐานและตัวอย่าง)

$$\% \text{ maximal absorbance} = \frac{\text{O.D. standard (หรือตัวอย่าง)} \times 100}{\text{O.D. zero standard}}$$

8.4 สร้าง calibration curve ระหว่าง % maximum absorbance (หรือ %B/Bo) บนแกน Y กับ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ractopamine บนแกน X

8.5 ปริมาณ ractopamine ที่ตรวจพบ คำนวณได้จากความสัมพันธ์ของ % maximum absorbance โดยมี multiplying factor เท่ากับ 5

8.6 รายงานปริมาณ Ractopamine ที่ตรวจพบ หน่วยไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 การควบคุมคุณภาพขั้นตอนการหาปริมาณ (Assay)

9.1.1 O.D. ของ zero standard ที่ 450 nm ต้องไม่น้อยกว่า 0.8

9.1.2 ค่า Correlation coefficient, r ของ calibration curve ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98

9.1.3 วิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ (duplicate well) ทุกตัวอย่าง ถ้าผลการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกัน หรือตรวจพบปริมาณ Ractopamine ที่มีปริมาณสูงกว่าค่า LOQ แต่ปริมาณที่ตรวจพบมีความแตกต่างกัน (% RPD > 30) ตัวอย่างนั้น ต้องลง plate ใหม่

9.2 การควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์

9.2.1 วิเคราะห์ method blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยค่า method blank ที่อ่านได้ต้องน้อยกว่าค่า LOD

9.2.2 วิเคราะห์ duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อยร้อยละ 10 ของตัวอย่าง กรณี duplicate sample ตรวจพบปริมาณ Ractopamine มีปริมาณสูงกว่าค่า LOQ ให้คำนวณ % RPD โดย % RPD ต้องน้อยกว่า 30

9.2.3 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับ 1.0 μg/kg โดยใช้ negative sample อย่างน้อย 1 ตัวอย่างใน 1 ชุดของการวิเคราะห์ คำนวณ % recovery (เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 60-120%)

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ลงวันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2549 กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 1.0 μg/kg

10.2 เมื่อต้องการนำผลการวิเคราะห์ไปดำเนินคดีทางกฎหมาย ต้องตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่น เช่น การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS

DMSc F 1066: การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลตกค้างในอาหาร โดยเทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Determination of chlormphenicol residue

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol; CAP) ตกค้างในเนื้อสัตว์ นม ไข่ และน้ำผึ้ง โดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยชุดตรวจแจ้งว่ามีการศึกษาค่า cross-reactivity ดังนี้

สารปฏิชีวนะ	Cross-reactivity
chloramphenicol	100%
chloramphenicol-glucoronide	65%
chloramphenicol-base	< 1%
thiamphenicol	< 1%
florphenicol	< 1%

การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้น มี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.05 μg/kg และ limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.1 μg/kg ในกรณีที่ต้องการนำผลไปใช้ในทางกฎหมาย ต้องมีการตรวจเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ โดยเครื่องมือ LC-MS/MS

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

A microtitre plate based competitive enzyme immunoassay for screening and quantitative analysis of chloramphenicol in various matrices. Arnhem, The Netherlands. Euro-Diagnostica B.V. 5091CAP[21]07.10

3. หลักการ (Principle)

เป็นวิธี immunoassay ที่อาศัยความจำเพาะระหว่างสารที่เป็น antigen กับ specific antibodies ต่อสารชนิดนั้น ๆ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า competitive enzyme linked immunosorbent assay ซึ่งปริมาณ CAP ในตัวอย่าง และ CAP ในรูปของ enzyme conjugate จะแย่งกันจับกับ specific antibodies ที่ตรึงบนผิว microtiter plate จากนั้นตรวจหาปริมาณโดยเติม substrate chromogen ทำให้สารละลายเกิดสีในลักษณะผกผันกับปริมาณของ CAP ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณได้โดยเปรียบเทียบกับ calibration curve

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 ชุดตรวจ chloramphenicol EIA ประกอบด้วย

4.1.1 microtitre plate (12 แถว แถวละ 8 หลุม) coated ด้วย antibodies to rabbit IgG พร้อมใช้งาน

4.1.2 zero standard solution พร้อมใช้งาน

4.1.3 standard chloramphenicol solution ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 2.0 ng/ml จำนวน 6 ขวด พร้อมใช้งาน

4.1.4 standard chloramphenicol solution ความเข้มข้น 100 ng/ml พร้อมใช้งาน

4.1.5 lyophilised conjugate (peroxidase conjugated chloramphenicol)

4.1.6 lyophilised anti-chloramphenicol antibodies

4.1.7 substrate solution (peroxide/TMB) พร้อมใช้งาน (12 ml)

4.1.8 stop solution พร้อมใช้งาน (15 ml)

4.1.9 concentrated rinsing buffer (30 ml, ก่อนใช้ต้องเจือจาง 20 เท่า ด้วย H_2O)

4.2 การเก็บรักษาชุดตรวจ chloramphenicol-EIA

4.2.1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C และในที่มืด เมื่อใช้เสร็จแล้วต้องกลับไปเก็บในตู้เย็นทันที

4.2.2 นำ microtiter plate ออกมาใช้เท่าที่ต้องการ เก็บ microtitre plate ที่เหลือในถุงที่ปิดสนิททันที และไม่จับที่พื้นผิวด้านล่างของ microtitre plate

4.2.3 ไม่เปิดถุงที่บรรจุ microtitre plate ทันทีหลังจากที่นำออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนเพื่อป้องกันการเกิดการควบแน่นของน้ำ (condensation) ใน microtitre plate

4.2.4 หลังจากละลาย (reconstitute) lyophilised conjugate และ lyophilised antibodies แล้ว เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C ในที่มืด lyophilised conjugate จะมีอายุการใช้งาน 6 เดือน ส่วน lyophilised antibodies จะมีอายุการใช้งาน 2 เดือน หากเก็บ reconstituted

conjugate หลังจากใช้งานเสร็จแล้วทันที ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิน้อยกว่า -20°C จะมีอายุการใช้งาน 1 ปี

4.2.5 substrate solution และ standard solution สามารถเก็บได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8°C และมีอายุการใช้งาน ตามที่กำหนดในฉลาก

4.2.6 substrate/chromogen solution เป็นสารที่ไวต่อแสง ควรเก็บรักษาในที่มืดหลีกเลี่ยงแสง การใช้ควรทำในที่มืด และรวดเร็ว

4.2.7 หลังจากนำชุดตรวจ chloramphenicol-EIA ออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

4.2.8 ไม่นำสารเคมีที่เหลือในแต่ละ lot มาผสมกัน เพื่อนำมาใช้ต่อ

4.2.9 เมื่อสังเกตเห็น chromogen solution เปลี่ยนเป็นสีฟ้า หรือค่า O.D. ของ zero standard ที่ 450 nm น้อยกว่า 0.8 แสดงว่าชุดตรวจชุดนั้นไม่ควรนำมาใช้ต่อไป

4.3 ความปลอดภัย (Safety)

4.3.1 stop reagent เป็น 0.5M sulfuric acid ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสผิวหนัง

4.3.2 substrate เป็นสาร tetramethylbenzidine (TMB) ควรหลีกเลี่ยงการสูดดม

4.3.3 สารที่ใช้ส่วนมากเป็น biological materials ควรระมัดระวังการสัมผัสทางผิวหนังและทางเดินหายใจ

4.3.4 ไม่ใช้ปากในการดูดสาร

4.4 เครื่องมือ

4.4.1 เครื่องชั่งที่มีความละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.4.2 microplate reader พร้อม filter 450 nm

4.4.3 automated strip washer

4.4.4 เครื่องบดเนื้อ

4.4.5 centrifuge สามารถทำความเร็วได้ 3,000 รอบต่อนาที (rpm)

4.4.6 nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box

4.4.7 vortex mixer

4.4.8 ตู้เย็นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ได้

4.4.9 เครื่องเขย่า ใช้กับ screw cap centrifuge tube ขนาด 30 ml

4.5 อุปกรณ์อื่น

4.5.1 multichannel pipette ขนาด 10-200 µl (8/12 channel)

4.5.2 autopipetteขนาด 10-100 µl และ 100-1000 µl

4.5.3 screw cap centrifuge tube ขนาด 30 ml

4.5.4 screw cap test tube ขนาด 10 ml

4.5.5 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

4.5.6 volumetric flask ขนาด 100 และ 200 ml

4.5.7 parafilm

4.5.8 กระดาษกรอง Whatman No. 2 ขนาด od 125 mm

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทุกชนิดเป็น AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.1.1 ethyl acetate, HPLC grade

5.1.2 hexane

5.2 วิธีเตรียมสารละลาย

5.2.1 dilution buffer: เจือจาง concentrated dilution buffer ด้วย H_2O 4 เท่า ก่อนนำมาใช้

5.2.2 rinsing buffer: เจือจาง concentrated rinsing buffer ด้วย H_2O 20 เท่า ก่อนนำมาใช้

5.3 สารมาตรฐาน (อยู่ในชุดตรวจ)

5.3.1 standard solution ความเข้มข้น 100 ng/ml

5.3.2 standard solution ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 และ 2.0 ng/ml

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ใช้ตัวอย่างอาหาร น้ำหนักอย่างน้อยประมาณ 300 g หรือปริมาตรอย่างน้อยประมาณ 500 ml

6.2 เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ใช้เฉพาะส่วนเนื้อตัดหนังและมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

6.3 นม

6.3.1 นมผง ชั่งตัวอย่าง 10 g ละลายด้วย H_2O 100 ml กำจัดไขมันออก โดยนำตัวอย่างไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4˚C ความเร็ว 3,000 rpm นาน 15 min และกรองด้วยกระดาษกรอง

6.3.2 น้ำนม นำตัวอย่างไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4˚C ความเร็ว 3,000 rpm นาน 15 min และกรองด้วยกระดาษกรอง

6.4 ไข่เป็ดและไข่ไก่ 10 ฟอง ไข่นกกระทา 30 ฟอง ใช้ทั้งไข่แดงและไข่ขาวตีให้เข้ากัน

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด

7.1.1 เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

7.1.1.1 ชั่งตัวอย่าง 3 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 ml เติม ethyl acetate 6 ml ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 10 min แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.1.2 ปิเปตสารสกัดส่วนใส ปริมาตร 4 ml ใส่ลงใน test tube ขนาด 10 ml ระเหยสารสกัด จนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C

7.1.1.3 ละลาย residue ด้วย hexane 1 ml และ dilution buffer 1 ml และนำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min จากนั้นทำให้แยกชั้นโดยนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min กรณีเกิด emulsion ไม่แยกชั้น นำหลอดตัวอย่างแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80°C ประมาณ 5 min หรือจนกว่าจะเห็นสารสกัดแยกชั้น จากนั้นนำตัวอย่างไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min อีกครั้งหนึ่ง

7.1.1.4 ดูดสารสกัดส่วนใสชั้นล่าง (dilution buffer) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml สารละลายที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นการตรวจหาปริมาณ

7.1.2 นม และไข่ผง

7.1.2.1 ปิเปตตัวอย่างที่แยกไขมันออกแล้ว ปริมาตร 3 ml ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 ml เติม ethyl acetate 9 ml ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex mixer 1 min นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 10 min แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.2.2 ปิเปตสารสกัดส่วนใสปริมาตร 6 ml ใส่ใน test tube ขนาด 10 ml ระเหยสารละลายที่ได้จนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C

7.1.2.3 ละลาย residue ด้วย hexane 400 µl และ dilution buffer 200 µl นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min จากนั้นทำให้แยกชั้นโดยนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.2.4 ดูดสารสกัดส่วนใสชั้นล่าง (dilution buffer) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml สารละลายที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นการตรวจหาปริมาณ

7.1.3 น้ำผึ้ง

7.1.3.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 3 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 ml เติม H_2O 3 ml นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min

7.1.3.2 เติม ethyl acetate 6 ml ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 10 min แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.3.3 ปิเปตสารสกัดส่วนใส 4 ml ใส่ใน test tube ขนาด 10 ml ระเหยสารละลายที่ได้จนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50 ˚C

7.1.3.4 ละลาย residue ด้วย hexane 1 ml และ dilution buffer 1 ml นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min จากนั้นทำให้แยกชั้นโดยนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.3.5 ดูดสารสกัดส่วนใสชั้นล่าง (dilution buffer) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml สารละลายที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นการตรวจหาปริมาณ

7.1.4 ไข่

7.1.4.1 ชั่งตัวอย่าง 1 g ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 ml เติม ethyl acetate 6 ml ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 10 min แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.4.2 ปิเปตสารสกัดส่วนใส 3 ml ใส่ใน test tube ขนาด 10 ml ระเหยสารละลายที่ได้จนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50˚C ละลาย residue ด้วย hexane 1 ml และ dilution buffer 500 µl นำไปปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 min จากนั้นทำให้แยกชั้นโดยนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 min

7.1.4.3 ดูดสารสกัดส่วนใสชั้นล่าง (dilution buffer) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml สารละลายที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นการตรวจหาปริมาณ

7.2 การหาปริมาณ

7.2.1 นำ microtiter plate ออกมาเท่าที่จะใช้ ที่เหลือเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็น

7.2.2 ปิเปต zero standard 100 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ (well A1, A2) ใช้เป็น blank
ปิเปต zero standard 50 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ (well B1, B2)
ปิเปตสารมาตรฐานที่มาในชุดตรวจ 50 µl แต่ละความเข้มข้น (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 2.0 ng/ml) 2 ซ้ำ (well C1,2 ถึง H1,2)
ปิเปตสารตัวอย่างที่สกัดได้ 50 µl ลงในหลุม 2 ซ้ำ

7.2.3 ผสม lyophilised conjugate ด้วย dilution buffer 4 ml แล้วปิเปต conjugate 25 µl ใส่ลงในหลุมที่ทดสอบทุกหลุม ยกเว้นหลุม A1 และ A2

7.2.4 ผสม lyophilised antibody ด้วย dilution buffer 4 ml แล้วปิเปต antibody 25 µl ใส่ลงในหลุมที่ทดสอบทุกหลุม ยกเว้นหลุม A1 และ A2

7.2.5 ใช้ parafilm ปิด microtiter plate แล้วเขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min นำ plate ไปบ่ม (incubate) ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C (2°C ถึง 8°C) นาน 1 hr

7.2.6 เมื่อครบเวลาเทสารละลายใน microtiter plate ทิ้ง และล้าง microtiter plate ด้วย rinsing solution 3 ครั้ง ครั้งละ 300 µl ด้วย automated strip washer ทำ plate ให้แห้งโดยคว่ำ plate ลงบนกระดาษเนื้อนุ่มและไม่มีขน เคาะ plate จนแน่ใจว่าไม่มีหยดน้ำเกาะใน plate

7.2.7 ปิเปต substrate solution 100 µl ลงในทุกหลุม เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min ปิด microtiter plate ด้วย parafilm แล้วบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 20-25°C) ในที่มืด นาน 30 min

7.2.8 เมื่อครบเวลา ปิเปต stop solution 100 µl ลงในทุกหลุม เขย่า plate เบา ๆ ในแนวนอน ประมาณ 1 min และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance value) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ทันที

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 หาค่าเฉลี่ยของ optical density (O.D.) ของ well A1, A2 (blank)

8.2 หาค่าเฉลี่ยของ O.D. ของ well B1, B2 (zero standard)

8.3 นำ O.D. well A1, A2 (blank) ลบออกจากค่าเฉลี่ยของ O.D. ที่อ่านได้จากทุกหลุม (ทั้งสารมาตรฐานและตัวอย่าง)

$$\% \text{ maximal absorbance} = \frac{\text{O.D. standard (หรือ ตัวอย่าง)} \times 100}{\text{O.D. zero standard}}$$

8.4 สร้าง calibration curve ระหว่าง % maximum absorbance (หรือ %B/Bo) บนแกน Y กับ log ของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน CAP บนแกน X

8.5 ปริมาณ CAP ที่ตรวจพบ คำนวณได้จากความสัมพันธ์ของ % maximum absorbance และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยมี multiplying factor ดังนี้

ชนิดตัวอย่าง	multiplying factor
เนื้อสัตว์	2
นม	1
ไข่	1
น้ำผึ้ง	2

8.6 รายงานปริมาณ Chloramphenicol ที่ตรวจพบ หน่วย ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 การควบคุมคุณภาพขั้นตอนการหาปริมาณ (Assay)

9.1.1 O.D. ของ zero standard ที่ 450 nm ต้องไม่น้อยกว่า 0.8

9.1.2 ค่า Correlation coefficient, r ของ calibration curve ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98

9.1.3 วิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ (duplicate well) ทุกตัวอย่าง ถ้าผลการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกัน หรือตรวจพบปริมาณ CAP ที่มีปริมาณสูงกว่าค่า LOQ แต่ปริมาณที่ตรวจพบมีความแตกต่างกัน (% RPD > 30) ตัวอย่างนั้น ต้องลง plate ใหม่

9.2 การควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์

9.2.1 วิเคราะห์ method blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยค่า method blank ที่อ่านได้ต้องน้อยกว่าค่า LOD

9.2.2 วิเคราะห์ duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อยร้อยละ 10 ของตัวอย่าง กรณี duplicate sample ตรวจพบปริมาณสารกลุ่ม β-agonists มีปริมาณสูงกว่าค่า LOQ ให้คำนวณ RPD โดย RPD ต้องน้อยกว่า 30

9.2.3 วิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับ 0.25 μg/kg โดยใช้ negative sample อย่างน้อย 1 ตัวอย่างใน 1 ชุดของการวิเคราะห์ คำนวณ % recovery (เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 60-120%)

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ลงวันที่ 18 สิงหาคม 2549 กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 0.3 μg/kg

10.2 เมื่อต้องการนำผลการวิเคราะห์ไปดำเนินคดีทางกฎหมาย ต้องตรวจยืนยันด้วยเทคนิคอื่น เช่น การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS

DMSc F 1067: **การตรวจวิเคราะห์สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol) ในเนื้อสัตว์และตับ โดยเทคนิค LC-MS/MS**

Determination of β-agonists (brombuterol, clenbuterol, ractopamine and salbutamol) in animal meat and liver by LC-MS/MS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ (และตรวจยืนยัน) สารเคมีกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ 4 ชนิด ได้แก่ brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ในเนื้อสัตว์ และตับ โดยเทคนิค LC-MS/MS โดยมีค่า LOD และ LOQ ดังนี้

analyte	เนื้อสัตว์ (µ/kg)		ตับ (µ/g/kg)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
brombuterol	0.3	0.5	0.5	1.0
clenbuterol	0.3	0.5	0.5	1.0
ractopamine	0.3	0.5	0.5	1.0
salbutamol	0.3	0.5	0.5	1.0

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 Williams LD, Churchwell MI, Doerge DR. Multiresidue confirmation of ß-agonist in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS. Journal of Chromatography B. 2004; 813: 35-45.

2.2 Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) Official Journal of the European Communities L 221, 17.8.2002: 8-36.

3. หลักการ (Principle)

สาร brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol จะถูกสกัดออกจากตัวอย่าง ด้วย 0.01 M HCl จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี solid-phase extraction โดยผ่าน

extraction cartridges-MCX mode ระเหยสารที่สกัดได้ (eluate) จนแห้ง ละลาย residue ด้วยสารละลายผสมของ 5% MeOH ใน 0.1% formic acid จากนั้นตรวจชนิดและปริมาณโดยเครื่องมือ LC-MS/MS คำนวณปริมาณจาก calibration curve ที่ plot ระหว่าง peak area ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard กับ concentration ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard โดยใช้ clenbuterol-d_9 เป็น internal standard สำหรับทดสอบสาร brombuterol และ clenbuterol ractopamine-d_6 เป็น internal standard สำหรับทดสอบสาร ractopamine และ salbutamol-d_3 เป็น internal standard สำหรับทดสอบสาร salbutamol วิธีนี้อ้างอิงวิธีของ Williams LD และคณะ โดยปรับเพิ่มน้ำหนักตัวอย่าง จาก 200 mg เป็น 1 g และใช้ SPE: mix mode MCX 3cc แทน 1cc และได้แสดงข้อมูลผลการทดสอบความใช้ได้ โดยห้องปฏิบัติการเดียว (Single laboratory method validation) ในข้อ 10.2

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่ง อ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.3 เครื่องบดเนื้อ

4.1.4 centrifuge สามารถทำความเร็วได้ 5,500 rpm

4.1.5 homogenizer

4.1.6 refrigerator centrifuge

4.1.7 nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box

4.1.8 SPE vacuum manifold

4.1.9 vortex mixer

4.1.10 pH meter

4.1.11 LC-MS/MS system ประกอบด้วย

- binary pump: Agilent 1100 series
- autosampler: Agilent 1100 series
- microvacuum degasser: Agilent 1100 series
- thermostatted column compartment: Agilent 1100 series
- triple quadrupole mass spectrometer: API 4000

4.2 อุปกรณ์อื่น

4.2.1 screw cap centrifuge tube ขนาด 50 ml

4.2.2 test tube ขนาด 10 ml

4.2.3 glass funnel

4.2.4 glass microfibre filters ขนาด od 55 mm

4.2.5 membrane filters ชนิด cellulose nitrate ขนาด od 47 mm, 0.45 μm

4.2.6 filtering device for HPLC eluents

4.2.7 micro-spin filter 0.45 μm PVDF (Alltech Cat No. 24144)

4.2.8 HPLC vials สีชา ขนาด 2 ml

4.2.9 Oasis MCX 3cc (60 mg) extraction cartridges (Waters Corp., Part No. 186000254)

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.1.1 methanol, MeOH (HPLC grade หรือเทียบเท่า)

5.1.2 acetonitrile, CH_3CN (HPLC grade หรือเทียบเท่า)

5.1.3 ammonium hydroxide, NH_4OH

5.1.4 ammonium acetate, NH_4OAc

5.1.5 hydrochloric acid, HCl

5.1.6 formic acid, HCOOH

5.1.7 glacial acetic acid, CH_3 COOH

5.2 วิธีเตรียมสารละลาย

5.2.1 10 mM NH_4OAc pH 5: ชั่ง NH_4OAc 0.771 g ละลายด้วย H_2O แล้วปรับ pH 5.00 ± 0.05 โดยใช้ glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วย H_2O

5.2.2 5% NH_4OH in MeOH: ปิเปต NH_4OH 5 ml ลงใน MeOH และปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย MeOH

5.2.3 1 M HCOOH: ปิเปต HCOOH 3.9 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.2.4 0.01 M HCl: ปิเปต HCl 0.9 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml

5.2.5 mobile phase A, 0.1% HCOOH ใน H_2O: ปิเปต HCOOH 1.0 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml แล้วกรองผ่าน membrane filter ชนิด cellulose nitrate ขนาด od 47 mm, 0.45 μm ด้วย filtering device for HPLC eluents

5.2.6 5% MeOH in mobile phase A: ปิเปต MeOH 5 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย mobile phase A

5.3 สารมาตรฐาน (standards)

5.3.1 brombuterol hydrochloride ความบริสุทธิ์มากกว่า 99%

5.3.2 clenbuterol hydrochloride ความบริสุทธิ์มากกว่า 98.5%

5.3.3 ractopamine hydrochloride ความบริสุทธิ์มากกว่า 96.0%

5.3.4 salbutamol free base ความบริสุทธิ์มากกว่า 99.5%

5.3.5 internal standard

5.3.5.1 salbutamol-d_3 ความเข้มข้น 100 mg/l

5.3.5.2 clenbuterol-d_9 ความเข้มข้น 100 mg/l

5.3.5.3 ractopamine-d_6 hydrochloride

5.3.6 การเตรียมสารมาตรฐาน เนื่องจากสารมาตรฐานอยู่ในรูป salt base จะต้องคำนวณปริมาณตาม formula และความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานแต่ละตัว ตัวอย่าง เช่น ractopamine hydrochloride มี HCl 1 โมเลกุล MW เท่ากับ 337.8 และมีความบริสุทธิ์ 96% ดังนั้น ถ้าต้องการชั่งน้ำหนัก 10 mg ต้องชั่ง $\frac{(337.8 \times 10) \times 100}{301.2 \times 96} = 11.68$ mg

5.5 การเตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 200 µg /ml: ชั่งสารมาตรฐานประมาณ 10 mg โดยใช้เครื่องชั่งความละเอียดอย่างน้อย 0.1 mg คำนวณน้ำหนักที่ต้องชั่งตามข้อ 5.3.6 ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C มีอายุการใช้งาน 1 ปี

5.6 การเตรียม mixed working standard solution (brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol)

5.6.1 mixed working standard solution ความเข้มข้น 1 µg/ml: ปิเปต stock standard solution brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ความเข้มข้น 200 µg/ml ชนิดละ 250 µl ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C มีอายุการใช้งาน 4 เดือน

5.6.2 mixed working standard solution ความเข้มข้น 100 ng/ml: ปิเปต mixed working standard solution (5.6.1) 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C มีอายุการใช้งาน 4 เดือน

5.6.3 mixed working standard solution ความเข้มข้น 10 ng/ml: ปิเปต mixed working standard solution (5.6.2) 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C อายุการใช้งาน 4 เดือน

5.7 การเตรียม stock internal standard ractopamine-d_6 hydrochloride ความเข้มข้น 100 µg/ml: ละลาย internal standard ractopamine-d_6 1 mg และปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH

5.8 การเตรียม intermediate internal standard salbutamol-d_3 solution ความเข้มข้น 10 µg/ml: ปิเปต stock internal standard salbutamol-d_3 solution 1ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

5.9 การเตรียม intermediate internal standard clenbuterol-d_9 solution ความเข้มข้น 10 µg/ml: ปิเปต stock internal standard clenbuterol-d_9 solution 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

5.10 การเตรียม intermediate internal standard ractopamine-d_6 solution ความเข้มข้น 10 µg/ml: ปิเปต stock internal standard ractopamine-d_6 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

5.11 การเตรียม mix working internal standard solution ความเข้มข้น 100 ng/ml ปิเปต intermediate internal standard clenbuterol-d_9, ractopamine-d_6, salbutamol-d_3 ความเข้มข้น 10 µg/ml ชนิดละ 500 µl ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8˚C มีอายุการใช้งาน 4 เดือน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 ตัวอย่างเนื้อสัตว์และตับ น้ำหนักอย่างน้อย 300 g ตัดส่วนที่เป็นไขมันออก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

6.2 ชั่งตัวอย่างเนื้อสัตว์ และตับที่บดละเอียด น้ำหนัก 1.0 g ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 ml

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด

7.1.1 เติม mix working internal standard solution (5.11) ปริมาตร 30 µl และ 0.01 M HCl ปริมาตร 3 ml ในหลอดตัวอย่าง แช่หลอดตัวอย่างในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นปั่นผสมด้วย homogenizer ประมาณ 30 sec

7.1.2 ล้างหัวปั่น homogenizer ด้วย 0.01 M HCl ประมาณ 2 ml รวมใส่ในหลอดตัวอย่าง จากนั้นปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min

7.1.3 นำตัวอย่างที่ได้ไป centrifuge ที่ 4˚C ความเร็ว 5,500 rpm ประมาณ 15 min

7.1.4 กรองสารละลายส่วนใสด้วย glass microfibre filters ใส่ลงใน test tube ขนาด 10 ml

7.2 การ clean-up

7.2.1 เตรียม Oasis MCX 3cc (60 mg) extraction cartridges ต่อเข้ากับ SPE vacuum manifold

7.2.2 activate cartridges ด้วย 5% NH_4OH/MeOH 2 ml และ MeOH ปริมาตร 2 ml ตามลำดับโดยปรับ flow rate ประมาณ 2 ml/min และ equilibrate cartridges ด้วย 10 mM NH_4OAc buffer pH 5 2 ml

7.2.3 ถ่ายสารสกัดที่ได้ทั้งหมดลงใน cartridge (ทิ้ง eluate) ล้าง (rinse) test tube ด้วย 10 mM NH_4OAc buffer pH 5 ปริมาตร 2 ml และถ่ายลง cartridge (ทิ้ง eluate) แล้วล้าง test tube ด้วย 1 M HCOOH ปริมาตร 2 ml และถ่ายลง cartridge (ทิ้ง eluate)

7.2.4 ปล่อยให้ cartridge แห้ง โดย vacuum ประมาณ 30 sec แล้ว ล้าง cartridge ครั้งสุดท้ายด้วย MeOH ปริมาตร 2 ml (ทิ้ง eluate)

7.2.5 ชะ (elute) cartridge ด้วย 5%NH_4OH/MeOH ปริมาตร 2 ml เก็บ eluate ใน test tube ขนาด 10 ml แล้ว ระเหย eluate จนแห้ง ด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45°C

7.2.6 ละลาย residue ด้วยสารละลาย 5% MeOH ใน mobile phase A ปริมาตร 500 µl จากนั้น นำไปปั่นด้วย vortex mixer 30 sec แล้ว ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ micro-spin filters ชนิด PVDF นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,500 rpm นาน 10 min

7.2.7 เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vials สีชา ขนาด 2 ml นำไปวิเคราะห์ต่อโดยเครื่องมือ LC-MS/MS (ถ้าไม่สามารถตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง LC-MS/MS ได้ในทันที ให้เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 5 ± 3°C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์)

7.3 การสร้าง calibration curve (matrix-matched calibration curve)

7.3.1 ชั่ง matrix blank น้ำหนัก 1 g ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 ml จำนวน 7 หลอด สกัด (ไม่ต้องเติม internal standard) และ clean up จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน brombuterol, clenbuterol, ractopamine, salbutamol และ internal standard ทั้ง 3 สาร ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง

7.3.2 สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio (peak area of standard/peak area of internal standard) กับ concentration ratio (concentration of standard/ concentration of internal standard)

ความเข้มข้น (ng/g)	ปริมาตร internal standard 100 ng/ml (µl)	ปริมาตร standard ที่ใช้ (µl)	
		10 ng/ml	100 ng/ml
0.0	30	-	-
0.5	30	50	-
1.0	30	100	-
2.0	30	200	-
3.0	30	-	30
5.0	30	-	50
10.0	30	-	100

7.4 การหาปริมาณด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS

7.4.1 สภาวะเครื่องมือ LC

analytical column: Zorbax SB C-18 (150 mm × 3 mm, 5 µm)

guard column: Zorbax SB-C18 (12.5 mm × 4.6 mm, 5µm)

mobile phase: A - 0.1% formic acid, B - CH_3CN

flow rate: 0.6 ml/min

injection volume: 10 µl

column temperature: 25°C

gradient LC mobile phase

time (min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.0	95	5
3.0 – 5.0	80	20
5.5 – 6.5	50	50
8.0 – 11.0	5	95
12.5 - 15.0	95	5

7.4.2 สภาวะเครื่องมือ MS

ionization mode: ESI (turbo spray) positive

scan type: MRM

ion spray voltage 5500 eV

temperature 500°C

collision gas: nitrogen 5 psig

curtain gas (CUR) 20 psig

ion spray nebulizer gas (GS-1) 52 psig

TIS Heater Gas (GS-2) 58 psig

entrance potential (EP) 10 V

MS/MS fragmentation conditions

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)
brombuterol	367.3 ± 0.5	212.1 ± 0.5 (secondary) 293.1 ± 0.5 (primary)
clenbuterol	277.2 ± 0.5	168.2 ± 0.5 (tertiary) 132.2 ± 0.5 (secondary) 203.1 ± 0.5 (primary)
ractopamine	302.3 ± 0.5	106.9 ± 0.5 (secondary) 164.0 ± 0.5 (primary)
salbutamol	240.3 ± 0.5	222.3 ± 0.5 (secondary) 148.1 ± 0.5 (primary)
clenbuterol-d_9	286.1 ± 0.5	203.8 ± 0.5 (primary)
ractopamine-d_6	308.3 ± 0.5	168.1 ± 0.5 (primary)
salbutamol-d_3	243.4 ± 0.5	151.2 ± 0.5 (primary)

หมายเหตุ การคำนวณปริมาณ clenbuterol ในกรณีที่พบสัญญาณรบกวน ให้ใช้ mass 168.2 ± 0.5 เป็น mass ยืนยัน

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve

$$\text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ, CA (µg/kg)} = \frac{(Y - b)}{a} \times C_{IS}$$

โดย C_A = conc. of analyte
Y = peak area ratio
b = intercept ของ calibration curve
a = slope ของ calibration curve
C_{IS} = conc. of internal standard

8.2 รายงานปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio กับ concentration ratio ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยค่า Correlation coefficient, r ของ calibration curve ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98

9.2 ทดสอบ method blank และ matrix blank ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์

9.3 คำนวณ % Relative intensities ของ analyte ion intensities ratio กับ standard ion intensities ratio เพื่อยืนยันการตรวจพบ โดย % Relative intensities ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ ± 20%

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

โดย $r_{analyte}$ = ratio ของ secondary ion intensities ต่อ primary ion intensities ของ analyte
r_{std} = ratio ของ secondary ion intensities ต่อ primary ion intensities ของ standard
$\overline{r_{std}}$ = ค่าเฉลี่ยของ r_{std} ทุกความเข้มข้นของ calibration curve

9.4 วิเคราะห์ spiked matrix ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 µg/kg เพื่อประเมิน % Recovery ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดย % Recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ช่วง 50-120%

9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีจำนวนมาก วิเคราะห์ 10% ของจำนวนตัวอย่าง กรณีตรวจพบ ปริมาณสูงกว่าค่า LOQ ให้คำนวณ Relative Percent Difference (RPD) โดย RPD ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ลงวันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ.2549 กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 1 µg/kg

10.2 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ (Method validation) ของวิธี โดยห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ใน matrix เนื้อหมูและตับหมู ดำเนินการเมื่อเมษายน 2558

10.2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve: matrix matching) ช่วง concentration ratio ของ 0.17, 0.33, 0.66, 1.0, 1.7 และ 3.3 ซึ่งเท่ากับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 และ 10.0 μg/kg ได้ค่า Correlation coefficient, r มากกว่า 0.98

10.2.2 การยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 μg/kg ในเนื้อหมูและความเข้มข้น 0.5 μg/kg ในตับหมู ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ลงในตัวอย่างเนื้อหมูและตับหมู ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ผลตรวจพบทุกตัวอย่าง โดยค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) มากกว่า 3 และ % Relative intensities น้อยกว่า ± 20%

10.2.3 การยืนยันค่า Limit of Quantitation (LOQ) ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 μg/kg ลงในตัวอย่างเนื้อหมู 10 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	% Recovery		%RSD
	ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
Brombuterol	85.5 - 99.4	92.5 ± 4.24	4.58
Clenbuterol	98.4 - 100.2	99.4 ± 0.69	0.69
Ractopamine	100.6 - 107.4	105.1 ± 2.32	2.21
Salbutamol	95.2 - 100.2	97.3 ± 1.84	1.89

10.2.4 การยืนยันค่า Limit of Quantitation (LOQ) ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 μg/kg ลงในตัวอย่างตับหมู 10 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	% Recovery		%RSD
	ค่าต่ำสุด – ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
Brombuterol	63.0 - 72.3	69.2 ± 3.20	4.62
Clenbuterol	101.00 - 106.0	103.1 ± 1.79	1.74
Ractopamine	100.0 - 108.0	102.4 ± 2.22	2.17
Salbutamol	101.0 - 105.0	102.8 ± 1.32	1.28

10.2.5 Accuracy และ Precision ทำการทดสอบโดยเติม สารมาตรฐาน brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 μg/kg ลงในตัวอย่างเนื้อหมู 10 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	Spiked level (μg/kg)	% Recovery		%RSD
		ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
Brombuterol	1.0	86.9 - 99.6	93.6 ± 4.52	4.83
	2.5	80.5 - 95.6	88.4 ± 4.81	5.44
	5.0	88.8 - 97.0	91.9 ± 2.62	2.85
	10.0	83.5 - 98.4	88.4 ± 5.14	5.81
Clenbuterol	1.0	98.4 - 104.0	100.6 ± 1.81	1.80
	2.5	95.2 - 101.6	98.0 ± 1.88	1.92
	5.0	95.2 - 100.2	98.5 ± 1.89	1.92
	10.0	98.2 - 101.0	99.6 ± 0.86	0.86
Ractopamine	1.0	97.4 - 102.0	100.4 ± 1.73	1.72
	2.5	95.6 - 99.6	97.5± 1.50	1.54
	5.0	95.0 - 100.0	97.9 ± 1.69	1.72
	10.0	97.8 - 101.0	99.4 ± 0.91	0.92
Salbutamol	1.0	97.6 - 103.0	99.8 ± 1.61	1.61
	2.5	96.0 - 99.6	97.6 ± 1.34	1.37
	5.0	97.6 - 100.4	98.8 ± 0.92	0.93
	10.0	97.3 - 101.0	99.4 ± 1.06	1.06

10.2.6 Accuracy และ Precision ทำการทดสอบโดยเติม สารมาตรฐาน brombuterol, clenbuterol, ractopamine และ salbutamol ที่ระดับความเข้มข้น 2.5, 5.0 และ 10.0 μg/kg ลงในตัวอย่างตับหมู 10 ซ้ำ

สารมาตรฐาน	Spiked level (μg/kg)	% Recovery		%RSD
		ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด	Mean ± SD	
Brombuterol	2.5	94.4 - 104.0	99.4 ± 3.09	3.11
	5.0	80.5 - 95.6	88.4 ± 4.81	5.44
	10.0	95.0 - 103.0	100.9 ± 2.28	2.26
Clenbuterol	2.5	96.0 - 102.4	98.4 ± 1.80	1.83
	5.0	96.8 - 100.4	99.7 ± 1.03	1.03
	10.0	99.4 - 101.0	100.2 ± 0.56	0.55
Ractopamine	2.5	94.0 - 101.2	97.9 ± 2.60	2.65
	5.0	97.4 - 100.6	99.8 ± 0.94	0.94
	10.0	97.8 - 102.0	100.3 ± 1.28	1.28
Salbutamol	2.5	96.0 - 100.0	97.1 ± 1.36	1.40
	5.0	97.4 - 100.8	99.4 ± 1.16	1.17
	10.0	100.0 - 102.0	100.9 ± 0.74	0.73

DMSc F 1068: การตรวจวิเคราะห์สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อสัตว์โดยเทคนิค LC-MS/MS

Determination of chloramphenicol in animal meat by LC-MS/MS

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ (และตรวจยืนยัน) สารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol CAP) ในเนื้อสัตว์และตับ โดยเทคนิค LC-MS/MS โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.03 μg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.05 μg/kg

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 Hammack W, Carson MC, Neuhaus BK, Hurlbut JA, Nochetto C, Stuart JS, *et al*. Multilaboratory validation of a method to confirm chloramphenicol in shrimp and crabmeat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J AOAC International 2003; 86 (6): 1135-1143.

2.2 Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) Official Journal of the European Communities L 221, 17.8.2002: 8-36.

3. หลักการ (Principle)

CAP จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วย ethyl acetate และถูกดึงไขมันออกด้วย hexane จากนั้นเมื่อระเหยชั้น organic solvent จนแห้ง ละลาย residue ด้วยสารละลายผสมของ methanol: H_2O (1:1) จากนั้นตรวจหาปริมาณโดยเครื่องมือ LC-MS/MS คำนวณปริมาณจาก calibration curve ที่ plot ระหว่าง peak area ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard และ concentration ratio ของสารมาตรฐาน และ internal standard

4. เครื่องมือ (Apparatus)

4.1 เครื่องมือ

4.1.1 เครื่องชั่ง อ่านค่าได้ละเอียดอย่างน้อย 0.01 g

4.1.2 เครื่องชั่ง (analytical balance) ที่มีความละเอียด 0.0001 g

4.1.3 เครื่องบดเนื้อ

4.1.4 centrifuge สามารถทำความเร็วได้ 3,000 rpm

4.1.5 homogenizer

4.1.6 shaker

4.1.7 nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box

4.1.8 vortex mixer

4.1.9 rotary evaporator

4.1.10 LC-MS/MS system, ประกอบด้วย

- binary pump: Agilent 1100 series
- autosampler: Agilent 1100 series
- micro vacuum degasser: Agilent 1100 series
- thermostatted column compartment: Agilent 1100 series
- triple quadrupole mass spectrometer: API 4000

4.2 อุปกรณ์อื่น

4.2.1 screw cap centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 ml

4.2.2 micro-spin filter 0.45 μm PVDF (Alltech Cat No. 24144)

4.2.3 micro pipette ขนาด 20-200 μl และ 100-1000 μl

4.2.4 volumetric flask ขนาด 10, 50,100 ml และ 1 L

4.2.5 round bottomed flask ขนาด 125 ml

4.2.6 separatory funnel ขนาด 125 ml

4.2.7 glass funnel

4.2.8 membrane filters ชนิด PVDF ขนาด od 47 mm, 0.45 μm

4.2.9 filtering device for HPLC eluents

4.2.10 HPLC vials สีชา ขนาด 2 ml

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 สารเคมีทุกชนิดเป็นระดับ AR grade หรือเทียบเท่า ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.1.1 methanol, MeOH (HPLC grade หรือเทียบเท่า)

5.1.2 acetonitrile, CH_3CN (HPLC grade หรือเทียบเท่า)

5.1.3 ethyl acetate, EtOAc (HPLC grade หรือเทียบเท่า)

5.1.4 hexane

5.1.5 formic acid, HCOOH

5.1.6 sodium chloride, NaCl

5.1.7 sodium sulfate anhydrous

5.2 วิธีเตรียมสารละลาย

5.2.1 4% NaCl solution: ละลาย NaCl 4 g ด้วย H_2O และปรับปริมาตรเป็น 100 ml

5.2.2 mobile phase A, 0.1% HCOOH ใน H_2O: ปิเปต HCOOH 1.0 ml ลงใน H_2O และปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml แล้วกรองผ่าน membrane filters ขนาด 47 mm, 0.45 μm ด้วย filtering device for HPLC eluents

5.3 สารมาตรฐาน (Standards)

5.3.1 chloramphenicol ความบริสุทธิ์มากกว่า 98.5%

5.3.2 internal standard deuterated chloramphenicol, CAP-d_5 ความเข้มข้น 100 μg/ml หรือเทียบเท่า

5.4 การเตรียมสารมาตรฐาน

5.4.1 การเตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 1 mg/ml: ชั่งสารมาตรฐานประมาณ 10 mg ใช้เครื่องชั่งความละเอียดอย่างน้อย 0.1 mg ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 1 ปี

5.4.2 การเตรียม intermediate standard solution ความเข้มข้น 10 μg/ml: ปิเปต stock standard solution 500 μl ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 4 เดือน

5.4.3 การเตรียม working standard solution ความเข้มข้น 100 ng/ml: ปิเปต intermediate standard solution 500 μl ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8 °C มีอายุการใช้งาน 4 เดือน

5.4.4 การเตรียม intermediate internal standard CAP-d_5 solution ความเข้มข้น 10 μg/ml: เจือจาง stock internal standard CAP-d_5 1 ml ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C อายุการใช้งานตามสารตั้งต้น

5.4.5 การเตรียม working standard CAP-d_5 solution ความเข้มข้น 100 ng/ml: ปิเปต intermediate standard CAP-d_5 solution 500 μl ปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย MeOH เก็บในตู้เย็น 2-8°C มีอายุการใช้งาน 4 เดือน

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 เนื้อสัตว์เฉพาะส่วนเนื้อ น้ำหนักประมาณ 300-500 g หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

6.2 ชั่งตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่บดละเอียดน้ำหนัก 10.0 g ใช้เครื่องชั่งความละเอียดอย่างน้อย 0.01 g ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 ml

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสกัด

7.1.1 เติม working internal standard CAP-d_5 ความเข้มข้น 100 ng/ml ปริมาตร 50 µl ลงในตัวอย่างที่เตรียมไว้ ตั้งไว้ประมาณ 15 min

7.1.2 สกัดด้วย EtOAc 20 ml โดยนำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min หรือจนกว่าตัวอย่างจะแตกละเอียด (กรณีตัวอย่างแตกตัวยากใช้ homogenize ด้วย homogenizer นานประมาณ 30 sec) เขย่าต่อด้วย shaker นาน 10 min

7.1.3 นำตัวอย่างที่ได้ไป centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 5 min ดูดชั้น EtOAc ใส่ใน round bottomed flask ขนาด 125 ml

7.1.4 นำส่วนตะกอนนำมาเติม EtOAc 20 ml นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 min แล้ว centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 5 min ดูดชั้น EtOAc รวมลงใน round bottomed flas

7.1.5 ระเหย EtOAc ที่ได้จนแห้งด้วย เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45°C

7.1.6 ละลาย residue ด้วย MeOH 2 ml และถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน separatory funnel ขนาด 125 ml เติม 4% NaCl 25 ml เขย่าประมาณ 30 sec เติม hexane 20 ml เขย่าประมาณ 1 min ตั้งทิ้งให้แยกชั้น และทิ้งชั้น hexane (ชั้นบน) ชั้น aqueous นำมาสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง ด้วย hexane 20 ml

7.1.7 ชั้น aqueous นำมาสกัดต่อด้วย EtOAc 15 ml เขย่าประมาณ 1 min วางทิ้งให้แยกชั้น กรอง EtOAC ที่ได้ผ่าน sodium sulfate anhydrous ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 15 ml ระเหยชั้น EtOAc จนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45°C

7.1.8 สกัดชั้น aqueous อีกครั้งด้วย EtOAc 15 ml เขย่าประมาณ 1 min วางทิ้งให้แยกชั้นกรอง EtOAc ที่ได้ผ่าน sodium sulfate anhydrous รวมลงใน screw cap centrifuge tube และล้าง sodium sulfate anhydrous ด้วย EtOAc 1-2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1 ml ระเหยชั้น EtOAc จนแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45°C

7.1.9 ละลาย residue ด้วย MeOH: H_2O (1:1) 1.0 ml ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ micro-spin filters ชนิด PVDF นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm นาน 5 min เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vials สีชา ขนาด 2 ml นำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยเครื่อง LC-MS/MS

7.2 สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio (peak area of standard / peak area of internal standard) กับ concentration ratio (concentration of standard/ concentration of internal standard) โดยใช้ปริมาตรของ standard และ internal standard ตามตาราง แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย MeOH: H_2O (1:1)

ความเข้มข้น (ng/ml)	**ปริมาตร (μl) internal standard 100 ng/ml ที่ใช้**	**ปริมาตร (μl) standard 100 ng/ml ที่ใช้**
0.5	250	25
1.0	250	50
2.0	250	100
5.0	250	250
10.0	250	500
20.0	250	1,000

7.3 การหาปริมาณด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS

7.3.1 สภาวะเครื่องมือ LC

analytical column: clipeus C-18 (150 mm × 3.0 mm, 5 μm) หรือเทียบเท่า

solvent A: 0.1% HCOOH acid in H_2O

solvent B: CH_3CN

flowrate: 0.6 ml/min

injection volume: 10 μl

column temperature: 30°C

gradient LC mobile phase

time (min)	**% mobile phase A**	**% mobile phase B**
0.0	90	10
1.5 - 2.5	60	40
5.0 - 7.5	20	80
8.0 - 10.0	90	10

7.3.2 สภาวะเครื่องมือ MS

ionization mode: ESI (turbo spray) negative

ion spray voltage: -3500 eV

temperature TEM: 500°C

collision gas: nitrogen 5 psig

curtain gas (CUR) 16 psig

ion spray nebulizer gas (GS-1) 52 psig

TIS heater gas (GS-2) 58 psig

Entrance potential (EP) -10 V

MS/MS fragmentation conditions

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)
CAP	321.0 ± 0.5	256.7 ± 0.5 (secondary) 151.7 ± 0.5 (primary)
CAP-d_5	326.6 ± 0.5	156.7 ± 0.5 (primary)

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 การคำนวณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve

ปริมาณของสารที่ตรวจพบ, C_A (µg/kg) = $\frac{(Y - b)}{a} \times C_{IS}$

โดย C_A = conc. of analyte

Y = peak area ratio

b = intercept ของ calibration curve

a = slope ของ calibration curve

C_{IS} = conc. of internal standard

8.2 รายงานปริมาณที่ตรวจพบ หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

9.1 สร้าง calibration curve ระหว่าง peak area ratio กับ concentration ratio ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ โดยค่า Correlation coefficient, r ของ calibration curve ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98

9.2 ทดสอบ method blank และ matrix blank ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

9.3 คำนวณ % Relative intensities ของ analyte ion intensities ratio กับ standard ion intensities ratio เพื่อยืนยันการตรวจพบ โดย % Relative intensities ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ ± 20%

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

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

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

$\overline{r_{std}}$ = ค่าเฉลี่ยของ r_{std} ทุกความเข้มข้นของ calibration curve

9.4 วิเคราะห์ spiked matrix ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 μg/kg เพื่อประเมิน % Recovery ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์ โดย % Recovery ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ช่วง 60-120%

9.5 วิเคราะห์ duplicate sample ทุกครั้ง ที่ทำการวิเคราะห์ กรณีตัวอย่างมีจำนวนมาก วิเคราะห์ 10% ของจำนวนตัวอย่าง กรณีตรวจพบ ปริมาณสูงกว่าค่า LOQ ให้คำนวณ Relative Percent Difference (RPD) โดย RPD ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25%

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร ลงวันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2549 กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 0.3 μg/kg

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

1. นายทนงพันธ์ สัจจปาละ	ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)
2. นางลดาพรรณ แสงคล้าย	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
3. นางดวงดาว วงศ์สมมาตร์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
4. นางสาวอุรารัตน์ วุฒิกรภัณฑ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
5. นางอัชฌา สัจจปาละ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
6. นางลดาวัลย์ จึงสมานุกูล	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
7. นางสาวอารุณี ศรพรหม	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ
8. นางสาวปัทมา แดงชาติ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
9. นางสาวมัณฑนา พันธ์บัวหลวง	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
10. นายสมภพ วัฒนมณี	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
11. นางสาวกรุณา ตีรสมิทธ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
12. นางสาวณัฐกานต์ ติยศิวาพร	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
13. นางปิยมาศ แจ่มศรี	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

นิยามและคำย่อ (Definition and Abbreviation)

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

Abbreviation	Word/คำเต็ม
CFU	colony forming unit
MPN	most probable number
H_2S	hydrogen sulfide

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 2020	อาหาร	*Shigella* spp.	I	99
DMSc F 2021	อาหาร	*Escherichia coli* O157	I	121
DMSc F 2022	อาหาร	Enterobacteriaceae	I	133
DMSc F 2023	อาหาร	Enterococci	I	139
DMSc F 2024	อาหาร	mesophilic lactic acid bacteria	I	151
DMSc F 2025	น้ำและน้ำแข็ง	*Vibrio cholerae*	I	161

DMSc F 2020: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Shigella* spp. ในอาหาร
Analytical method of *Shigella* spp. in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Shigella* spp. ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 21567:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 *Shigella* spp.	=	*Shigella* species
3.2 *S. sonnei*	=	*Shigella sonnei*
3.3 *S. dysenteriae*	=	*Shigella dysenteriae*
3.4 *S. boydii*	=	*Shigella boydii*
3.5 *S. flexneri*	=	*Shigella flexneri*
3.6 *E. coli*	=	*Escherichia coli*

4. หลักการ (Principle)

Shigella spp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ติดสีแกรมลบ รูปท่อน ขนาด 2-4 μm × 0.5 μm แต่มักพบรูปร่าง cocco-bacillary ที่มีขนาดสั้นกว่า ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างก๊าซจากน้ำตาลกลูโคส (glucose) ไม่สร้าง H_2S หรือ decarboxylate lysine ไม่ใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) ที่ 24 ชั่วโมง และแบ่งเป็น 4 serogroups คือ A, B, C, D

การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ *Shigella* broth ที่เติม novobiocin 0.5 μg/ml บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 41.5 ± 1°C 16-20 ชั่วโมง

4.2 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (selective agar) ที่มีความจำเพาะ (selectivity) 3 ระดับแตกต่างกันดังนี้ MacConkey agar ระดับต่ำ XLD agar ระดับปานกลาง และ Hektoen enteric agar ระดับสูงสุด บ่มที่ 37 ± 1°C 20-24 ชั่วโมง

4.3 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและโคโลนีที่สงสัยตรวจยืนยันทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Bromocresol purple broth

5.1.2 Christensen's citrate agar

5.1.3 Hektoen enteric (HE) agar

5.1.4 L-Lysine decarboxylase medium

5.1.5 MacConkey agar

5.1.6 Mucate broth

5.1.7 Nutrient agar (NA)

5.1.8 L-Ornithine decarboxylase medium

5.1.9 Semi-solid nutrient agar

5.1.10 *Shigella* broth

5.1.11 Sodium acetate agar

5.1.12 Triple sugar iron (TSI) agar

5.1.13 Tryptone/DL-tryptophan medium

5.1.14 Urea agar (Christensen's medium)

5.1.15 Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar

5.2 สารเคมี

5.2.1 Antisera of *Shigella* species

5.2.2 β-Galactosidase reagent

5.2.3 Kovac's indole reagent

5.2.4 Saline solution

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 ตู้อบเพาะเชื้อแบบไร้ออกซิเจน (anaerobic incubator) 41.5 ± 1°C ส่วนประกอบของก๊าซมี <1% O_2 และ 9-13% CO_2

6.1.3 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.4 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 37 ± 1°C และ 41.5 ± 1°C

6.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.7 เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) หรือเครื่องบดปั่น (rotary blender)

6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 47 ± 3°C 50 ± 1°C และ 100°C

6.2 อุปกรณ์

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) ขนาด 90-100 มิลลิเมตร หรือ 140 มิลลิเมตร

6.2.5 ปิเปต (pipette)

6.2.6 หลอดฝาเกลียว (screw-cap tube)

6.2.7 ถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag) หรือโถปั่น (blender jar)

6.2.8 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เท หรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

ควรเริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างให้เร็วที่สุดเพราะเชื้อ *Shigella* ตายง่าย

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment)

เติม *Shigella* broth ที่เติม novobiocin (0.5 µg/ml) ปริมาตร 9 เท่าของปริมาณตัวอย่าง เช่น เติม *Shigella* broth ที่เติม novobiocin (0.5µg/ml) 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร ตีผสมให้เข้ากัน ถ้าจำเป็นให้ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบบปราศจากเชื้อ ปิดฝาขวดหลวมๆ บ่มที่สภาวะไร้ออกซิเจน 41.5 ± 1°C 16 - 20 ชั่วโมง

7.4 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation)

7.4.1 เขย่าขวดตัวอย่างจากข้อ 7.3 เบา ๆ และปล่อยทิ้งไว้สักครู่ให้ชิ้นอาหารขนาดใหญ่ตกอยู่ก้นขวด

7.4.2 นำเชื้อจากข้อ 7.4.1 ขีดบน MacConkey agar, XLD agar และ HE agar เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว

หมายเหตุ : ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อน *Shigella* spp. จำนวนน้อย หรือหลังขั้นตอน enrichment มี *Shigella* spp. จำนวนน้อยเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร ดังนั้นในบางกรณี เช่น การสอบสวนสาเหตุการเจ็บป่วยจากอาหาร ควรนำเชื้อมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective agar) ชนิดละ 2 จาน (ขนาด 90 - 100 มิลลิเมตร) หรือชนิดละ 1 จาน (ขนาด 140 มิลลิเมตร) เพื่อเพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อ

7.4.3 บ่มที่ 37 ± 1°C 20 - 24 ชั่วโมง

7.4.4 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะคือ กลม ขอบและผิวเรียบ โดยทั่วไปมีขนาดมากกว่า 2 มิลลิเมตร

MacConkey agar	=	ไม่มีสี ขุ่น (translucent) สำหรับโคโลนีของ *S. sonnei* ไม่มีสีหรือมีสีชมพูอ่อน
XLD agar	=	ขุ่น และตรงกลางเป็นสีแดง หรือสีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ
HE agar	=	สีเขียว ชื้น (moist) สำหรับ *S. sonnei* โคโลนีมีลักษณะนูน

7.4.5 ถ้าไม่พบโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและจุลินทรีย์ชนิดอื่นยังเจริญได้ไม่ดี โดยเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะสูง ให้บ่มเพิ่มอีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจหาโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะอีกครั้ง

7.5 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmation)

โคโลนีของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae บางชนิดมีลักษณะคล้าย *Shigella* spp. มาก ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือโคโลนีที่สงสัย 5 โคโลนี/จานของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด กรณีพบน้อยกว่า 5 โคโลนี ให้เลือกทั้งหมด ยกเว้นการตรวจวิเคราะห์อาหารที่เกี่ยวข้องกับโรคอาหารเป็นพิษ ควรเลือกมากกว่า 5 โคโลนี/จาน เพื่อเพิ่มความมั่นใจว่าไม่มี *Shigella* spp. ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารนั้น

7.5.1 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Purification of colonies)

ขีดเชื้อที่สงสัยลงบนจานเพาะเชื้อ NA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่ 37 ± 1°C 18-24 ชั่วโมง ถ้าพบว่าเชื้อยังไม่บริสุทธิ์ ให้ sub-culture บนจานเพาะเชื้อ NA บ่มที่ 37 ± 1°C 18 - 24 ชั่วโมง จนได้เชื้อบริสุทธิ์

S. sonnei มีลักษณะโคโลนี 2 แบบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน คือ

แบบที่ 1 : โคโลนี กลม นูนมีโดม (dome) ผิวเรียบ (phase 1)

แบบที่ 2 : โคโลนี แบน ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน (phase 2)

หมายเหตุ : อาจทดสอบโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะมากที่สุด 1 โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดก่อน ถ้าให้ผลบวกไม่จำเป็นต้องทดสอบโคโลนีที่เหลือ ถ้าให้ผลลบ ต้องทดสอบโคโลนีที่เหลือต่อ จนกระทั่งพบว่าโคโลนีทั้งหมดให้ผลลบหรือพบโคโลนีที่ให้ผลบวก

7.5.2 การยืนยันทางชีวเคมี

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากข้อ 7.5.1 ทดสอบทางชีวเคมีกับอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้

◆ TSI agar

นำเชื้อมา stab ในส่วน butt และ streak บนส่วน slant บ่มที่ 37 ± 1°C 24 ± 3 ชั่วโมง

butt : สีเหลือง (ใช้น้ำตาลกลูโคส)
: สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้น้ำตาลกลูโคส)
: สีดำ (สร้าง H_2S)
: มีฟองอากาศหรือรอยแตกของวุ้น (สร้างก๊าซ)

slant : สีเหลือง (ใช้น้ำตาลแลคโตส และ/หรือน้ำตาลซูโครส)
: สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาลแลคโตส และซูโครส)

Shigella spp. ที่มีลักษณะเฉพาะให้ผลดังนี้

butt สีเหลือง (สร้างกรด) ไม่มีฟองอากาศ

slant สีแดงหรือไม่เปลี่ยนสี (ไม่ใช้ทั้งน้ำตาลแลคโตสและซูโครส) ไม่สร้าง H_2S

◆ Semi-solid nutrient agar for motility tests

นำเชื้อมา stab ลงใน semi-solid nutrient agar บ่มที่ 37 ± 1°C 18-24 ชั่วโมง

ผลบวก : เชื้อเจริญแผ่ออกจากแนว stab

ผลลบ : เชื้อเจริญเฉพาะแนว stab (non-motile)

Shigella spp. ทั้งหมดให้ผลลบ

◆ Urea agar

นำเชื้อมาขีดบนผิวหน้า (slant) บ่มที่ 37 ± 1°C 24 ± 3 ชั่วโมง และตรวจสอบเป็นระยะๆ

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงถึงแดงเข้ม
(มีการย่อย urea เกิดแอมโมเนีย ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

Shigella spp. ให้ผลลบ

◆ L-Lysine decarboxylase medium

ใส่เชื้อต่ำกว่าระดับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 ± 1˚C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง (decarboxylate lysine)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

หมายเหตุ : การใช้พาราฟินเททับหน้าในหลอดช่วยทำให้มั่นใจสภาพไร้ออกซิเจน (anaerobic condition)

Shigella spp. ให้ผลลบ

◆ L-Ornithine decarboxylase medium

ใส่เชื้อต่ำกว่าระดับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 ± 1˚C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อสีม่วง (decarboxylate ornithine)

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

S. sonnei ให้ผลบวก

Shigella spp. อื่น ๆ ให้ผลลบ (ไม่ decarboxylate ornithine)

◆ Indole formation

เขี่ยเชื้อใส่ใน tryptone/tryptophan medium 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 ± 1˚C 24 ± 3 ชั่วโมง เติม Kovac's reagent 1 มิลลิลิตร

ผลบวก : เกิดวงแหวนสีแดงภายใน 10 นาที (สร้าง indole)

ผลลบ : เกิดวงแหวนสีเหลืองหรือสีน้ำตาล

S. sonnei ให้ผลลบ

Shigella spp. อื่นๆ ให้ผลไม่แน่นอน (variable reactions)

◆ β-galactosidase

นำเชื้อจาก NA 1 loop ใส่ลงในหลอดน้ำเกลือ (saline solution) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หยด toluene 1 หยด เขย่าหลอดเพื่อผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 ˚C และตั้งทิ้งไว้หลายนาที เติม complete reagent 0.25 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37˚C 24 ± 3 ชั่วโมง และตรวจสอบเป็นระยะๆ

ผลบวก : เกิดสีเหลืองภายใน 20 นาที (สร้าง β-galactosidase)

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี

S. sonnei ให้ผลบวก

S. dysenteriae และ *S. boydii* ให้ผลไม่แน่นอน (variable reactions)

S. flexneri ให้ผลลบ

◆ Utilization of carbohydrates

เขี่ยเชื้อปริมาณน้อย (small inoculum) ลงในหลอด bromocresol purple broth (carbohydrate และ alcohol ใช้แยกแต่ละตัวดังนี้ : dulcitol, glucose, lactose, mannitol, melibiose, raffinose, salicin, sorbitol, sucrose, xylose) บ่มที่ 37 ± 1°C 24 ± 3 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Shigella spp. จะให้ผลทดสอบตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจำแนกทางชีวเคมี และการตรวจยืนยันของ *Shigella* spp. จาก *E. coli*, *Hafnia* และ *Providencia* species

การทดสอบ	*E. coli*	*Hafnia species*	*Providencia*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*S. dysenteriae*	*S. boydii*
H_2S from TSI	–	–	–	–	–	–	–
Gas from glucose (TSI)	+	V	+	–	–	–[e]	–[e]
Motility	+	V	V	–	–	–	–
Urease	–	–	V	–	–	–	–
L-Lysine decarboxylase	V	+	–	–	–	–	–[i]
L-Ornithine decarboxylase	V	+	–	+	–	–	–
Indole formation	+	–	+	–	V[d] (61 %)	V[d] (44 %)	V[d] (29 %)
β-Galactosidase	+	V	-	+ (95 %)	-	V[f] (50 %)	V[f] (11 %)
Acid from:							
Dulcitol	V	V	–	–	V[g] (9.4 %)	V[g] (4.5 %)	V[g] (6.7 %)
Glucose	+	+	–	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
Lactose	V	V	–	–[c]	–[a]	–	–[a]
Mannitol	+	+	V	+ (99 %)	+[b] (94 %)	–	+ (98 %)
Melibiose	V	V	V	–	V	V	V
Raffinose	V	V	–	–[c] (2.5 %)	V (53 %)	–	–
Salicin	V	V	–	–	–	–	–
Sorbitol	+	–	–	–	V (31 %)	V (29 %)	V (42 %)
Sucrose	V	–	V	–[c] (1.5 %)	–	–	–
Xylose	+	+	–	–	–	V[h] (4.0 %)	V (57 %)

V strains variable ภายใน หรือระหว่าง serovars ของ species, (x %) แสดง % ของ positive strains

[a] บาง strains ของ *S. flexneri* serovar 2a และ *S. boydii* 9 สร้างกรด

[b] บาง strains ของ *S. flexneri* serovars 4 และ 6b ไม่สร้างกรด

[c] *S. sonnei* สร้างกรดหลังจากบ่มหลายวัน

[d] บาง serotypes ของ *S. dysenteriae* และ *S. flexneri* serovar 6 และ *S. boydii* ให้ผลลบ

[e] strains ของ *S. flexneri* และ *S. boydii* serovars 13 และ 14 สร้างกรดและ gas

[f] strains ของ *S. dysenteriae* serovar 1 และ *S. boydii* serovar 13 ให้ผลบวกเสมอ

[g] strains ของ *S. dysenteriae* serovar 5 และ *S. flexneri* serovar 6 ให้ผลบวก

[h] strains ของ *S. dysenteriae* serovars 8 และ 10 ให้ผลบวก และ 4 และ 6 ให้ผลไม่แน่นอน

[i] เฉพาะ strains ของ *S. boydii* serovar 13 ให้ผลบวก

◆ การแปลผลทางชีวเคมี

strains ของ *Shigella* บาง species ให้ผลทางชีวเคมีที่ไม่แน่นอน (ตามตารางที่ 1) ดังนั้นจำเป็นต้องทำการทดสอบทางน้ำเหลือง (serotyping) ด้วย

การทดสอบน้ำตาล mannitol เชื้อ *S. dysenteriae* ให้ผลลบซึ่งแตกต่างจาก *Shigella* spp. อื่น ๆ

การทดสอบ L-Ornithine decarboxylase เชื้อ *S. sonnei* ให้ผลบวก ซึ่งแตกต่างจาก *Shigella* spp. อื่นๆ

7.5.3 การจำแนกทางชีวเคมีเพิ่มเติม (additional biochemical differentiation)

เนื่องจาก *E. coli* และ *Shigella* spp. บาง strains ให้ผลทางชีวเคมีที่เหมือนกัน การทดสอบเพิ่มเติมจะช่วยยืนยันเชื้อได้ดีขึ้น

เขี่ยเชื้อจากข้อ 7.5.1 ทดสอบทางชีวเคมีกับอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปนี้

◆ Sodium acetate

นำเชื้อมาขีดบนผิวหน้า (slant) ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อติดมากับเชื้อน้อยที่สุด) บ่มที่ 37 ± 1°C 2 วัน

ผลบวก : มีการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อ ให้บ่มเพิ่มอีก 2 วัน ที่ 37 ± 1°C แล้วตรวจสอบอีกครั้ง

Shigella spp. ไม่มีการเจริญของเชื้อหรือเจริญได้น้อยมาก

E. coli ให้โคโลนีสีน้ำเงินและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ล้อมรอบ สีน้ำเงิน/สีเขียว

◆ Christensen's citrate

นำเชื้อมาขีดบนผิวหน้า (slant) ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อติดมากับเชื้อน้อยที่สุด) บ่มที่ 37 ± 1°C 2 วัน

ผลบวก : มีการเจริญของเชื้อ สีครีม/สีชมพู อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อ ให้บ่มเพิ่มอีก 2 วัน แล้วตรวจสอบอีกครั้ง

Shigella spp. ไม่มีการเจริญของเชื้อ

◆ Sodium mucate

เขี่ยเชื้อลงในหลอด test broth และ control broth บ่มที่ 37 ± 1°C 2 วัน

ผลบวก : มีการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

ผลลบ : มีการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสีน้ำเงิน ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อ ให้บ่มเพิ่มที่ 37 ± 1°C 2 วัน แล้วตรวจสอบอีกครั้ง

S. sonnei ให้ผลไม่แน่นอน (variable reactions)

Shigella spp. อื่น ๆ ให้ผลลบ

Shigella spp. จะให้ผลทดสอบตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนก *Shigella* spp. และ *E. coli* บาง strains

Species	ผลทางชีวเคมี (การเจริญ) หลังการบ่มตามกำหนดเวลา					
	Sodium acetate		Christensen's citrate		Sodium mucate	
	% ผลบวก เมื่อบ่มครบ 2 วัน	% ผลบวก หลังจากบ่ม 2 วัน	% ผลบวก เมื่อบ่มครบ 2 วัน	% ผลบวก หลังจากบ่ม 2 วัน	% ผลบวก เมื่อบ่มครบ 2 วัน	% ผลบวก หลังจากบ่ม 2 วัน
S. dysenteriae	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
S. flexneri	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
S. boydii	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
S. sonnei	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	V (6.4)	V (36.7)
E. coli	V (83.8)	+ (93.5)	V (>15.3)	V (>34.2)	+ (91.6)	+ (93.0)

+ > 90 % strains positive
- > 90 % strains negative
V ผลไม่แน่นอน (variable results) ระหว่าง 10% - 89% strains positive
% เปอร์เซ็นต์ของ positive strains หลังการบ่ม

7.5.4 การยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

7.5.4.1 การจำแนกแอนติเจน (antigenic differentiation)

Shigella spp. เป็น non-motile ดังนั้นไม่มี flagella antigens การจำแนกภายในและระหว่าง species ขึ้นกับการวิเคราะห์ชนิดแอนติเจน somatic group "O" และ specific "O" ที่แตกต่างกัน ตามตารางที่ 3 โดยใช้เชื้อที่เตรียมใหม่ (fresh culture) เจริญบน NA มาทดสอบการตกตะกอนบนแผ่นกระจกที่สะอาด

ตารางที่ 3 การจำแนกแอนติเจนภายใน *Shigella* spp.

***Shigella* spp.**	**Antigenic group**	**Serovars (specific antigen designation)**
S. dysenteriae	A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
S. flexneri	B	1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, X, Y
S. boydii	C	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
S. sonnei	D	1

หมายเหตุ : 1. group antigens (A, B, C, D) มี minor antigens ที่อาจเกิดการตกตะกอนข้าม (cross react) กับ group antigens อื่นๆ หลีกเลี่ยงโดยใช้ absorbed antisera และ/หรือ ทำการเจือจางจนถึงระดับที่กำหนดบาง species โดยเฉพาะ *S. dysenteriae* มี envelope antigens ที่ปกคลุม group antigens และ serovar antigens ป้องกันไม่ให้เกิดการตกตะกอนกับ specific antisera สามารถกำจัด envelope antigen โดยการต้มสารแขวนลอยเชื้อที่ 100˚C 15-60 นาที

2. *S. sonnei* มี antigen group D ทั้งในโคโลนีที่ผิวเรียบและหยาบ และไม่เกิดการตกตะกอนข้าม (cross react) กับ antigen group ของ *Shigella* spp. อื่น ๆ โคโลนีที่ผิวหยาบไม่จำเป็นต้องทดสอบ auto-agglutinate และ *S. sonnei* ไม่มี envelope antigen

7.5.4.2 การทดสอบการตกตะกอน (Agglutination tests)

หยด group antiserum 1 หยดและน้ำเกลือ 1 หยด ให้แยกกันบนแผ่นกระจก เขี่ยเชื้อมาแตะบนน้ำเกลือ และ antiserum ผสมให้เข้ากัน เอียงแผ่นกระจกไป-มาเบา ๆ 30-60 วินาที

ผลบวก : ตกตะกอนใน antiserum และไม่ตกตะกอนในน้ำเกลือ

auto-agglutinate : ตกตะกอนในน้ำเกลือ

ถ้า strains ที่เกิด auto-agglutinate ไม่ต้องทดสอบต่อ ให้ทดสอบโคโลนีอื่น ๆ จากเชื้อเดียวกัน และเชื้อที่แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective agar) ที่ผลทางชีวเคมี ว่าเป็น *Shigella* spp.

ถ้าผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็น *Shigella* spp. แต่การทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาให้ผลลบ นำสารแขวนลอยเชื้อไปให้ความร้อนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 100˚C 60 นาที แล้วทดสอบการตกตะกอนซ้ำ

7.5.4.3 การทดสอบยืนยันขั้นสุดท้าย (Definitive confirmation)

โคโลนีที่เกิด auto-agglutinate หรือโคโลนีที่ให้ผลทางชีวเคมี และ/หรือทางน้ำเหลืองวิทยาไม่ชัดเจน ให้ส่งตรวจยืนยันที่ WHO National *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

8. การคำนวณ (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

Shigella spp. /น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจหา (detection) *Shigella* spp. ในอาหาร

10.3 ภาคผนวก 3 : รายละเอียดรูปร่างลักษณะของโคโลนี *Shigella* spp. และสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agars)

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. *Shigella* broth

1.1 Base medium

Enzymatic digest of casein	20	กรัม
Potassium hydrogen phosphate (anhydrous)	2	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
D(+)-Glucose	1	กรัม
Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80)	1.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

1.2 Novobiocin solution

Novobiocin	25	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย novobiocin ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านเมมเบรน pore size 0.2 µm เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

การใช้งาน (Complete medium)

เติม novobiocin solution 5 มิลลิลิตร ลงใน base medium 225 มิลลิลิตร หรือเติม novobiocin solution 22 มิลลิลิตร ลงใน base medium 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากเติมตัวอย่าง 25 กรัม/มิลลิลิตร ลงไปแล้วความเข้มข้นสุดท้ายของ novobiocin เท่ากับ 0.5 µg/ml

2. MacConkey agar

Enzymatic digest of casein and animal tissues	20	กรัม
Lactose	10	กรัม
Bile salts No.3	1.5	กรัม

Sodium chloride	5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ปรับ pH 7.1 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที หรือตามที่ผู้ผลิตระบุ ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47˚C เทใส่จานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว ต้องทำให้ผิวหน้าแห้ง ก่อนนำมาใช้งาน เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 2 สัปดาห์

3. Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar

Yeast extract	3	กรัม
L-Lysine HCl	5	กรัม
Xylose	3.75	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Saccharose	7.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium desoxycholate	1	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Ammonium ferric citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ปรับ pH 7.4 ± 0.2 ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47˚C เทใส่จานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว ต้องทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนนำมาใช้งาน เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 2 สัปดาห์

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

4. Hektoen enteric (HE) agar

Enzymatic digest of meat	12	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Lactose	12	กรัม
Saccharose	12	กรัม
Salicin	2	กรัม
Bile salts No.3	9	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	5	กรัม
Ammonium ferric citrate	1.5	กรัม
Acid fuchsin	0.1	กรัม
Bromothymol blue	0.065	กรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย หรือตามที่ผู้ผลิตระบุ ปรับ pH 7.5 ± 0.2 ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47˚C เทใส่จานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว ต้องทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนนำมาใช้งานเก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 2 สัปดาห์

5. Nutrient agar (NA)

Meat extract	3	กรัม
Enzymatic digest of casein	5	กรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ 47˚C เทใส่จานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว ต้องทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนนำมาใช้งานเก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 2 สัปดาห์

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

6. Triple sugar iron (TSI) agar

Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	20	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Glucose	1	กรัม
Ferric 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 ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ปรับ pH 7.4 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวโดยการเอียงหลอดให้มีส่วนสูงของ butt 2.5 - 5 เซนติเมตร เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

7. Semi-solid nutrient agar

Meat extract	3	กรัม
Enzymatic digest of animal tissue	5	กรัม
Agar	4-9*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

8. Urea agar (Christensen's medium)

8.1 Base medium

Enzymatic digest of animal tissue	1	กรัม
Glucose	1	กรัม

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

Sodium chloride	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 ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ปรับ pH 6.8 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

8.2 Urea solution

Urea	400	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง (ปรับปริมาตรเป็น)	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย urea ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane filter ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.2 micron

8.3 Complete medium

Base medium	900	มิลลิลิตร
Urea solution	50	มิลลิลิตร

การใช้งาน (complete medium)

เติม urea solution ใน base medium ที่หลอมละลาย และทำให้เย็นลงที่ 47˚C แบ่งใส่หลอด 10 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวโดยการเอียงหลอด

9. L-Lysine decarboxylase medium

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

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

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

10. L-Ornithine decarboxylase medium

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ปรับ pH 6.8 + 0.2 แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

11. Tryptone/DL-tryptophan medium

Pancreatic digest of casein	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
DL- Tryptophan	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายปรับ pH 7.5 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

12. Bromocresol purple broth

Enzymatic digest of animal tissue	10	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Carbohydrate or alcohol*	10	กรัม
Bromocresol purple	0.04	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

* Carbohydrate และ alcohol ใช้แยกแต่ละตัวดังนี้ : dulcitol, glucose, lactose, mannitol, melibiose, raffinose, salicin, sorbitol, sucrose, xylose

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane filter ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.2 micron แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร และตรวจสอบความปราศจากเชื้อโดยสุ่มหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 37˚C 24 ชั่วโมง เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

13. Sodium acetate agar

Sodium acetate	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Magnesium sulfate (anhydrous) ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
Ammonium phosphate	1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1	กรัม
Bromothymol blue	0.08	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น $MgSO_4$ ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย และคนผสมให้เข้ากัน แล้วเติม $MgSO_4$ หรือตามที่ผู้ผลิตระบุ ปรับ pH 6.7 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 8 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวโดยการเอียงหลอดให้ได้ผิวหน้า (slant) ยาว 5 เซนติเมตร

14. Christensen's citrate agar

Sodium citrate	3	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Cysteine monohydrochloride	0.1	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.4	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	0.08	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย และคนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 6.9 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดปริมาตร 1/3 ของหลอด ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวโดยการเอียงหลอดให้ได้ผิวหน้า (slant) ยาว 4-5 เซนติเมตร butt สูง 2-3 เซนติเมตร

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

15. Mucate broth

Test broth

Enzymatic digest of casein**	10	กรัม
Mucic acid	10	กรัม
Bromothymol blue	0.024	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย mucic acid โดยเติม NaOH (5 mol/l) จำนวนน้อยลงไปช้าๆ ผสมให้เข้ากัน ละลาย enzymatic digest of casein ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม mucic acid ปรับ pH 7.4 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 10 นาที

Control broth

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Bromothymol blue	0.024	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.4 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 10 นาที

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Antisera of *Shigella* species ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. β-Galactosidase reagent

2.1 Buffer solution

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)		6.9	กรัม
Sodium hydroxide (10 mol/l solution)	ประมาณ	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง (ปรับปริมาตรเป็น)		50	มิลลิลิตร

ละลาย sodium dihydrogen phosphate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองประมาณ 45 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ปรับ pH 7.0 ± 0.2 ด้วยสารละลาย NaOH ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร

** ใช้ nutrient broth No.2 จำนวน 25 กรัม แทนได้

2.2 ONPG solution

o-Nitrophenol-β-D-galactopyranoside (ONPG)	0.08	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	15	มิลลิลิตร

ละลาย ONPG ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรองที่ 50˚C แล้วทำให้สารละลายเย็นลง

2.3 Complete medium

Buffer solution	5	มิลลิลิตร
ONPG solution	15	มิลลิลิตร

การใช้งาน (complete medium)

เติม buffer solution ลงใน ONPG solution เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

3. Kovac's indole reagent

4-Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Hydrochloric acid (*p*=1.18 g/ml to 1.19 g/ml)	25	มิลลิลิตร
2-Methylbutan-2-ol	75	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบเข้าด้วยกัน เก็บที่ 5 ± 3˚C ได้นาน 1 เดือน

4. Saline solution

Sodium chloride	8.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย sodium chloride ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.0 ± 0.2 แบ่งใส่หลอด 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

ภาคผนวก 2

ตัวอย่าง 25 กรัม/มิลลิลิตร + *Shigella* broth 225 มิลลิลิตร (เติม novobiocin 0.5 µg/ml)

↓

ตีผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับ pH 7.0 ± 0.2

↓ บ่มสภาวะไร้ออกซิเจน 41.5 ± 1°C 16-20 ชั่วโมง

ขีดบน MacConkey agar, XLD agar และ HE agar

↓ 37 ± 1°C 20-24 ชั่วโมง

ถ้าไม่พบโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะหรือสงสัย และจุลินทรีย์ชนิดอื่นยังเจริญได้ไม่ดี
บ่มเพิ่มอีก 18-24 ชั่วโมง

↓

เขี่ยเชื้ออย่างน้อย 5 โคโลนี/จาน ลงบนจานเพาะเชื้อ NA (แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว)

↓ 37 ± 1°C 20-24 ชั่วโมง

ทดสอบทางชีวเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ/ปฏิกิริยา	ผลการทดสอบ
TSI agar	butt สีเหลือง slant สีแดง ไม่สร้างก๊าซ และ H_2S
Motility	non-motile
Urea agar	- (อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี)
L-Lysine decarboxylase	- (สีเหลือง)
L-Ornithine decarboxylase	- (สีเหลือง) ยกเว้น *S. sonnei* + (สีม่วง)
Indole	+ (วงแหวนสีแดง)/-(สีเหลือง/น้ำตาล) ยกเว้น *S. sonnei* -

อาหารเลี้ยงเชื้อ/ปฏิกิริยา	ผลการทดสอบ
β-galactosidase	*S. sonnei* + (สีเหลือง) *S. dysenteriae, S. boydii* +/- *S. flexneri* -
การใช้น้ำตาล dulcitol, glucose, lactose, mannitol, melibiose, raffinose, salicin, sorbitol, sucrose, xylose	ผลตามตารางที่ 1
Sodium acetate	- (สีเขียว ไม่เจริญ/เจริญน้อยมาก)
Christensen's citrate	- (ไม่เจริญ)
Sodium mucate	- (สีน้ำเงิน) ยกเว้น *S. sonnei* + (สีเหลือง) / -

↓

ทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา

↓

กรณีต้องการทราบ serovar ส่งตรวจยืนยันที่ WHO *Salmonella* and *Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

↓

รายงานผล

แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *Shigella* spp. ในอาหาร

ภาคผนวก 3

รายละเอียดรูปร่างลักษณะโคโลนีของ *Shigella* spp. และสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agars) สำหรับวัตถุประสงค์การจำแนกเชื้อและการควบคุมคุณภาพ

Enterobacteriaceae ทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ มีลักษณะโคโลนี กลม ผิวและขอบเรียบ โดยทั่วไปขนาดมากกว่า 2 มิลลิเมตร รายละเอียดตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รูปร่างลักษณะโคโลนีของ *Shigella* spp. และสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง

แบคทีเรีย (species)	อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง		
	MacConkey agar	XLD agar	Hektoen agar
*Shigella sonnei**	ไม่มีสีถึงสีชมพูอ่อน ขุ่น (translucent) lactose negative	ขุ่น ตรงกลางเป็นสีแดง, สีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ	โคโลนีนูนสีเขียวและชื้น
Shigella spp. อื่นๆ	ไม่มีสี ขุ่น lactose negative	ขุ่น ตรงกลางเป็นสีแดง, สีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ	สีเขียวและชื้น
Escherichia coli	สีแดง มีตะกอนขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ	สีเหลือง ทึบ ล้อมรอบด้วยตะกอนสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ	สีแดง/สี salmon มีโซนของตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
Enterobacter cloacae	สีแดง มีตะกอนขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ	สีเหลือง ทึบ ล้อมรอบด้วยตะกอนสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ	สีแดง/สี salmon มีโซนของตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
Klebsiella pneumoniae	สีแดง มีตะกอนขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ	สีเหลือง ทึบ เป็นเมือก ล้อมรอบด้วยตะกอนสีเหลือง	สีแดง/สี salmon มีโซนของตะกอนในอาหาร เลี้ยงเชื้อ
Salmonella	ไม่มีสี ขุ่น อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีสีเหลือง	สีแดง ตรงกลางสีดำ	สีเขียวแกมน้ำเงิน มี/ไม่มีสีดำตรงกลาง
Proteus mirabilis	ไม่มีสี ขุ่น อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีสีเหลือง	สีเหลือง ตรงกลางสีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง มีตะกอน	สีน้ำเงิน/สีเขียว มี/ไม่มีสีดำตรงกลาง
Enterococcus faecalis	โคโลนีขนาดเล็ก กลม สีแดง	ไม่มีการเจริญ/เจริญน้อยมาก โคโลนีสีเหลือง	ไม่มีการเจริญ/เจริญน้อยมาก โคโลนีสีเหลือง

* *Shigella sonnei* อาจใช้น้ำตาล lactose หลังการบ่มมากกว่า 40 ชั่วโมง ทำให้เกิดผล weak คล้าย *Escherichia coli* โคโลนีของ *S. sonnei* มีทั้งแบบเรียบจนถึงหยาบ สูญเสีย 120-megadalton plasmid และสูญเสียความรุนแรง โคโลนีอาจเกิด auto-agglutination ในน้ำเกลือ และ antiserum

DMSc F 2021: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Escherichia coli* O157 ในอาหาร
Analytical method of *Escherichia coli* O157 in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Escherichia coli* O157 ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจหา (detection)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1	*E. coli* O157	=	*Escherichia coli* serogroup O157
3.2	*E. coli*	=	*Escherichia coli*
3.3	IMS	=	Immunomagnetic separation

4. หลักการ (Principle)

E. coli O157 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่ใช้น้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) และไม่สร้างเอนไซม์ β-glucuronidase ซึ่งต่างจาก *E. coli* ส่วนใหญ่ (มากกว่า 90%) ที่ใช้น้ำตาลซอร์บิทอล และสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase ได้

การตรวจหา (detection) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ modified tryptone soya broth ที่เติม novobiocin (mTSB+N) บ่มที่ 41.5 ± 1°C 6 ชั่วโมง และบ่มเพิ่ม 12-18 ชั่วโมง

4.2 การแยกเชื้อและทำให้เชื้อเข้มข้น (separation and concentration) ใช้ immunomagnetic particles ที่เคลือบด้วย antibodies ต่อ *E. coli* O157

4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง (selective agar)

4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตรวจยืนยันทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Cefixime tellurite sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอีกหนึ่งชนิด

5.1.2 Modified tryptone soya broth with novobiocin (mTSB + N)

5.1.3 Nutrient agar (NA)

5.1.4 Tryptone/tryptophan medium

5.2 สารเคมี

5.2.1 Anti-*Escherichia coli* O157 immunomagnetic particles

5.2.2 *Escherichia coli* O157 antiserum

5.2.3 Kovac's indole reagent

5.2.4 Wash buffer: Modified phosphate buffer, 0.01 mol/l, pH 7.2

5.2.5 Normal saline solution

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 37 ± 1°C และ 41.5 ± 1°C

6.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.5 เครื่องผสมแบบหมุน (rotary mixer) ความเร็ว 15-20 รอบ/นาที

6.1.6 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.7 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 44-47°C

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 หลอดพลาสติกชนิด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 ห่วง (loop)

6.2.5 แท่งแม่เหล็ก (magnetic separator) พร้อม magnetic rack

6.2.6 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร

6.2.7 พาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette)

6.2.8 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.9 ปิเปต (pipette)

6.2.10 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.11 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืดเขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 25 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เท หรือปิเปตตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และสุ่มตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น 25 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เติม mTSB+N (pre-warmed ที่อุณหภูมิ 41.5˚C) ปริมาตร 9 เท่าของปริมาณตัวอย่าง เช่น เติม mTSB+N 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

หมายเหตุ : แนะนำให้ใช้ถุงตีผสมอาหารชนิดกรอง (stomacher bag with mesh) เพื่อไม่ให้ชิ้นส่วนอาหารรบกวนในขั้นตอน immunocapture

7.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment)

7.3.1 บ่มที่ 41.5˚C 6 ชั่วโมง และบ่มต่ออีก 12-18 ชั่วโมง จนครบเวลาบ่ม 18 - 24 ชั่วโมง

7.3.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 7.3.1 ที่ได้จากการบ่ม 6 ชั่วโมงทำ immunomagnetic separation (IMS)

7.4 Immunomagnetic separation (IMS)

การทำ IMS ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มหลังจาก 6 ชั่วโมง และถ้าจำเป็นต้องทำอีกครั้งให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากบ่มต่ออีก 12-18 ชั่วโมง

7.4.1 Immunocapture

7.4.1.1 เขย่าขวดตัวอย่าง จากข้อ 7.3.1 และปล่อยทิ้งไว้สักครู่ให้ชิ้นอาหารตกอยู่ก้นขวด

7.4.1.2 เตรียม anti-*Escherichia coli* O157 immunomagnetic particles ที่ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง ใส่ในหลอด Eppendorf ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

7.4.1.3 ปิเปตตัวอย่างจากส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 7.4.1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (หลีกเลี่ยงชิ้นส่วนของอาหารหรือไขมัน) ใส่ในหลอดข้อ 7.4.1.2 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ rotary mixer ความเร็ว 12-20 รอบ/นาที นาน 10 นาที

ข้อควรระวัง ใช้เทคนิคปราศจากเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอกและการเกิดละอองฝอยในอากาศ ถ้าเป็นไปได้ให้ทำในตู้ปราศจากเชื้อ (safety cabinet) และสวมถุงมือ

7.4.2 Separation

7.4.2.1 ขั้นตอนการล้าง

- นำหลอด จากข้อ 7.4.1.3 ใส่ใน magnetic rack พร้อมแท่งแม่เหล็ก เพื่อให้แม่เหล็กจับ magnetic particles โดยหมุน rack เบา ๆ เป็นมุม 180 องศา เปิดฝาหลอดอย่างระมัดระวังไม่ให้กระทบ particles ข้างหลอด ใช้ pasteur pipette ค่อย ๆ ดูดของเหลวจากก้นหลอดทิ้ง
- เติม wash buffer 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด ปิดฝา นำแท่งแม่เหล็กออก
- หมุน rack เบา ๆ เป็นมุม 180 องศา ใส่แท่งแม่เหล็กกลับเข้าไปใน magnetic rack
- ใช้ pasteur pipette ค่อย ๆ ดูดของเหลวทิ้ง
- ล้างด้วย wash buffer ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง
- ใช้ pasteur pipette ดูดของเหลวทิ้ง นำแท่งแม่เหล็กออกจาก magnetic rack

7.4.2.2 เติม wash buffer 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดข้อ 7.4.2.1 เขย่าให้ magnetic particles แขวนลอยใน buffer

หมายเหตุ : 1. เปลี่ยน pasteur pipette ทุกครั้งเมื่อทำตัวอย่างใหม่
2. วิธีนี้ไม่เหมาะกับอาหารบางชนิด เช่น fat products หรือ fresh cheese

7.5 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation)

ถ่าย magnetic particles ที่แขวนลอยใน buffer จากข้อ 7.4.2.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบน CT-SMAC และ 50 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่นอีกหนึ่งชนิด แล้วขีดแยกเชื้อ (streak) จากนั้น นำ CT-SMAC บ่มที่ 37˚C 18-24 ชั่วโมง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นบ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต หรือตามความเหมาะสม

หมายเหตุ : การบ่มเพาะเชื้อ enrichment broth ที่ 20 ถึง 24 ชั่วโมง อาจมีจุลินทรีย์อื่นเจริญเพิ่มมากขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ทำให้สังเกตเห็นเชื้อ

E. coli O157 ได้ยาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างอาหารและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ (microbial flora) การเจือจางสารแขวนลอย magnetic particles (จากข้อ 7.4.2.2) หรือลดปริมาตรให้น้อยกว่า 50 ไมโครลิตร ต่อจานเพาะเชื้อ สามารถเพิ่มโอกาสในการแยกโคโลนีเดี่ยว ของ *E. coli* O157 แต่อาจทำให้ขีดจำกัดของการตรวจพบ (detection limit) เพิ่มขึ้น

ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *E. coli* O157

- CT-SMAC โคโลนีใสเกือบไม่มีสี โดยมีสีน้ำตาลอมเหลือง อ่อน ๆ ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร
- อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งอื่น เป็นไปตามคำแนะนำของผู้ผลิต

7.6 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmation)

สามารถใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีทางการค้า ในการจำแนก *E. coli* ที่ไม่ใช้น้ำตาลซอร์บิทอล และ indole ให้ผลบวก และ ชุด latex agglutination สำหรับ *E. coli* O157

7.6.1 เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะ 5 โคโลนี ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด กรณีพบน้อยกว่า 5 โคโลนี ให้เลือกทั้งหมด ขีดบนจานเพาะเชื้อ NA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่ 37˚C 18-24 ชั่วโมง

7.6.2 การยืนยันทางชีวเคมี

- ทดสอบการสร้าง indole

  เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีจากจานเพาะเชื้อ NA (จากข้อ 7.6.1) ลงในหลอด tryptone/tryptophan medium บ่มที่ 37˚C 24 ชั่วโมง เติม Kovac's reagent 1 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

  ผลบวก : เกิดสีแดง

  ผลลบ : เกิดสีเหลือง/สีน้ำตาล

  E. coli O157 ให้ผลบวก

7.6.3 การยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

นำเชื้อที่ผล indole เป็นบวกมาทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา โดยใช้ antiserum ต่อ *E. coli* O157

7.6.3.1 หยด saline solution 1 หยด บนแผ่นกระจกที่สะอาด ใช้ loop เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี จากจานเพาะเชื้อ NA (จากข้อ 7.6.1) ผสมให้เข้ากันเอียงสไลด์ไปมา 30-60 วินาที สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอนแสดงว่าเป็น auto-agglutination ไม่ต้องทดสอบกับ *E. coli* O157 antiserum ต่อไป

7.6.3.2 ทดสอบเชื้อที่ไม่เกิด auto-agglutination โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 7.6.3.1 แล้วเติม *E. coli* O157 antiserum หยดเล็กๆ ลงไป ถ้าตกตะกอนภายใน 1 นาที แสดงว่าให้ผลบวก

7.6.3.3 โคโลนีที่สงสัย หรือให้ผลบวกที่ต้องการตรวจหาแฟลกเจลลาแอนติเจน และการก่อโรคให้ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

8. การคำนวณ (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

E. coli O157/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร) พบ หรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจหา (detection) *E. coli* O157 ในอาหาร

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Cefixime tellurite sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC)

1.1 Base medium

Enzymatic digest of casein	17	กรัม
Enzymatic digest of animal tissues	3	กรัม
Sorbitol	10	กรัม
Bile salts No.3	1.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	9-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

1.2 Potassium tellurite solution

Potassium tellurite for bacteriological use	0.25	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย potassium tellurite ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane เก็บอุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน แต่ถ้าเกิดตะกอนสีขาวต้องทิ้งไป

1.3 Cefixime solution

Cefixime	5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย cefixime ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane (cefixime จะต้องทำการละลายใน ethanol ก่อน) เก็บที่ 3 ± 2°C ได้นาน 1 สัปดาห์

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

1.4 Complete medium

Base medium (1.1)	1,000	มิลลิลิตร
Potassium tellurite solution (1.2)	1	มิลลิลิตร
Cefixime solution (1.3)	1	มิลลิลิตร

การใช้งาน (Complete medium)

เติม 1 มิลลิลิตร potassium tellurite solution และ 1 มิลลิลิตร cefixime solution ลงใน base medium 1,000 มิลลิลิตร ที่หลอมและทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 44-47˚C เขย่าให้เข้ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ tellurite เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefixime เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำมาเทลงในจานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว ก่อนนำมาใช้ต้องทำให้ผิวหน้าแห้งไม่มีหยดน้ำ (dry plate) เก็บในถุงพลาสติกและในที่มืดที่ 3 ± 2˚C ได้นาน 2 สัปดาห์

2. Modified tryptone soya broth with novobiocin (mTSB+N)

2.1 Modified tryptone soya broth (mTSB)

Enzymatic digest of casein	17	กรัม
Enzymatic digest of soya	3	กรัม
D(+)-glucose	2.5	กรัม
Bile salts No.3	1.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

2.2 Novobiocin solution

Novobiocin	0.45	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย novobiocin ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane เตรียมในวันที่ใช้งาน

การใช้งาน (Complete medium)

เติม novobiocin solution 1 มิลลิลิตร หรือ 4 มิลลิลิตร ลงใน mTSB 225 มิลลิลิตร หรือ 900 มิลลิลิตร ที่ทำให้เย็น ความเข้มข้นสุดท้ายของ novobiocin เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อ mTSB 1 ลิตร

3. Nutrient agar (NA)

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

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

4. Tryptone/tryptophan medium

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ถ้าจำเป็นให้ความร้อนในการละลาย แบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Anti-*Escherichia coli* O157 immunomagnetic particles ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. *Escherichia coli* O157 antiserum ใช้ชนิดสำเร็จรูป
3. Kovac's indole reagent

4-Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Hydrochloric acid (p_{20}1.18 g/ml to 1.19 g/ml)	25	มิลลิลิตร
2-Methylbutan-1-ol or pentan-1-ol	75	มิลลิลิตร

ละลาย 4-Dimethylaminobenzaldehyde ใน alcohol ถ้าจำเป็นให้อุ่นในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 44-47˚C ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ค่อยๆ เติม HCL เก็บที่อุณหภูมิ 3 ± 2˚C ในขวดสีชา น้ำยาต้องมีสีเหลืองอ่อนถึงน้ำตาลอ่อน และไม่มีตะกอน

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

4. Wash buffer: Modified phosphate buffer, 0.01 mol/l, of pH 7.2

Sodium chloride	8	กรัม
Potassium chloride	0.2	กรัม
Disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	1.44	กรัม
Potassium dihydrogen phoaphate (anhydrous)	0.24	กรัม
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20 syrup)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

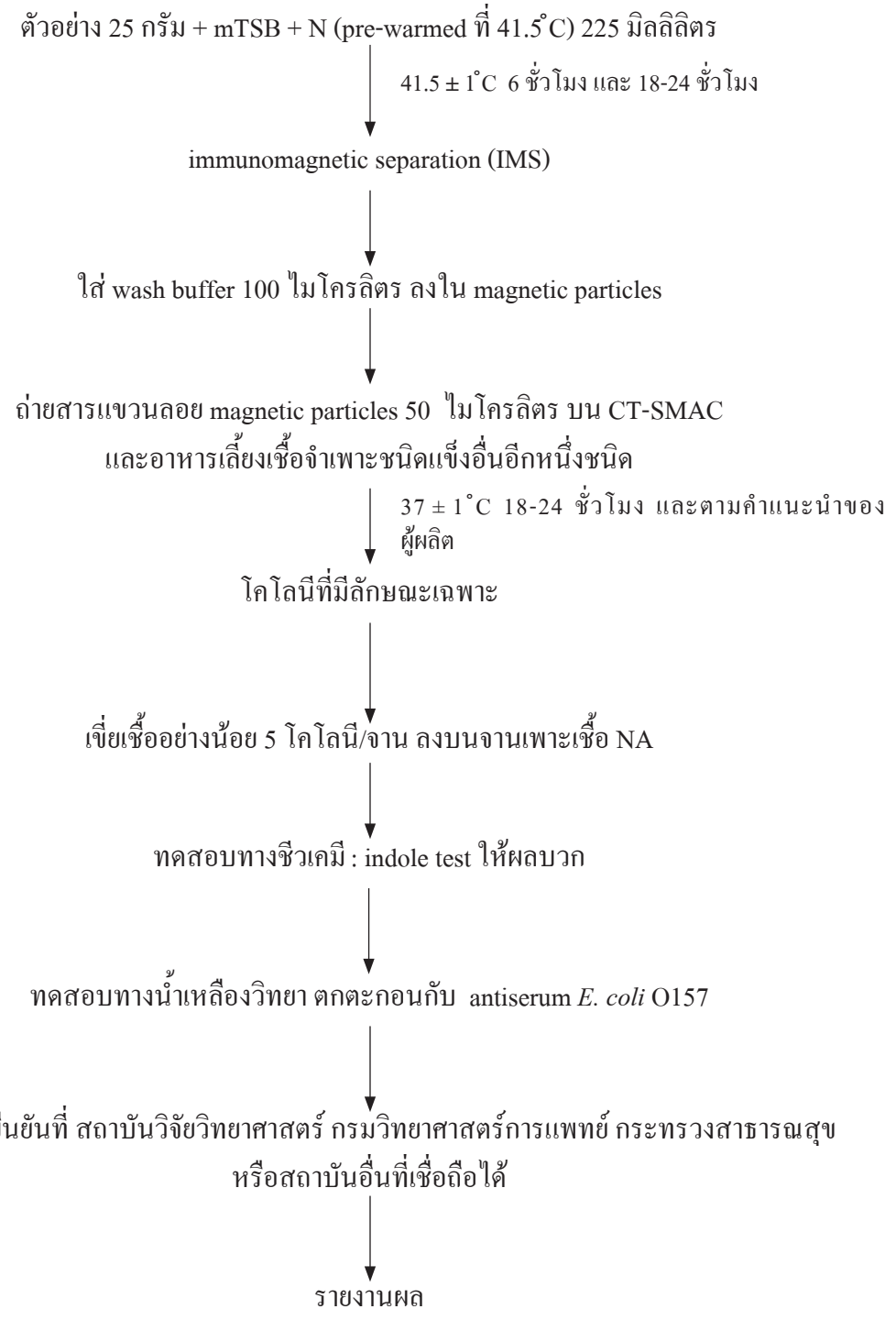
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 สารละลายอาจจะขุ่นแต่เมื่อตั้งทิ้งไว้จะใส

5. Normal saline solution

Sodium chloride	8.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย sodium chloride ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวด ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *E. coli* O157 ในอาหาร

DMSc F 2022: วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterobacteriaceae ในอาหาร
Analytical method of Enterobacteriaceae in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association. Compendium of Methods for The Microbiological examination of foods. 5th ed. 2015. Chapter 9 "Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators".

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1 mesophilic bacteria หมายถึงแบคทีเรียที่มีอุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 ˚C

3.2 psychrotrophic bacteria หมายถึงแบคทีเรียที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิแช่เย็น 0-7˚C โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30˚C

4. หลักการ (Principle)

Enterobacteriaceae เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีทั้งชนิดที่มีและไม่มี flagella (peritrichous flagella) สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นกรด สร้างเอนไซม์ catalase และรีดิวซ์ nitrate พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์และในสิ่งแวดล้อม เชื้อกลุ่มนี้ไวต่อความร้อน (heat-sensitive) ส่วนความทนทานต่ออุณหภูมิแช่แข็งแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ และเนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายโดยน้ำยาฆ่าเชื้อ (sanitizers) จึงเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีสำหรับสุขลักษณะของสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตอาหาร แบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ได้แก่ *Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella* และ *Yersinia* ส่วนใหญ่เป็น mesophilic bacteria แต่บางสายพันธุ์ของ *Enterobacter, Hafnia, Yersinia* และ *Serratia* จัดเป็น psychrotrophic bacteria ซึ่งสามารถเจริญ

ได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 0°C การบ่มที่อุณหภูมิต่ำ (4°C, 10°C, 25°C และ 30°C) อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารแช่เย็นที่อาจมีการปนเปื้อนของ Enterobacteriaceae กลุ่ม psychrotrophic bacteria การตรวจนับจำนวน Enterobacteriaceae ทำได้โดยนำตัวอย่างเริ่มต้น หรือตัวอย่างที่เจือจาง ตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100, …) ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อเทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน เมื่อวุ้นแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C และนับจำนวนโคโลนี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Violet red bile glucose agar (VRBGA)

5.1.2 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent): Butterfield's phosphate buffered dilution water หรือ 0.1% peptone water

5.2 สารเคมี

-

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

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 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.8 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 45 ± 2°C

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.4 ปิเปต (pipette)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลาย ๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืด เขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่าง 25 กรัม (สามารถเพิ่มขนาดของตัวอย่างได้ เช่น 50 กรัม) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ (กรณีตัวอย่างเป็นอาหารแช่แข็ง จะต้องละลาย (thawed) ตัวอย่างก่อนโดยนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 2-5°C ประมาณ 18 ชั่วโมง ก่อนการวิเคราะห์)

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปต ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร (กรณีเพิ่มขนาดของตัวอย่าง อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่างต่อปริมาตรของสารละลายสำหรับเจือจางเท่ากับ 1:10 เช่น ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติมสารละลายสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมอาหารหรือเครื่องบดปั่น 2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

7.2.3 ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามที่ต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate: ภาคผนวก 2

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 หรืออื่น ๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ

7.3.2 เท VRBGA ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งเททับหน้าด้วย VRBGA ประมาณ 5-8 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นแข็งคว่ำจานเพาะเชื้อ

7.3.3 บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง

7.3.4 นับโคโลนีสีแดงอมม่วง ที่มีโซนขุ่นล้อมรอบ (โซนเกิดจาก precipitated bile acids) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ควรเลือกจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 15-150 โคโลนี

8. การคำนวณ (Calculation of results)

นำจำนวนที่นับได้คูณด้วย 1/d

(d = dilution = ระดับความเจือจางแรกที่ใช้นับจำนวน)

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 จำนวน Enterobacteriaceae/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2 กรณีไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะ

- ◆ ตัวอย่างเป็นของแข็งหรือของเหลวข้นหนืดที่ระดับการเจือจางแรก ให้รายงาน น้อยกว่า 10
- ◆ ตัวอย่างของเหลวที่ตัวอย่างเริ่มต้น ให้รายงาน น้อยกว่า 1 หรือไม่พบ

9.3 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ โดยเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 5, 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4

ตัวอย่าง	ค่าที่คำนวณได้	ผลวิเคราะห์ (CFU/กรัม)
1	15,500	16,000
2	15,400	15,000

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจปริมาณ (enumeration) Enterobacteriaceae ในอาหาร

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Violet red bile glucose agar (VRBGA)

Yeast extract	3	กรัม
Peptone	7	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Bile salts No.3	1.5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.002	กรัม
Agar	12	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 2 นาที pH 7.4 ± 0.2

2. Butterfield's phosphate buffered dilution water

2.1 stock solution

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

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH (NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร) ประมาณ 175 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

2.2 diluent

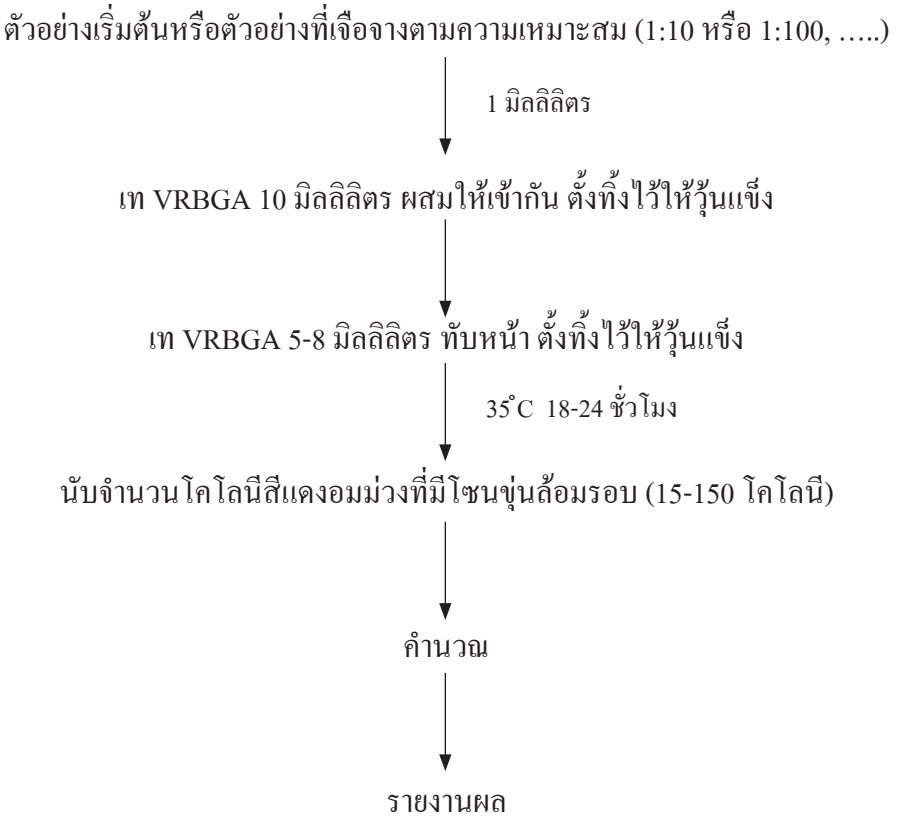
ปิเปต stock solution 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

3. 0.1% peptone water

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) Enterobacteriaceae ในอาหาร

DMSc F 2023 : วิธีตรวจวิเคราะห์ Enterococci ในอาหาร
Analytical method of Enterococci in food

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม enterococci ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association. Compendium of Methods for The Microbiological examination of foods. 5th ed. 2015. Chapter 10 "Enterococci".

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

3.1	*S. equinus*	=	*Streptococcus equinus*
3.2	*S. bovis*	=	*Streptococcus bovis*
3.3	*E. faecium*	=	*Enterococcus faecium*
3.4	*E. faecalis*	=	*Enterococcus faecalis*
3.5	*E. avium*	=	*Enterococcus avium*

4. หลักการ (Principle)

enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม หรือกลมรี อยู่เป็นคู่ บางครั้งเรียงต่อกันเป็นสายสั้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase เจริญได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45˚C ในภาวะที่มีเกลือ (NaCl) 6.5% ที่ pH 9.6 และส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10˚C enterococci เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นและเลือดเย็นรวมทั้งแมลง fecal streptococci ที่ผลิต antigen group D (ยกเว้น *S. equinus* และ *S. bovis*) จัดเป็น enterococci ปัจจุบันในวงการอุตสาหกรรมอาหารใช้ enterococci เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีสำหรับสุขลักษณะการผลิตและสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสม การตรวจนับจำนวน enterococci ในอาหาร อาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิด Kenner fecal (KF) streptococcal agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในอาหารกลุ่มอื่นที่มิใช่ผลิตภัณฑ์นม มีองค์ประกอบของน้ำตาลมอลโตส (maltose) และแลคโตส (lactose) ที่ enterococci

ส่วนใหญ่สามารถย่อยและเปลี่ยนเป็นกรดได้ มี sodium azide ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อ *S. equinus* และ *S. bovis* หลายสายพันธุ์ และ *Enterococcus* spp. บางสายพันธุ์ และยังมี 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ ทำให้โคโลนีมีสีชมพูถึงสีแดงเข้มขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ การใช้ Fluorogenic gentamicin-thallous-carbonate (FGTC) agar เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เหมาะในการตรวจนับ enterococci ในอาหารได้หลากหลายประเภท และอาจให้ผลจำนวนนับที่สูงกว่า KF agar อย่างน้อย 2 เท่า FGTC agar มีองค์ประกอบของสารที่ไม่ใช่ azide ในการยับยั้งเชื้ออื่น การจำแนกเชื้อ enterococci เกิดจากการย่อยสลายแป้ง (dyed starch) และ fluorogenic substrate

การตรวจนับจำนวน enterococci ทำได้โดยนำตัวอย่างเริ่มต้น หรือตัวอย่างที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1:100, ...) ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C และนับจำนวนโคโลนี

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 5.1.1 Bile-esculin agar
- 5.1.2 Brain heart infusion (BHI) broth, BHI broth ที่มีเกลือ 6.5% NaCl และ BHI broth pH 9.6
- 5.1.3 Fluorogenic gentamicin-thallous-carbonate (fGTC) agar
- 5.1.4 KF streptococcus (KF streptococcal) agar
- 5.1.5 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent): Butterfield's phosphate buffered dilution water หรือ 0.1% peptone water

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 1% aqueous triphenyltetrazolium chloride (TTC)
- 5.2.2 Gram stain reagents
- 5.2.3 3% hydrogen peroxide

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

- 6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C
- 6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)
- 6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.5 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 35 ± 1°C และ 45 ± 1°C

6.1.6 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)

6.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.9 Ultraviolet (UV) lamp: 365 nm wavelength (long-wave)

6.1.10 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.11 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 45 ± 1°C และ 47 ± 2°C

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.3 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.4 แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ pore size 0.45 µm

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 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืด เขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ เช่น 50 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปต ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง ปริมาตร 9 เท่าของปริมาณตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมอาหารหรือเครื่องบดปั่น 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

7.2.3 ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 1:10 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามที่ต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plate: ภาคผนวก 2

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับการเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) ถ้าคาดว่าเชื้อมีปริมาณน้อย ให้ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 ลงในจานเพาะเชื้อ 10 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร กรณีนี้นำผลรวมของจำนวนโคโลนีบน 10 จานเพาะเชื้อรายงานเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัม

7.3.2 เท KF Streptococcal agar หรือ fGTC agar ประมาณ 12-15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ 18-24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ enterococci

- KF Streptococcal agar โคโลนีสีชมพูหรือสีแดง
- fGTC agar สังเกตการย่อยสลายแป้ง (เกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี) และการเรืองแสง (เกิดโซนเรืองแสงสีฟ้าเมื่อเปิดจานเพาะเชื้อภายใต้แสง UV) จำแนกได้ 3 กลุ่มคือ
  1. ย่อยสลายแป้งและเรืองแสง แสดงว่าเป็น *S. bovis*
  2. ไม่ย่อยสลายแป้งแต่เรืองแสง แสดงว่าเป็น *E. faecium* และ related biotypes
  3. ไม่ย่อยสลายแป้งหรือไม่เรืองแสง แสดงว่าเป็น *E. faecalis*, *E. avium*, *S. equinus* และ streptococci ตัวอื่น

7.3.3 นับจำนวนโคโลนีดังนี้

7.3.3.1 นับจำนวนโคโลนีสีชมพูและสีแดงทั้งหมดบน KF Streptococcal agar

7.3.3.2 นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบน fGTC agar ซึ่งสามารถรายงานแยกกลุ่มได้ตามการย่อยสลายแป้งและการเรืองแสง

7.4 การตรวจยืนยัน (Confirmation)

เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะ 5-10 โคโลนีไปตรวจยืนยันโดยเขี่ยเชื้อลงใน BHI broth บ่มที่ 35°C 18-24 ชั่วโมง ทดสอบต่อดังนี้

- การย้อมสีแกรม

  enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม หรือกลมรี อยู่เป็นคู่ บางครั้งเรียงต่อกันเป็นสายสั้น

- การสร้างเอนไซม์ catalase

  เติม 3% hydrogen peroxide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน BHI broth ดูการเกิดฟองก๊าซ

  ผลบวก : เกิดฟองก๊าซ

  ผลลบ : ไม่เกิดฟองก๊าซ

  enterococci ให้ผลลบ

- การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 6.5%

  เขี่ยเชื้อลงใน BHI broth ที่มีเกลือ (NaCl) 6.5% บ่มที่ 35°C 72 ชั่วโมง

  ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

  ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

  enterococci ให้ผลบวก

- การเจริญที่ 45°C

  เขี่ยเชื้อลงใน BHI broth (pre-warmed ที่อุณหภูมิ 45°C) บ่มที่ 45°C 72 ชั่วโมง

  ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

  ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

  enterococci ให้ผลบวก

- การเจริญที่ pH 9.6

  เขี่ยเชื้อลงใน BHI broth pH 9.6 บ่มที่ 35°C 72 ชั่วโมง

  ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

  ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น

  enterococci ให้ผลบวก

- การย่อย esculin

  เขี่ยเชื้อลงบน bile-esculin agar บ่มที่ 35°C 24 ชั่วโมง

  ผลบวก : มีเชื้อเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ

  ผลลบ : ไม่มีเชื้อเจริญและอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

  enterococci ให้ผลบวก

8. การคำนวณ (Calculation of results)

กรณีนับโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะและตรวจยืนยันพบว่าเป็น enterococci บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น enterococci ไปคูณจำนวนที่นับได้และคูณ 1/d (d = dilution = ระดับการเจือจางแรกที่ใช้นับจำนวน) ตัวอย่าง เช่น การตรวจโดยใช้ปริมาตรตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่ระดับ

การเจือจาง 10^{-4} จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้ 65 เมื่อสุ่ม 5 โคโลนีไปตรวจยืนยัน แล้วพบว่าเป็น enterococci 4 โคโลนี ดังนั้นสัดส่วนเท่ากับ 4/5

จำนวน Enterococci CFU/กรัม หรือมิลลิลิตร = (โคโลนีที่นับได้ × สัดส่วน) × 1/d

$= (65 \times 4/5) \times 1/10^{-4} = 520,000$

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 จำนวน Enterococci/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2 กรณีไม่พบโคโลนีลักษณะเฉพาะ

- ตัวอย่างเป็นของแข็งหรือของเหลวข้นหนืดที่ระดับการเจือจางแรก ให้รายงาน น้อยกว่า 10
- ตัวอย่างของเหลวที่ตัวอย่างเริ่มต้น ให้รายงาน น้อยกว่า 1 หรือไม่พบ

9.3 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ โดยเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 5, 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4

ตัวอย่าง	ค่าที่คำนวณได้	ผลวิเคราะห์ (CFU/กรัม)
1	15,500	16,000
2	15,400	15,000

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจปริมาณ (enumeration) Enterococci ในอาหาร

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Bile esculin agar

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 6.6 + 0.2 เอียงหลอดและปล่อยให้วุ้นแข็ง

2. Brain heart infusion (BHI) broth

Brain heart-infusion	6	กรัม
Peptic digest of animal tissue	6	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Dextrose	3	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	14.5	กรัม
di-sodium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.4 ± 0.2

3. Brain heart infusion (BHI) broth + 6.0% NaCl

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth สำเร็จรูป หรือเตรียมตามสูตรข้อ 2 โดยเติม NaCl 6.0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

4. Brain heart infusion (BHI) broth pH 9.6

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth สำเร็จรูป หรือเตรียมตามสูตรข้อ 2 ปรับ pH เป็น 9.6

5. Fluorogenic gentamicin-thallous-carbonate (fGTC) agar

5.1 base medium

Tryptic soy agar	40	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	5	กรัม
Amylose azure	3	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
Galactose	1	กรัม
Thallous acetate	0.5	กรัม
4-Methylumbelliferone-α-D-Glucuronide 100	100	มิลลิกรัม
Tween 80	0.75	มิลลิลิตร
Gentamicin sulfate	2.5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น $NaHCO_3$ และ gentamicin sulfate ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจน agar ละลาย pH 7.3 ± 0.2

5.2 Gentamicin sulfate solution

อาจเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (เก็บที่ 5°C)

5.3 $NaHCO_3$ solution

เตรียมสารละลาย 10% w/v ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน โดยต้มให้เดือด

การใช้งาน

เติม gentamicin sulfate solution 2.5 มิลลิลิตร และ $NaHCO_3$ solution 20 มิลลิลิตร ลงใน base medium 1 ลิตร ที่ทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 55°C ผสมให้เข้ากัน

6. KF streptococcus (KF streptococcal) agar

6.1 base medium

Proteose peptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม

Sodium glycerophosphate	10	กรัม
Maltose	20	กรัม
Lactose	1	กรัม
Sodium azide	0.4	กรัม
Bromocresol purple	0.015	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 10 นาที pH 7.2 ± 0.2

6.2 stock solution (1% 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride)

2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

ละลาย 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride ในน้ำกรองหรือน้ำกลั่น กรองผ่านเมมเบรน 0.45 μm เก็บในขวดปราศจากเชื้อ

การใช้งาน

หลอม base medium ทำให้เย็นที่ 45˚C และเติม stock solution 1% การใช้งาน

7. Butterfield's phosphate buffered dilution water

7.1 stock solution

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

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วย 1N NaOH (NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร) ประมาณ 175 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

7.2 diluent

ปิเปต stock solution 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

8. 0.1% peptone water

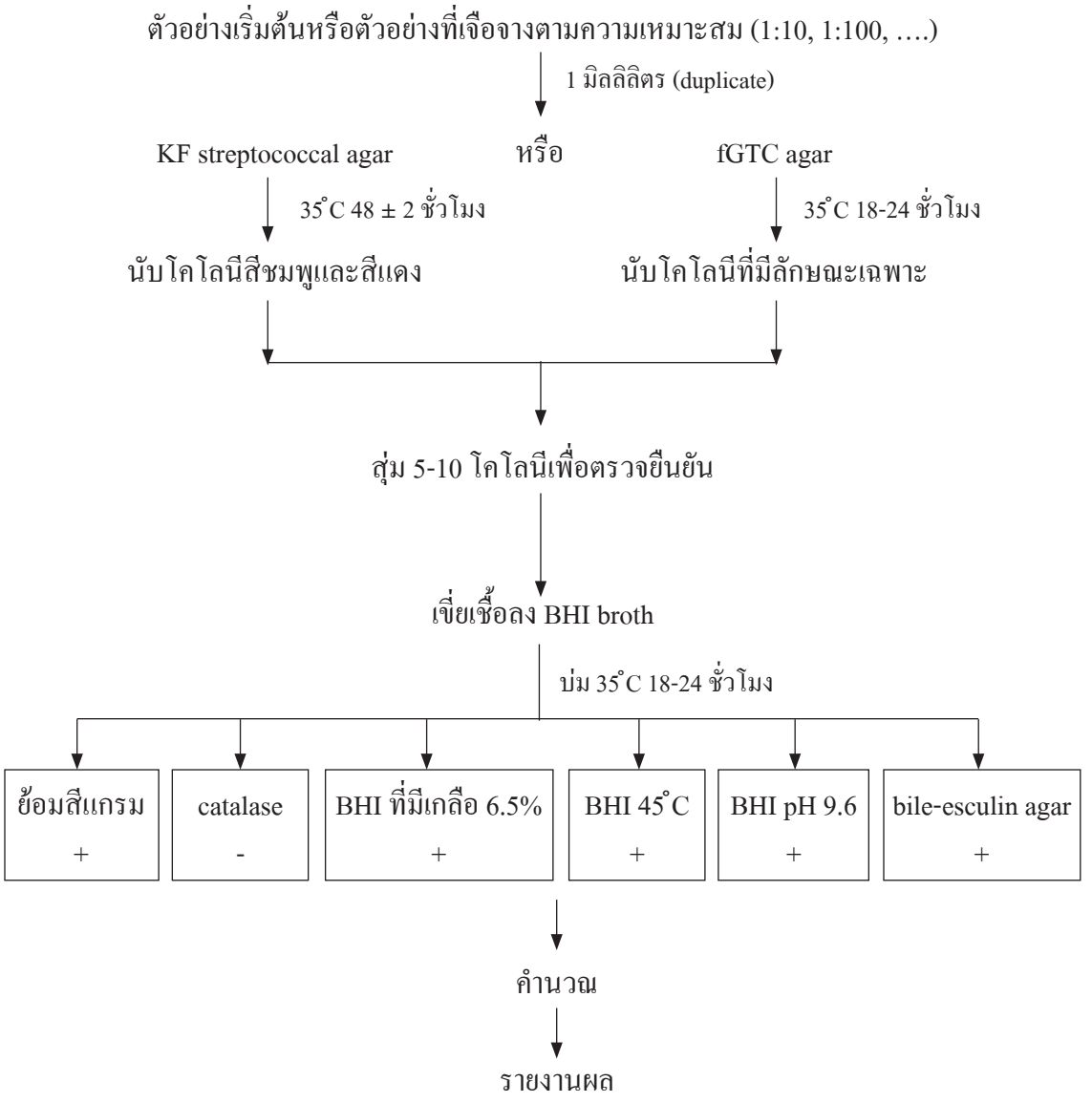
Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำ กลั่นหรือน้ำกรอง แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Gram stain reagents ใช้ชนิดสำเร็จรูป
2. 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)
   นำ 10% hydrogen peroxide ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หรือเปอร์เซ็นต์อื่นๆ โดยปรับให้เป็น 3% หรือใช้ชนิดสำเร็จรูป

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) Enterococci ในอาหาร

DMSc F 2024 : วิธีตรวจวิเคราะห์ mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 30˚C

Analytical method of mesophilic lactic acid bacteria in food-Colony-count technique at 30 °C

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร ครอบคลุมการตรวจปริมาณ (enumeration)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

ISO 15214: 1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30˚C.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

-

4. หลักการ (Principle)

การตรวจ mesophilic lactic acid bacteria ตามวิธีนี้หมายถึง จำนวนแบคทีเรียที่สามารถเจริญสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar pH 5.7 ที่อุณหภูมิ 30˚C 3 วัน แต่เชื้อ mesophilic lactic acid bacteria บางชนิดไม่สามารถเจริญหรือเจริญได้ไม่ดีบน MRS pH 5.7 สำหรับบางผลิตภัณฑ์อาหารอาจมีเชื้อ psychotrophic หรือ thermophilic lactic acid bacteria ซึ่งในการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่ต่างออกไป

การตรวจปริมาณ mesophilic lactic acid bacteria สามารถตรวจสอบด้วยวิธี conventional plate count method (pour plating) โดยนำตัวอย่างเริ่มต้น หรือที่เจือจางตามความเหมาะสม (1:10 หรือ 1: 100, ...) ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง หรืออาจใช้วิธีเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (surface plating) นำไปบ่ม และนับจำนวน

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

5.1.2 de Man, Rogosa and Sharpe with sorbic acid (MRS-S) agar

5.1.3 สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent): peptone salt solution

5.2 สารเคมี

5.2.1 Gram stain reagents

5.2.2 3% hydrogen peroxide

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3°C

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 เครื่องบดปั่น (blender) หรือเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

6.1.4 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

6.1.5 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 30 ± 1°C

6.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

6.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.8 เครื่องผสม (vortex mixer)

6.1.9 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 47 ± 2°C

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 โถปั่น (blender jar) หรือถุงตีผสมอาหาร (stomacher bag)

6.2.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.6 ปิเปต (pipette)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง ตัดตัวอย่างจากหลายๆ ตำแหน่งให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวข้นหนืด เขย่าให้ทั่ว สุ่มตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการอย่างน้อย 10 กรัม (ยกเว้นกรณีที่มีตัวอย่างไม่เพียงพอ) ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทหรือปิเปต ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่าๆ กันใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ตัวอย่างเริ่มต้น)

7.2 การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

เจือจางตัวอย่างตามลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง ดังนี้

7.2.1 กรณี 7.1.1 เทสารละลายสำหรับเจือจาง ปริมาตร 9 เท่าของปริมาณตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมอาหารหรือเครื่องบดปั่น 1-2 นาที จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

7.2.2 กรณี 7.1.2 ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร (ยกเว้นกรณีที่มีตัวอย่างไม่เพียงพอ) ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจางปริมาตร 9 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10

7.2.3 ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 1:10 ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามที่ต้องการ

7.3 การตรวจปริมาณ (enumeration) โดยวิธี pour plating: ภาคผนวก 2

หมายเหตุ 1. สามารถใช้วิธี surface plating แทนวิธี pour plating ได้ แต่ให้บ่มภายใต้สภาวะ anaerobic หรือ microaerobic โดยอาจบ่มใน candle jar
2. อาจใช้วิธีเททับหน้า (double – layer) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

7.3.1 ปิเปตตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อระดับการเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) (กรณีที่คาดว่าตัวอย่างมีเชื้อ lactic acid bacteria ปริมาณมาก อาจปิเปตตัวอย่างเฉพาะระดับการเจือจางที่จำเป็น เพื่อให้ได้จำนวนโคโลนีที่พอเหมาะในการนับ)

7.3.2 เท MRS agar ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ (กรณีตรวจตัวอย่างที่มียีสต์ปนเปื้อนปริมาณมาก เช่น ไส้กรอกชนิดแห้ง (dried sausage) ให้ใช้ MRS-S agar แทน MRS agar)

7.3.3 บ่มที่ 30°C 72 ± 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ ในระหว่างบ่ม ควรระวังไม่ให้วุ้นแห้งเกินไป เพราะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ

7.3.4 นับจำนวนโคโลนีที่ 2 ระดับการเจือจางติดกัน ที่มีเชื้อเจริญน้อยกว่า 300 โคโลนี แต่ต้องมากกว่า 15 โคโลนีอย่างน้อย 1 จานเพาะเชื้อ

หมายเหตุ 1. *Leuconostoc* spp. บางสายพันธุ์อาจสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเมือกขนาดใหญ่ ซึ่งอาจบดบังโคโลนีอื่น และทำให้จำนวน lactic acid bacteria ที่นับได้ต่ำกว่าความเป็นจริง

2. ในบางกรณีหรือบางผลิตภัณฑ์มีโอกาสพบเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ lactic acid bacteria บน MRS agar จึงอาจจำเป็นต้องตรวจยืนยันเชื้อ โดยเทคนิคง่าย ๆ เช่น ย้อมสีแกรม หรือทดสอบการสร้าง catalase กับ 3% hydrogen peroxide และถ้าทำการตรวจยืนยันควรระบุในรายงานผลการวิเคราะห์ด้วย

ผล : mesophilic lactic acid bacteria ติดสีแกรมบวก และ catalase ลบ (ไม่เกิดฟองก๊าซ)

8. การคำนวณ (Calculation of results)

8.1 กรณีที่ตรวจยืนยัน แล้วปรากฏว่าเป็น mesophilic lactic acid bacteria บางโคโลนี ให้นำสัดส่วนที่ยืนยันแล้วว่าเป็น mesophilic lactic acid bacteria คูณจำนวนที่นับได้ เช่น จากจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบน 1 จานเพาะเชื้อ นับได้ 100 โคโลนี สุ่มยืนยัน 5 โคโลนี ปรากฏว่าเป็น mesophilic lactic acid bacteria 4 โคโลนี ดังนั้นจำนวน mesophilic lactic acid bacteria คือ (4/5) × 100 เท่ากับ 80 โคโลนี และคำนวณเช่นนี้ทุกจานเพาะเชื้อที่เลือกนับแล้วนำผลที่ได้มาคำนวณตามสูตร

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

N = จำนวน mesophilic lactic acid bacteria ต่อ กรัมหรือมิลลิลิตร

$\sum^{c}$ = ผลรวมของจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ตรวจยืนยันแล้วที่คำนวณได้จากทุกจานเพาะเชื้อของ 2 ระดับที่เลือก

V = ปริมาตรของ inoculum ที่ใส่ในแต่ละจานเพาะเชื้อ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

n_1 = จำนวนของจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางแรกที่เลือก

n_2 = จำนวนของจานเพาะเชื้อที่นำมานับโคโลนี ที่ระดับการเจือจางที่ 2 ที่เลือก

d = ระดับการเจือจางแรกที่เลือก

ตัวอย่าง :

ที่ระดับการเจือจาง 10^{-2} จำนวนเชื้อที่ตรวจยืนยันแล้ว 168, 215 โคโลนี

ที่ระดับการเจือจาง 10^{-3} จำนวนเชื้อที่ตรวจยืนยันแล้ว 14, 25 โคโลนี

$$\text{จำนวน mesophilic lactic acid bacteria/กรัม} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0.1 \times 2)\ 10^{-2}}$$

$$= \frac{422}{0.022}$$

$$= 19182$$

$$= 1.9 \times 10^{4}$$

8.2 กรณีที่ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างเจือจางเริ่มต้น มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 15 โคโลนี ทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ คำนวณหาจำนวนโคโลนีเฉลี่ย และรายงานดังนี้

กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว $N_E = Y$

กรณีตัวอย่างอื่น $N_E = Y/d$

N_E = จำนวน mesophilic lactic acid bacteria/กรัมหรือมิลลิลิตร

Y = ค่าเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ จาก 2 จานเพาะเชื้อ

d = ระดับการเจือจางของตัวอย่างเจือจางเริ่มต้น

ตัวอย่าง :

ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} มีจำนวนโคโลนี 4, 4 โคโลนี

$$\text{จำนวน mesophilic lactic acid bacteria/กรัม} = \frac{4}{10^{-1}}$$

$$= 40$$

8.3 กรณีที่ตัวอย่างเริ่มต้นหรือตัวอย่างเจือจางเริ่มต้น ไม่มีเชื้อเจริญ ทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ ให้รายงานดังนี้

กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว จำนวน mesophilic lactic acid bacteria/มิลลิลิตร น้อยกว่า 1

กรณีตัวอย่างอื่น จำนวน mesophilic lactic acid bacteria/กรัม น้อยกว่า 1/d

d = ระดับความเจือจางของตัวอย่างเจือจางเริ่มต้น

9. การรายงานผล (Expression of results)

9.1 จำนวน mesophilic lactic acid bacteria/น้ำหนัก หรือปริมาตร (เช่น กรัม หรือมิลลิลิตร)

9.2 รายงานผลเป็นตัวเลขนัยสำคัญสองตำแหน่ง ตัวเลขตั้งแต่ตำแหน่งที่สามขึ้นไปให้ปรับเป็นเลขศูนย์ โดยเพิ่มตัวเลขตำแหน่งที่สองขึ้นหนึ่งอันดับเมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 5, 6, 7, 8, 9 และคงตัวเลขตำแหน่งที่สองไว้เช่นเดิม เมื่อตัวเลขตำแหน่งที่สามเป็น 1, 2, 3, 4

ตัวอย่าง	ค่าที่คำนวณได้	ผลวิเคราะห์ (CFU/กรัม)
1	15,500	16,000
2	15,400	15,000

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจปริมาณ (enumeration) mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar pH 5.7

Enzymatic digest of casein	10	กรัม
Meat extract	10	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Triammonium citrate $(NH_4)_3 C_6H_5O_7$	2	กรัม
Sodium acetate (CH_3COONa)	5	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
Manganese sulfate tetrahydrate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.05	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	20	กรัม
Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80)	1.08	กรัม
Agar	12-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 5.7 ± 0.1

หมายเหตุ สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปพร้อมใช้ (ready-to-use) แต่กรณีที่มีส่วนประกอบและ pH ต่างจากที่ระบุ อาจให้ผลการตรวจที่แตกต่างกัน

* ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

2. de Man, Rogosa and Sharpe with sorbic acid (MRS-S) agar

Sorbic acid		1.4	กรัม
1 M sodium hydroxide	ประมาณ	10	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย sorbic acid โดยละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน กรองผ่านเมมเบรน แล้วใส่ลงใน MRS agar ที่ปราศจากเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร (ตามข้อ 1.) อุณหภูมิประมาณ 47˚C pH 5.7 ± 0.1

3. Peptone salt solution

Peptone (enzymatic digest of casein)	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

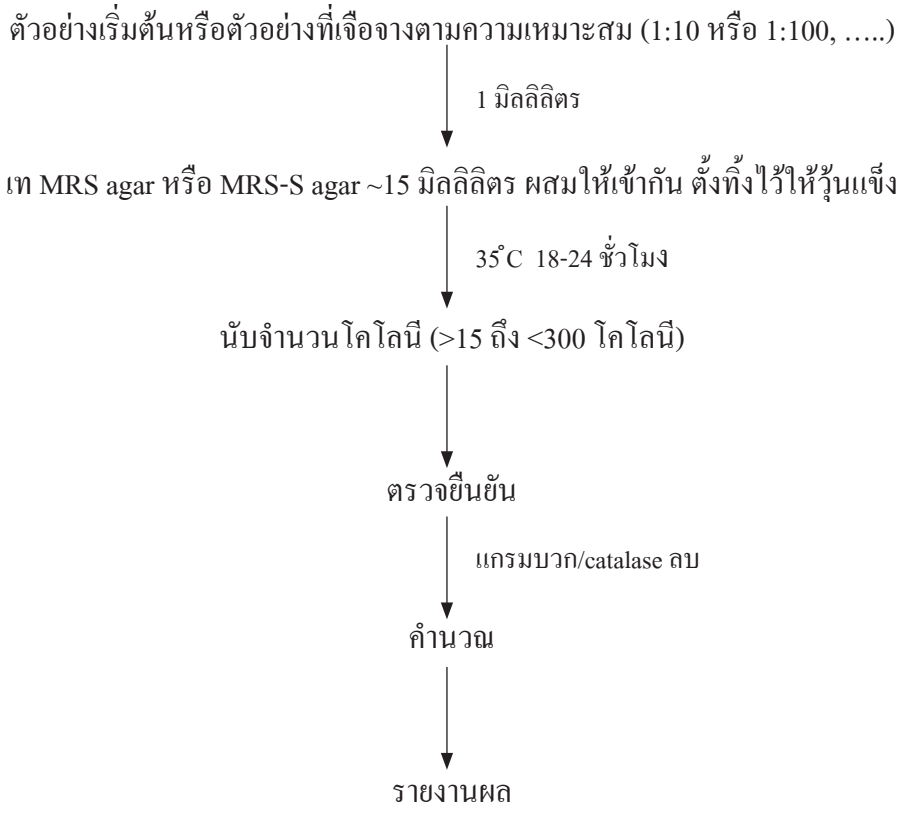
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.0 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

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

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

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจปริมาณ (enumeration) mesophilic lactic acid bacteria ในอาหาร

DMSc F 2025: วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในน้ำและน้ำแข็ง

Analytical method of *Vibrio cholerae* in water and ice

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในน้ำและน้ำแข็ง ครอบคลุมการตรวจหา (detection) *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, *Vibrio cholerae* non - O1, *Vibrio cholerae* non - O139

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

American Public Health Association (AHPA). Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 22nded. Washington DC; 2012. 9260 H, p. 9-160 – 9-166.

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Term and abbreviation)

V. cholerae = *Vibrio cholerae*

4. หลักการ (Principle)

V. cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง หรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์ oxidase สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นกรดโดยไม่สร้างก๊าซ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 0-2% เชื้อนี้มักพบได้ปริมาณน้อยและพบร่วมกับแบคทีเรียใน Vibrionaceae family หรือ family อื่น ๆ ที่มีปริมาณมาก การตรวจหา *V. cholerae* มีขั้นตอนสำคัญ 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การทำให้เชื้อเข้มข้น (Concentration) เป็นขั้นตอนที่ใช้เทคนิคการกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ที่มีรู (pore size) ขนาด 0.45 µm

4.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) เป็นขั้นตอนที่นำแผ่นกรองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารยับยั้ง (nonselective enrichment) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารยับยั้ง (selective enrichment) แล้วบ่มเพาะเชื้อเพื่อให้ *V. cholerae* ที่ได้รับบาดเจ็บ หรือเครียดฟื้นตัว และเพิ่มปริมาณ

4.3 การแยกเชื้อ (isolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง

4.4 การตรวจยืนยัน (confirmation) นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ และโคโลนีที่สงสัย ตรวจยืนยันทางชีวเคมี และน้ำเหลืองวิทยา

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

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 Alkaline peptone water

5.1.2 Alkaline peptone water-saltless

5.1.3 Alkaline peptone water-saltless ที่เติม colistin หรือ polymyxin B

5.1.4 Saline medium for detection of arginine dihydrolase (ADH), Moeller's

5.1.5 Saline medium for detection of lysine decarboxylase (LDC), Moeller's

5.1.6 Saline medium for detection of ornithine decarboxylase (ODC), Moeller's

5.1.7 Saline nutrient agar (SNA)

5.1.8 0%, 1%, 6%, 8% และ 10% saline nutrient broth

5.1.9 Sheep blood agar

5.1.10 Thiosulfate citrate bile salts (TCBS) agar

5.2 สารเคมี

5.2.1 Oxidase reagent

5.2.2 Polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum

5.2.3 Sterile mineral oil

5.2.4 *V. cholerae* Inaba antiserum

5.2.5 *V. cholerae* Ogawa antiserum

5.2.6 *V. cholerae* O139 antiserum

5.2.7 น้ำเกลือ 0.85%

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องมือ

6.1.1 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) 121 ± 3 °C

6.1.2 เครื่องชั่ง (balance)

6.1.3 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) 36 °C

6.1.4 ชุดกรองเมมเบรน (membrane filter unit)

6.1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH-meter)

6.1.6 เครื่องดูดสุญญากาศ (vaccum pump) 220 โวลต์ 50 เฮิรตซ์

6.2 อุปกรณ์

6.2.1 ขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดแก้วฝาเกลียว

6.2.2 forceps ปากแบนและผิวเรียบ

6.2.3 แผ่นกระจก (glass slide)

6.2.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop and needle)

6.2.5 แผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร, pore size 0.45 μm

6.2.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

6.2.7 ปิเปต (pipette)

6.2.8 หลอดทดลอง (test tube)

6.2.9 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 การสุ่มตัวอย่าง (Sampling)

7.1.1 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำ เขย่าตัวอย่างในแต่ละภาชนะบรรจุให้เข้ากัน เทตัวอย่างจากแต่ละภาชนะปริมาตรเท่า ๆ กัน ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อไม่น้อยกว่า 200 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ

7.1.2 กรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง เทตัวอย่างจากแต่ละหน่วยภาชนะบรรจุใส่รวมกันในภาชนะปราศจากเชื้อ ทำให้ตัวอย่างละลายจนหมด สุ่มให้ได้ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 200 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการทดสอบ

7.2 การเตรียมชุดกรอง (Preparation of membrane filter unit)

7.2.1 เตรียมชุดกรองเมมเบรน

7.2.2 ใช้ forceps ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นกรองเมมเบรนปราศจากเชื้อ 1 แผ่นมาวางบนส่วนที่เป็นฐานรองรับกระดาษ วางกรวยกรองรับน้ำครอบบนฐานรับกระดาษให้สนิท

7.3 การทำให้เชื้อเข้มข้น (Concentration)

7.3.1 เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันอย่างน้อย 25 ครั้ง เทตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร หรือปริมาตรอื่นที่ต้องการใช้ทดสอบลงในกรวยกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ แล้วปิดฝาครอบ

7.3.2 เปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมด แล้วปิดเครื่อง

7.3.3 ล้างรอบ ๆ กรวยกรองด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือน้ำกรองที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบแล้วเปิดเครื่องสุญญากาศเพื่อให้น้ำไหลผ่านจนหมดแล้วปิดเครื่อง

7.3.4 ทำซ้ำข้อ 7.3.1-7.3.3 เพื่อให้ได้แผ่นกรองเชื้อ 2 แผ่น

7.4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enrichment)

ใช้ forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกรองหนึ่งแผ่นใส่ใน alkaline peptone water-saltless และอีกหนึ่งแผ่นใส่ใน alkaline peptone water หรือ alkaline peptone water-saltless ที่เติม colistin หรือ polymyxin B บ่มที่ 36 ˚C 6-8 ชั่วโมง

7.5 ขั้นตอนการแยกเชื้อ (Isolation)

7.5.1 นำเชื้อ 1 loop จากบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดในข้อ 7.4 ขีดบน TCBS agar และ sheep blood agar

7.5.2 บ่มตามคำแนะนำของผู้ผลิต

ลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *V. cholerae*

- ◆ TCBS agar โคโลนีสีเหลือง
- ◆ sheep blood agar ส่วนใหญ่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงชัดเจน (strongly hemolytic)

7.5.3 เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะ หรือโคโลนีที่สงสัยอย่างน้อย 2-3 โคโลนี จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ขีดบน SNA plate หรือ SNA slant บ่มที่ 36 ˚C 24 ± 3 ชั่วโมง

7.6 ขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmation)

นำเชื้อจาก SNA plate หรือ SNA slant (ข้อ 7.5.3) ทดสอบดังนี้

7.6.1 การตรวจยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา

7.6.1.1 เขี่ยเชื้อที่ให้ผลการตรวจยืนยันทางชีวเคมีแล้วแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยดน้ำเกลือ 0.85% 1 หยด ใช้ loop ผสมให้เข้ากัน สังเกตการจับกันเป็นตะกอน (agglutination) ถ้ามีตะกอนแสดงว่าเป็น auto-agglutination

7.6.1.2 ถ้าไม่เกิด auto-agglutination ให้ทดสอบต่อโดยเขี่ยเชื้อแตะบนแผ่นกระจกที่สะอาด หยด polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum 1 หยด ผสมให้เข้ากัน เอียงแผ่นกระจกไปมา 30-60 วินาที สังเกตการจับกันเป็นตะกอน และทำเช่นเดียว กับ *V. cholerae* O139 antiserum ถ้ามีการจับกันเป็นตะกอนแสดงว่าให้ผลบวก

กรณีการทดสอบ polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum ให้ผลบวก อาจทดสอบเชื้อกับ *V. cholerae* Inaba antiserum และ *V. cholerae* Ogawa antiserum

7.6.2 การตรวจยืนยันทางชีวเคมี

จำแนกชนิด *V. cholerae* จากกลุ่ม *Vibrio* species โดยทดสอบรายการที่สำคัญ (key differential tests) หรือตามรายการทั้งหมดในตารางที่ 1

7.6.2.1 รายการที่สำคัญ (key differential tests) ในการจำแนก *Vibrio* species

- การทดสอบ halotolerance

  เตรียม suspension ของเชื้อ และใส่ 1 loop ลงใน saline nutrient broth ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0% และ 1% บ่มที่ 36 ˚C 48 ชั่วโมง

  ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (มีการเจริญของเชื้อ)

  ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญของเชื้อ)

  V. cholerae ให้ผลบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ที่ 0% และ 1%

- Oxidase test

  นำเชื้อขีดบนกระดาษกรองที่หยด oxidase reagent (ไม่ใช้ห่วงนิกเกิล -โครเมียม หรือลวดโลหะ)

  ผลบวก : กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน ม่วง หรือม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

  ผลลบ : กระดาษกรองไม่เปลี่ยนสี

  V. cholerae ให้ผลบวก

- Nitrate (reduction test)

  ปฏิบัติตามวิธีของห้องปฏิบัติการ

  V. cholerae ให้ผลบวก

- Inositol (myo-) fermentation

  ปฏิบัติตามวิธีของห้องปฏิบัติการ

  V. cholerae ให้ผลลบ

- การตรวจหา arginine dihydrolase

  เขี่ยเชื้อลงบริเวณใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ADH แล้วทับหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 36 ˚C 48 ชั่วโมง

  ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง

  ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

  V. cholerae ให้ผลลบ

- การตรวจหา lysine decarboxylase

  เขี่ยเชื้อลงบริเวณใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ LDC แล้วทับหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 36 ˚C 48 ชั่วโมง

  ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง

  ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

  V. cholerae ให้ผลบวก

◆ การตรวจหา ornithine decarboxylase
เขี่ยเชื้อลงบริเวณใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ODC แล้วทับหน้าด้วย sterile mineral oil ประมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 36˚C 48 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นสีม่วง
ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง

V. cholerae ให้ผลบวก

7.6.2.2 รายการทดสอบเพิ่มเติม (additional differential tests) ตามตารางที่ 1 ให้ทดสอบตามวิธีของห้องปฏิบัติการ และตามสภาวะที่ระบุไว้ท้ายตารางที่ 1

7.7 การแปลผล

7.7.1 โคโลนีที่ตรวจยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยาแล้วให้ผลบวกชัดเจนถือว่าเป็น presumptive positive ให้ตรวจยืนยันผลทางชีวเคมี

7.7.2 โคโลนีที่เกิด auto-agglutination หรือโคโลนีที่ให้ผลทางชีวเคมี และ/หรือทางน้ำเหลืองวิทยาไม่ชัดเจน ให้ส่งตรวจยืนยันที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หรือสถาบันอื่นที่เชื่อถือได้

ตารางที่ 1 ผลทดสอบทางชีวเคมี และคุณลักษณะอื่น ๆ ของ *Vibrio* species 12 ชนิด

	Percentage Positive for:†											
Test*	*V. cholerae*	*V. mimicus*	*V. metschnikovii*	*V. cincinnatiensis*	*V. hollisae*	*V. damsela*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. alginolyticus*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*-biogroup[1]	*V. harveyi*
Eight key differential tests:												
Growth in nutrient broth with 0% NaCl*	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Growth in nutrient broth with 1% NaCl*	100	100	100	100	99	100	99	99	99	100	99	100
Oxidase production*	100	100	0	100	100	95	100	100	100	100	100	100
Nitrate reduced to nitrite*	99	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Inositol (myo-) fermentation*	0	0	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Arginine, Moeller's, (1% NaCl)*	0	0	60	0	0	95	93	100	0	0	0	0
Lysine, Moeller's, (1% NaCl)*	99	100	35	57	0	50	0	0	99	100	99	100
Ornithine, Moeller's, (1% NaCl)*	99	99	0	0	0	0	0	0	50	95	55	0
Additional differential tests:												
Indole production (HIB, 1% NaCl)	99	98	20	8	97	0	13	11	85	98	97	100
Methyl red (1% NaCl)	99	99	96	93	0	100	96	100	75	80	80	100
Voges-Proskauer (1% NaCl; Barritt*)*	75	9	96	0	0	95	0	0	95	0	0	50
Citrate, Simmons	97	99	75	21	0	0	93	100	1	3	75	0
H_2S on TSI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Urea hydrolysis	0	1	0	0	0	0	0	0	0	15	1	0
Phenylalanine deaminase	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	35	NG
Motility, (36°C)	99	98	74	86	0	25	70	89	99	99	99	0
Gelatin hydrolysis, (1% NaCl, 22°C)	90	65	65	0	0	6	85	86	90	95	75	0
KCN test (percentage that grow)	10	2	0	0	0	5	65	89	15	20	1	0
Malonate utilization	1	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0
D-Glucose, acid production	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50
D-Glucose, gas production	0	0	0	0	0	10	0	100	0	0	0	0
Acid production from:												
D-Adonito[1]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
L-Arabinose*	0	1	0	100	97	0	93	100	1	80	0	0
D-Arabitol*	0	0	0	0	0	0	65	89	0	0	0	0
Cellobiose*	8	0	9	100	0	0	30	11	3	5	99	50
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Erythritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Galactose	90	82	45	100	100	90	96	100	20	92	96	0
Glycero[1]	30	13	100	100	0	0	7	55	80	50	1	0
Lactose*	7	21	50	0	0	0	3	0	0	1	85	0
Maltose*	99	99	100	100	0	100	100	100	100	99	100	100
D-Mannitol*	99	99	96	100	0	0	97	100	100	100	45	50
D-Mannose	78	99	100	100	100	100	100	100	99	100	98	50
Melibiose	1	0	0	7	0	0	3	11	1	1	0	0
α-Methyl-d-glucoside	0	0	25	57	0	5	0	0	1	0	0	0
Raffinose	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0
L-Rhamnose	0	0	0	0	0	0	0	45	0	1	0	0
Salicin*	1	0	9	100	0	0	0	0	4	1	95	0
D-Sorbitol	1	0	45	0	0	0	3	0	1	1	0	0
Sucrose*	100	0	100	100	0	5	100	100	99	1	15	50
Trehalose	99	94	100	100	0	86	100	100	100	99	100	50

ตารางที่ 1 ผลทดสอบทางชีวเคมี และคุณลักษณะอื่น ๆ ของ Vibrio species 12 ชนิด (ต่อ)

	Percentage Positive for:†											
Test*	*V. cholerae*	*V. mimicus*	*V. metschnikovii*	*V. cincinnatiensis*	*V. hollisae*	*V. damsela*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. alginolyticus*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*-biogroup[1]	*V. harveyi*
D-Xylose	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0	0	0
Mucate-acid production	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tartrate-Jordan	75	12	35	0	65	0	35	22	95	93	84	50
Esculin hydrolysis	0	0	60	0	0	0	8	0	3	1	40	0
Acetate utilization	92	78	25	14	0	0	70	65	0	1	7	0
DNase (25°C)	93	55	50	79	0	75	100	100	95	92	50	100
Lipase*	92	17	100	36	0	0	90	89	85	90	92	0
ONPG Test*	94	90	50	86	0	0	40	35	0	5	75	0
Yellow pigment (25°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyrosine clearing	13	30	5	0	3	0	65	45	70	77	75	0
Growth in nutrient broth with:												
6% NaCl*	53	49	78	100	83	95	96	100	100	99	65	100
8% NaCl*	1	0	44	62	0	0	71	78	94	80	0	0
10% NaCl*	0	0	4	0	0	0	4	0	69	2	0	0
12% NaCl*	0	0	0	0	0	0	0	0	17	1	0	0
Swarming (marine agar, 25°C)	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	100
String test*	100	100	100	80	100	80	100	100	91	64	100	100
O129, zone of inhibition‡	99	95	90	25	40	90	31	0	19	20	98	100
Polymyxin B, % with any zone of inhibition	22	88	100	92	100	85	100	89	63	54	3	100

* Test is recommended as part of the routine set for *Vibrio* identification. 1% NaCl in parentheses indicates 1% NaCl has been added to the standard media to enhance growth; HIB, heart infusion broth; the Barritt reagent for the Voges-Proskauer test contains α-naphthol for greater sensitivity; TSI, triple sugar iron agar; ONPG, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside; the positive string test indicates cell lysis in the presence of a 0.5% sodium desoxycholate solution.
† The number gives the percentage positive after 48 h of incubation at 36°C (Unless other conditions are specified). Most of the positive reactions occur during the first 24 hours. NG (no growth) means that the organism does not grow, probably because the NaCl concentration is too low.
‡ Disk content = 150 μg.

8. การคำนวณ (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

V. cholerae /100 มิลลิลิตร หรือต่อปริมาตรที่ทดสอบ พบ หรือไม่พบ

10. รายละเอียดอื่น

10.1 ภาคผนวก 1 : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

10.2 ภาคผนวก 2 : แผนภูมิการตรวจหา (detection) *V. cholerae* ในน้ำและน้ำแข็ง

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

(Culture media and reagents)

อาหารเลี้ยงเชื้อ กรณีใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Alkaline peptone water

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH, 1N)	~6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	~994	มิลลิลิตร

ละลาย peptone และ NaCl ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง และเติม 1N NaOH จนได้ pH 8.4 ประมาณ 6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121 ˚C 15 นาที

2. Alkaline peptone water-saltless

Peptone	10	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH, 1N)	~6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	~994	มิลลิลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง และเติม 1N NaOH จนได้ pH 8.4 ประมาณ 6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที

3. Alkaline peptone water-saltless เติม colistin หรือ polymyxin B
ให้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต

4. Saline medium for detection of arginine dihydrolase (ADH), Moeller's

Arginine monohydrochloride	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Dextrose	0.5	กรัม
Bromocresol purple	0.01	กรัม

Cresol red	5	มิลลิกรัม
Pyridoxal	5	มิลลิกรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 ˚C 15 นาที pH 6.0 ± 0.2

5. Saline medium for detection of lysine decarboxylase (LDC), Moeller's

L-Lysine monohydrochloride	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Dextrose	0.5	กรัม
Bromocresol purple	0.01	กรัม
Cresol red	5	มิลลิกรัม
Pyridoxal	5	มิลลิกรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 ˚C 15 นาที pH 6.0 ± 0.2

6. Saline medium for detection of ornithine decarboxylase (ODC), Moeller's

l-Ornithine monohydrochloride	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Dextrose	0.5	กรัม
Bromocresol purple	0.01	กรัม
Cresol red	5	มิลลิกรัม
Pyridoxal	5	มิลลิกรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด 2-5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 ˚C 15 นาที pH 6.0 ± 0.2

7. Saline nutrient agar (SNA)

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวด หรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2 เอียงหลอดและปล่อยให้วุ้นแข็ง

8. Saline nutrient broth (0%, 1%, 6%, 8%, 10% และ 12%)

Meat extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	0, 10, 60, 80, 100 หรือ 120	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดตามปริมาตรที่ต้องการ ฆ่าเชื้อที่ 121˚C 15 นาที pH 7.2 ± 0.2

9. Sheep blood agar

9.1 Base medium

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

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

9.2 Defibrinated sheep blood

การใช้งาน

เติม defibrinated sheep blood (ข้อ 9.2) 5-7 มิลลิลิตร ลงใน base medium (ข้อ 9.1)

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

10. Thiosulfate citrate bile salts (TCBS) agar

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	10	กรัม
Iron (III) citrate	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	10	กรัม
Dried bovine bile	8	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	8-18*	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจนวุ้นละลาย pH 8.6 ± 0.2

สารเคมี กรณีใช้สารเคมีสำเร็จรูป เตรียมตามสูตรและวิธีที่ผู้ผลิตระบุ

1. Oxidase reagent

N, N, N, N - tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2.2HCl$)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำเย็น ก่อนใช้งาน

2. Sterile mineral oil ใช้ชนิดสำเร็จรูป

3. *V. cholerae* anti-sera ใช้ชนิดสำเร็จรูป

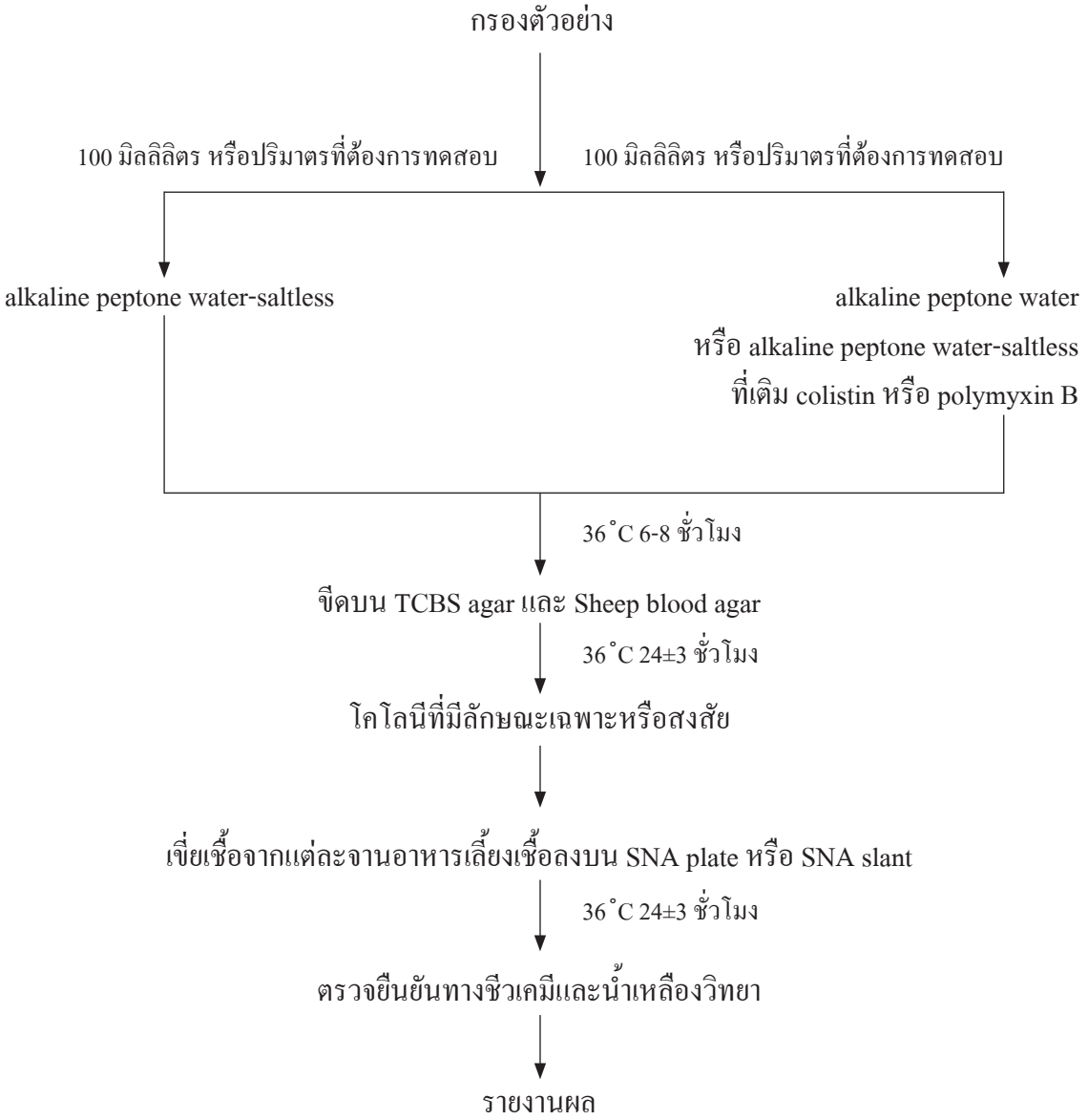
4. น้ำเกลือ 0.85%

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

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

*ขึ้นกับความแข็งของวุ้น (gel strength of the agar)

ภาคผนวก 2



แผนภูมิ การตรวจหา (detection) *V. cholerae* ในน้ำและน้ำแข็ง

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

1. นายทนงพันธ์ สัจจปาละ	ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์)
2. นางสาวขันทอง เพ็ชรนอก	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
3. นายก่อเกียรติ ศาสตรินทร์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 3003	เมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืช	สิ่งแปลกปลอม	1	177

DMSc F 3003: การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (ภายนอก) ในเมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืช

Determination of light filth (external) in grains and seeds

1. ขอบข่าย (Scope)

วิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (light filth) ที่อยู่ภายนอกเมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืช

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

2.1 AOAC Official Method 950.86: Light Filth (External) in Grains and Seeds

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

2.3 AOAC Official Method 970.66: Light and Heavy Filth

2.4 AOAC Official Method 941.16: Filth in Grain Products and Brewer's Grits

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terms and abbreviation)

สิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (light filth) หมายถึง สิ่งแปลกปลอมที่น่ารังเกียจ ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมีลักษณะเป็นชิ้นเล็ก ๆ (particles) ลอยในชั้นน้ำมัน แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยใช้ส่วนผสมที่เป็นของเหลวที่มีชั้นน้ำมัน ตัวอย่าง light filth เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนของแมลง ขนสัตว์ฟันแทะ เส้นขนของคน ขนนก (feather barbules)

4. หลักการ (Principle)

แยกสิ่งแปลกปลอมชนิดเบา (จำพวกชิ้นส่วนแมลง ตัวแมลง และขนสัตว์เป็นต้น) ออกจากอาหารโดยใช้ หลักการที่สิ่งแปลกปลอมชนิดเบาจะลอยขึ้นมาอยู่ในชั้นของ heptane ซึ่งสามารถแยกออกโดยใช้ Wildman trap flask นำไปกรองแล้วไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and reagents)

5.1 40% ethanol: ผสม ethanol กับ H_2O ในอัตราส่วน 40:60

5.2 heptane: commercial n-heptane ซึ่งมี toluene น้อยกว่าร้อยละ 8

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 เครื่องชั่ง (balance) ที่มีความละเอียด 0.01 กรัม

6.2 Widefield stereoscopic microscope

6.3 Compound microscope

6.4 Magnetic stirring bar and stirrer-hot plate เป็นแท่งแม่เหล็กที่เคลือบด้วย teflon ขนาดยาวโดยประมาณ 47 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9 มิลลิเมตร ใช้กับ hot plate ที่สามารถปรับระดับความร้อนและความเร็วได้อย่างต่อเนื่อง

6.5 ชุดเครื่องกรอง ประกอบด้วย filtering flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร Hirsch funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร และเครื่องปั๊มสุญญากาศ

6.6 Trap flask-Wildman ประกอบด้วย erlenmeyer flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และ stirring rod ซึ่งเป็นแท่งโลหะเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มีความยาวมากกว่าความสูงของ flask ประมาณ 10 เซนติเมตร ส่วนปลายของแท่งโลหะมีแผ่นยางรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ติดอยู่

6.7 อ่างน้ำเย็น (cooling bath)

6.8 Beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร

6.9 Cylinder ขนาด 100 มิลลิลิตร

6.10 Forceps

6.11 Petri dish เส้นผ่านศูนย์กลาง 100 เซนติเมตร

6.12 กระดาษกรอง Whatman 8 Liniert/Ruled เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร

6.13 เข็มเขี่ย (needle)

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7.1 ชั่งตัวอย่างเมล็ดธัญพืชหรือเมล็ดพืช 225 กรัม ลงใน trap flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

7.2 เติม 40% ethanol ลงไปให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร โดยผ่านผิวด้านในของ trap flask

7.3 นำไปต้มบน hot plate ให้เดือดเบา ๆ นาน 5 นาที พร้อมกวนตัวอย่างบ่อย ๆ โดยใช้ magnetic stirrer

7.4 หลังจากนั้นนำ trap flask ไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น ให้อุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง

7.5 เติม 40% ethanol ลงไปให้ได้ปริมาตร 900 มิลลิลิตร โดยผ่านผิวด้านในของ trap flask

7.6 เติม n-heptane ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผ่าน stirring rod กวนตัวอย่างโดยใช้ magnetic stirrer จน n-heptane แตกตัวเป็นเม็ดนาน 1 นาที เพื่อจับสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง

7.7 เติม 40% ethanol ให้ชั้น n-heptane อยู่ในช่วงคอ trap flask ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที โดย 20 นาทีแรกให้กวนทุก ๆ 3-6 นาที ส่วน 10 นาทีหลังให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ชั้น n-heptane แยกตัว

7.8 หมุน stirring rod เพื่อให้ เศษตัวอย่างและสิ่งแปลกปลอมที่อาจติดอยู่กับแผ่นยางหลุดออก ดึงปลาย stirring rod โดยให้ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งที่เป็นแผ่นยางปิดคอ flask ให้แน่น และให้ชั้นของ 40% ethanol ที่อยู่ด้านล่างชั้น n-heptane มีความสูง 1 เซนติเมตรเหนือแผ่นยาง เทชั้น n-heptane ลงใน beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้ 40 % ethanol ล้าง stirring rod และคอ flask โดยรวมน้ำล้างลงใน beaker

7.9 กรองของเหลวใน beaker และ 40% ethanol ที่ใช้ล้าง beaker ลงบนกระดาษกรอง โดยใช้ชุดเครื่องกรอง

7.10 คีบกระดาษกรองมาวางบน petri dish

7.11 เติม n-heptane 30 มิลลิลิตร ผ่าน stirring rod ลงใน trap flask แล้วกวนอย่างแรง โดยใช้ magnetic stirrer

7.12 ดำเนินการตามข้อ 7.7 ถึงข้อ 7.10

7.13 นำกระดาษกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอม ภายใต้กล้อง widefield stereoscopic microscope โดยเริ่มที่กำลังขยาย 30 เท่า ขณะที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ให้ใช้เข็มเขี่ยเศษอาหารที่อาจบดบังสิ่งแปลกปลอม เมื่อพบวัตถุสงสัยให้ใช้กำลังขยายสูงขึ้นที่ 60-75 เท่าขึ้นไป ซึ่งจะทำให้เห็นรายละเอียดได้มากขึ้น หากยังสงสัยอีกว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมหรือไม่ ให้นำสิ่งแปลกปลอมมา mount บนสไลด์ และตรวจภายใต้ compound microscope

8. การคำนวณ (Calculation of results)

-

9. การรายงานผล (Expression of results)

รายงานสิ่งแปลกปลอมที่พบ โดยจัดแบ่งชนิดของสิ่งแปลกปลอมที่พบเป็นกลุ่ม ๆ เช่น แมลงทั้งตัว ชิ้นส่วนแมลง ขน เป็นต้น ให้ระบุจำนวน ขนาดและรายละเอียดอื่น ๆ ให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมที่พบมีจำนวนมากและไม่สามารถนับจำนวนที่แท้จริงได้ ให้รายงานจำนวนโดยประมาณหรือจำนวนขั้นต่ำที่สามารถตรวจสอบได้ และให้ใส่เครื่องหมายมากกว่า

10. รายละเอียดอื่น

-

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล สำหรับการวิเคราะห์อาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะผู้จัดทำ

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

วิธีมาตรฐานทางกายภาพสำหรับการวิเคราะห์อาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รหัสวิธี	ชนิดอาหาร	รายการ	Method Type	หน้า
DMSc F 4010	อาหารที่มีส่วนประกอบของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด GTS 40-3-2	Construct-specific method for detection of DNA sequences from genetically modified GTS 40-3-2 (Roundup Ready® soya beans) by means of Polymerase Chain Reaction	-	183
DMSc F 4011	ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11	Construct-specific method for detection of DNA sequences from GM Bt11 maize by means of Polymerase Chain Reaction	-	189
DMSc F 4012	อาหารที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Event176 maize (Bt176)	Construct-specific method for detection of DNA sequences from genetically modified Event 176 maize (Bt176) by means of Polymerase Chain Reaction	-	195
DMSc F 4013	ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด T25	Construct-specific method for detection of DNA sequences from GM T25 maize by means of Polymerase Chain Reaction	-	201
DMSc F 4014	ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON810	Event-specific method for detection of DNA sequences from GM MON810 maize by means of Polymerase Chain Reaction		207

DMSc F 4010: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from Genetically modified GTS 40-3-2 (Roundup Ready® soya beans) by means of Polymerase Chain Reaction

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS 40-3-2 (Roundup Ready® 17) ที่ดัดแปรเพื่อให้ทนต่อ glyphosate วิธีนี้สามารถตรวจสอบในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ที่ผ่านขั้นตอนการผลิต

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

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

2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods

2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W,: *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

PCR: Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR-product สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอและสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตเทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR product ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบลำดับเบสที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่าง CaMV 35S promoter และ *Petunia hybrida* chloroplast targeting signal preceding the *Agrobacterium* EPSPS

4.5 โครงสร้างของยีน (construct ของ CaMV 35S promoter ต่อกับ *Agrobacterium* EPSPS) ในข้อ 4.4 นี้ อาจมีการนำไปใช้ในพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นในอนาคต

4.6 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเหลือง GTS 40-3-2 และถั่วเหลืองที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง GTS 40-3-2 และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยว ๆ หรือตรวจที่ต้นถั่วเหลืองโดยตรง

4.7 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์นี้ไม่ตรงกับถั่วเหลืองที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมและพืชอื่น ๆ (ข้อมูลจาก GenBank® ที่สืบค้นด้วย BlastN® 2.2.1 เมื่อ 1 กรกฎาคม 2001) นอกจากนี้ยังเป็น primer ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการดัดแปรขึ้นมา ไม่ได้เกิดตามธรรมชาติ

4.8 ไม่พบการเพิ่มปริมาณของ primer นี้เมื่อตรวจสอบกับถั่วเหลืองที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม มันฝรั่ง มะเขือเทศ ข้าวโพด และ sugar beets หรือกับข้าวโพด Event176 (Bt176), Bt11, T25 และ MON810

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, PCR grade

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

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 2.5 mM (รวมเป็น 10 mM)

5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 µM ให้ขนาด PCR product 172 bp

5.5.1 Forward primer: ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No. V00141, J02048

35s-f2: 5'- TgA TgT gAT ATC TCC ACT gAC g -3'

5.5.2 Reverse primer: ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No. M21084, J03227

petu-r1: 5'- TgT ATC CCT TgA gCC ATg TTg T -3'.

5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 IU/µl

5.7 Hybridization probe

H-35s-ar1: 5'- ggg TCT TgC gAA ggA TAg Tg-3'.

5.8 Prehybridization solution, ประกอบด้วย 5 x SSC, 0,1% (mass concentration) N-lauroyl-sarcosine, 0.02% (mass concentration) ของ SOS, และ 1% Blocking Reagent

5.9 Hybridization solution, ประกอบด้วย 10 pmol of hybridization probe in 2.5 ml ใน prehybridization solution (5.8). อุณหภูมิที่ใช้สำหรับไฮบริไดเซชัน 50˚C สามารถดูข้อมูลอื่น ๆ เกี่ยวกับสภาวะเพิ่มเติมของการทำ hybridization ได้ในเอกสารอ้างอิง (3)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 Thermal cycler

6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply ขนาด 5V/cm

6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.

6.4 เครื่องบันทึกภาพ เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ RR_1

ตาราง *RR_1*

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Sample DNA	10 ng to 50 ng	1
Water		15.9
10 x PCR buffer (without $MgCl_2$)	1 x	2.5
$MgCl_2$-solution[a], 25 mmol/l	1.5 mmol/l	1.5
dNTP solution , 10 mmol/l	0.8 mmol/l	2
Primer 35s-f2, 5 µmol/l	0.2 µmol/l	1
Primer petu-r1, 5 µmol/l	0.2 µmol/l	1
Taq DNA polymerase, 5 IU/µl	0.5 IU	0.1
[a] ถ้า PCR buffer มีส่วนผสมของ $MgCl_2$ ให้ปรับค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ให้เท่ากับ 1.5 mmol/l		

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM GTS 40-3-2 (Roundup Ready soybean)

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง RR_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง *RR_2*

Step	Time/temp
Activation/Initial denature	10 min/95°C
Amplification	30 s/95°C
	30 s/60°C
	25 s/72°C
Number of cycles	35 to 40
Final extension	3 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR product

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr (ตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2558)

7.5 การยืนยันผล

ตรวจสอบด้วยวิธี Southern hybridization โดยใช้ H-35s-ar1 (5.7) โดยตัวอย่างที่ให้ผลลบกับการทดสอบนี้ แสดงว่าไม่ใช่ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด GTS 40-3-2

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR-product เท่ากับ positive controls คือ 172 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9

8.2 การสรุปผล :

8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.3 การรายงาน

8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด GTS 40-3-2 (Roundup ready soybean)
พบ/detected

8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิด GTS 40-3-2 (Roundup ready soybean)
ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

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

10. รายละเอียดอื่น

-

DMSc F 4011: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Bt11 maize by means of Polymerase Chain Reaction

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11 (ของบริษัท Syngenta เดิมคือ Novatis) ที่ดัดแปรเพื่อให้สร้างสารพิษจาก *Bacillus thuringiensis* เพื่อต้านทานหนอนเจาะฝักข้าวโพด ในวัตถุดิบโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

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

2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods

2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W,: *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

PCR: Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

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

4.4 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบชุดยีนที่มีลำดับเบสบริเวณที่เชื่อมต่อกันระหว่างยีน *adh* ตำแหน่ง 1S-Intron2 (IVS2) ที่มีในข้าวโพดตามธรรมชาติและ *pat* gene จาก *Streptpmyces viridochromogenes* ที่มีการใส่เข้าในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งเฉพาะที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11

4.5 โครงสร้างของยีนดังกล่าวในข้อ 4.4 นี้ อาจมีการนำไปใช้ในพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นในอนาคต

4.6 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด Bt11 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง Bt11 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น ๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยว ๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, PCR grade

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

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 2.5 mM (รวมเป็น 10 mM)

5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 µM ให้ PCR-product ขนาด 189 bp

5.5.1 Forward primer: *adh* 1S-intron2 (IVS2) ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No. AR110602

Intron IVS2-2: 5'-CTg ggA ggC CAA ggT ATC TAA T-3'.

5.5.2 Reverse primer: PAT protein coding region ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No. AR110602

PAT-B: 5'-gCT gCT gTA gCT ggC CTA ATC T-3'

5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 IU/µl

5.7 Hybridization probe, 5'-labelled (e.g. digoxygenine-labelled) probe Bt ความเข้มข้น 20 µmol/l: 5'-TAT CTg TCT CAg ggg CAg ACT C-3'

5.8 Prehybridization solution, ประกอบด้วย 5 x SSC, 0,1% (mass concentration) N-lauroyl-sarcosine, 0,02% (mass concentration) ของ SOS, และ 1% Blocking Reagent

5.9 Hybridization solution, ประกอบด้วย 10 pmol of hybridization probe in 2.5 ml ใน prehybridization solution (5.7). อุณหภูมิที่ใช้สำหรับไฮบริไดเซชัน 50˚C สามารถดูข้อมูลอื่น ๆ เกี่ยวกับสภาวะเพิ่มเติมของการทำ hybridization ได้ในเอกสารอ้างอิง (3)

5.10 เอนไซม์ตัดจำเพาะ : *Hin*f I

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 Thermal cycler

6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply ขนาด 5V/cm

6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.

6.4 เครื่องบันทึกภาพ เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ Bt11_1

ตาราง *Bt11_1*

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Sample DNA	10 ng to 50 ng	1
Water		15.8
10 x PCR buffer (without $MgCl_2$)	1 x	2.5
$MgCl_2$-solution[a], 25 mmol/l	2 mmol/l	2.0
dNTP solution , 10 mmol/l	0.4 mmol/l	1.0
Primer IVS2-2, 10 µmol/l	0.5 µmol/l	1.25
Primer PAT-B, 10 µmol/l	0.5 µmol/l	1.25
Taq DNA polymerase, 5 IU/µl	1 IU	0.2
[a] ถ้า PCR buffer มีส่วนผสมของ $MgCl_2$ ให้ปรับค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ให้เท่ากับ 2 mmol/l		

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM Bt11 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง Bt11_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง *Bt11_2*

Step	Time/temp
Activation/Initial denature	12 min/95°C
Amplification	30 s/95°C
	30 s/64°C
	30 s/72°C
Number of cycles	38
Final extension	10 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR product

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr (ตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหารเล่มที่ 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2558)

7.5 การยืนยันผล

ตรวจสอบด้วยวิธี Southern hybridization โดยใช้ digoxygenine-labelled oligonucleotide probe Bt (5.7) โดยตัวอย่างที่ให้ผลลบกับการทดสอบนี้ แสดงว่าไม่ใช่ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11 หรือทดสอบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*f I ซึ่งตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11 จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 เส้น มีขนาด 116 bp และ 73 bp

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR-product เท่ากับ positive controls คือ 189 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9

8.2 การสรุปผล :

8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.3 การรายงาน

8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11 (Bt11 maize) พบ/detected

8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt11 (Bt11 maize) ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

-

DMSc F 4012: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified Event176 (Bt176) maize by means of Polymerase Chain Reaction

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Event176 maize (Syngenta) ในข้าวโพดที่เป็นวัตถุดิบและแปรรูปแล้ว โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการตรวจหาลำดับเบสที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่างยีนสองยีนที่เชื่อมต่อกันก่อนใส่เข้าไปในยีนของข้าวโพด ข้าวโพด Event176 ถูกดัดแปรพันธุกรรมเพื่อให้สร้างสารพิษที่เรียกว่า Bt toxin (ชนิด *cry*IA(b)) จาก *Bacillus thuringiensis* โดยใส่ยีน Bt ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ CDPK จากข้าวโพดเป็น promoter

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

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

2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods

2.3 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W,: *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

PCR: Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR-product สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอและสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาดและ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยการเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้าอาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR product ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

4.4 โครงสร้างของยีนที่ตรวจด้วยวิธีนี้ อาจมีการนำไปใช้ในพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นในอนาคต

4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด Event176 (Bt176) และกับข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง Event176 (Bt176) และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น ๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยว ๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

4.6 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์นี้ไม่ตรงกับข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมและพืชอื่น ๆ (ข้อมูลจาก GenBank® ที่สืบค้นด้วย BlastN® 2.2.1 เมื่อปี 2001) นอกจากนี้ยังเป็น primer ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการดัดแปรขึ้นมา ไม่ได้เกิดตามธรรมชาติ

4.7 ไม่พบการเพิ่มปริมาณของ primer นี้เมื่อตรวจสอบกับถั่วเหลือง GTS 40-3-2 และข้าวโพด Bt11, T25 และ MON810 หรือกับข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม

4.8 สารพิษ Bacillus thuringiensis (Bt toxin) เป็นสารกำจัดแมลงที่ได้มาจากแบคทีเรีย และนั่นทำให้พืชที่ดัดแปรพันธุกรรมโดยการใส่ยีนชนิดนี้เข้าไปสามารถสร้างสารพิษเพื่อกำจัดแมลงได้ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Event176 (Bt176) ได้ดัดแปรโดยใส่ยีนสังเคราะห์ Cry1A(b) และควบคุมการแสดงออกโดยใช้ CDPK6 promoter วิธีวิเคราะห์นี้จะตรวจหาลำดับเบสที่เชื่อมระหว่าง 2 ยีนดังกล่าว และให้ขนาดของ PCR product 211 bp ที่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้วิธีการให้ PCR product ผ่านเจลด้วยกระแสไฟฟ้าหรือวิธีไฮบริไดเซชัน

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, PCR grade

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

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 2.5 mM (รวมเป็น 10 mM)

5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 µM ให้ PCR-product ขนาด 211 bp

5.5.1 Forward primer: Cry03: 5'- CTC TCg CCg TTC ATg TCC gT -3'
ไม่มีหมายเลข Acession No เนื่องจาก primer นี้อยู่ในตำแหน่ง CDPK6 แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบการเข้าคู่กับลำดับเบสกับยีน CDPK ของข้าวโพด Acession No L27484.1 ให้ผลเท่ากับ 100%

5.5.2 Reverse primer: ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No 41419 โดย primer นี้เข้าคู่กับลำดับเบสของยีน CryIA(b) ที่สังเคราะห์ขึ้น
Cry04: 5'- ggT CAg gCT CAg gCT gAT gT -3'

5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 IU/µl

5.7 Hybridization probe Cry01: ATg gAC AAC AAC CCC AAC ATC -3.'

5.8 Prehybridization solution, ประกอบด้วย 5 x SSC, 0,1% (mass concentration) N-lauroyl-sarcosine, 0.02% (mass concentration) ของ SDS, และ 1% Blocking Reagent

5.9 Hybridization solution, ประกอบด้วย 10 pmol of hybridization probe in 2.5 ml ใน prehybridization solution (5.8). อุณหภูมิที่ใช้สำหรับไฮบริไดเซชัน 50˚C สามารถดูข้อมูลอื่น ๆ เกี่ยวกับสภาวะเพิ่มเติมของการทำ hybridization ได้ในเอกสารอ้างอิง (3)

5.10 เอนไซม์ตัดจำเพาะ : *Hae* III, *Taq* I หรือ *Dde* I

6. การเตรียมตัวอย่าง (Preparation of test sample)

6.1 Thermal cycler

6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply ขนาด 5V/cm

6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.

6.4 เครื่องบันทึกภาพ เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ E176_1

ตาราง *E176_1*

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Sample DNA	10 ng to 50 ng	2
Water		15.4
10 x PCR buffer (without $MgCl_2$)	1 x	2.5
$MgCl_2$-solution[a], 25 mmol/l	1.5 mmol/l	1.5
dNTP solution , 10 mmol/l	0.4 mmol/l	1.0
Primer Cry03, 5 µmol/l	0.25 µmol/l	1.25
Primer Cry04, 5 µmol/l	0.25 µmol/l	1.25
Taq DNA polymerase, 5 IU/µl	0.5 IU	0.1
[a] ถ้า PCR buffer มีส่วนผสมของ $MgCl_2$ ให้ปรับค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ให้เท่ากับ 1.5 mmol/l		

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM Event176 maize (Bt176)

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง E176_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง *E176_2*

Step	Time/temp
Activation/Initial denature	12 min/95°C
Amplification	30 s/95°C
	30 s/63°C
	30 s/72°C
Number of cycles	38
Final extension	6 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR product

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr (ตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหารเล่ม 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2558)

7.5 การยืนยันผล

ตรวจสอบด้วยวิธี Southern hybridization โดยใช้ digoxygenine-labelled oligonucleotide probe Cry01 (5.7) โดยตัวอย่างที่ให้ผลลบกับการทดสอบนี้ แสดงว่าไม่ใช่ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Event176 (Bt176) หรือตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ซึ่งตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Event176 (Bt176) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III จะให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 162 และ 49 bp ในขณะที่ตัดด้วย *Taq* I จะให้ชิ้นส่วน 3 ชิ้นคือ 168, 22 และ 21 bp หรือถ้าใช้เอนไซม์ *Dde* I จะให้ขนาด 128, 72 และ 11 bp ตามลำดับ

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR-product เท่ากับ positive controls คือ 211 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9

8.2 การสรุปผล :

8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.3 การรายงาน

8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน
ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Event176 หรือ Bt176 พบ/detected

8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน
ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด Event176 หรือ Bt176 ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

-

DMSc F 4013: Construct-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified T25 maize by means of Polymerase Chain Reaction

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิดทนทานต่อยาปราบวัชพืช T25 "LibertyLink" ในวัตถุดิบข้าวโพด โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการตรวจหาลำดับเบสที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่างยีน CaMV 35S promoter และ *pat* gene ที่ใส่เข้าไปในข้าวโพด

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

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

2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

PCR: Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR-product สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอและสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาด และ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR product ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

4.4 โครงสร้างของยีนที่ตรวจด้วยวิธีนี้ อาจมีการนำไปใช้ในพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นในอนาคต

4.5 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด T25 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง T25 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยวๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

4.6 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์นี้ไม่ตรงกับข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมและพืชอื่นๆ (ข้อมูลจาก GenBank® ที่สืบค้นด้วย BlastN® 2.2.1 เมื่อ 1 กรกฎาคม 2001) นอกจากนี้ยังเป็น primer ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการดัดแปรขึ้นมา ไม่ได้เกิดตามธรรมชาติ

4.7 ไม่พบการเพิ่มปริมาณของ primer นี้เมื่อตรวจสอบกับข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมและถั่วเหลือง GTS 40-3-2 รวมถึงข้าวโพด Bt11, Event176 (Bt176) และ MON810

4.8 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายมี 1 copy

4.9 ยีน *pat* เป็นยีนที่ได้มาจาก *Streptomyces viridochromogenes* ซึ่งสามารถสร้างโปรตีน phosphinothricin-*N*-acetyltransferase ช่วยให้พืชสามารถทนต่อยาปราบวัชพืชชนิด herbicide glufosinate ammonium ซึ่งสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ glutamine

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, PCR grade

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

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 2.5 mM (รวมเป็น 10 mM)

5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 μM ให้ PCR-product ขนาด 209 bp

5.5.1 Forward primer: ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No NC001497 โดย primer นี้ตรงกับลำดับเบสของ CaMV 35S promoter

T25-F7: 5'- ATg gTg gAT ggC ATg ATg TTg -3'

5.5.2 Reverse primer:

T25-R3: 5'- TgA gCg AAA CCC TAT AAg AAC CC -3'

ไม่มีหมายเลข Acession No แต่ primer นี้อยู่ในลำดับเบสของ *pat* coding region

5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 IU/μl

5.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ : *Hin*f I และ *Mwo* I

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 Thermal cycler

6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply ขนาด 5V/cm

6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.

6.4 เครื่องบันทึกภาพ เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ T25_1

ตาราง *T25_1*

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Sample DNA	10 ng to 50 ng	2
Water		14.8
10 × PCR buffer (without $MgCl_2$)	1 ×	2.5
$MgCl_2$-solution[a], 25 mmol/l	2 mmol/l	2.0
dNTP solution , 10 mmol/l	0.4 mmol/l	1.0
Primer T25-F7, 10 µmol/l	0.5 µmol/l	1.25
Primer T25-R3, 10 µmol/l	0.5 µmol/l	1.25
Taq DNA polymerase, 5 IU/µl	1 IU	0.2
[a] ถ้า PCR buffer มีส่วนผสมของ $MgCl_2$ ให้ปรับค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ให้เท่ากับ 1.5 mmol/l		

7.2 สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM T25 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง T25_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง *T25_2*

Step	Time/temp
Activation/Initial denature	12 min/95°C
Amplification	30 s/95°C
	30 s/64°C
	30 s/72°C
Number of cycles	40
Final extension	10 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าว ตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR product

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr (ตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหารเล่ม 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2558)

7.5 การยืนยันผล

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinI*f I และ/หรือ *Mwo* I ซึ่งตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด T25 เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*f I จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 เส้นคือ 121 bp, และ 88 bp และเมื่อย่อยด้วย *Mwo* I จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 141 bp และ 68 bp

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR-product เท่ากับ positive controls คือ 209 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9

8.2 การสรุปผล :

8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.3 การรายงาน

8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด T25 (T25 maize) พบ/detected

8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด T25 (T25 maize) ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

9.1 positive extraction controls ต้องให้ผลบวก

9.2 extraction blank controls ต้องให้ผลเป็นลบ

9.3 positive DNA target controls ต้องให้ผลบวก

9.4 negative DNA target controls ต้องให้ผลลบ

9.5 amplification reagent controls ต้องให้ผลลบ

10. รายละเอียดอื่น

-

DMSc F 4014: Event-specific method for detection of DNA Sequences from genetically modified MON810 maize by means of Polymerase Chain Reaction

1. ขอบข่าย (Scope)

ใช้ทดสอบหาดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON810 หรือ “YieldGuard” (ทนแมลง) ในวัตถุดิบข้าวโพด โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการตรวจหาลำดับเบสที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่างยีนข้าวโพด และ CaMV 35S promoter ที่ใส่เข้าไปในข้าวโพด

2. เอกสารอ้างอิง (Reference)

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

2.2 ISO 21569:2005(E): Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative Nucleic Acid based methods

3. นิยามศัพท์และคำย่อ (Terminology and abbreviation)

PCR: Polymerase Chain Reaction

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

4. หลักการ (Principle)

4.1 ทั่วไป : การตรวจเชิงคุณภาพประกอบด้วยการตรวจลำดับกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่จำเพาะในตัวอย่าง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรม ภายใต้การทดสอบที่มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทดสอบที่เหมาะสม ร่วมกับ detection limit ของวิธีที่ใช้และสัดส่วนของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

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

4.2.1 การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน

4.2.2 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ primers สามารถจับเข้าคู่ได้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นเป้าหมาย

4.2.3 จำลองสายของ primers ที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออก แล้วทำให้ยาวขึ้นโดยใช้ DNA polymerase ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

4.3 การตรวจสอบและยืนยันผล

สายดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจากปฏิกิริยาถูกเรียกว่า PCR-product สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เพื่อการแยกและจำแนกขนาด และอ่านผลโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอและสามารถกระตุ้นให้เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอที่รู้ขนาด และ/หรือปริมาณ เมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยการเทคนิคการแยกผ่านเจลด้วยไฟฟ้า อาจทำการยืนยันต่อด้วยการใช้เทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการยืนยันลำดับเบสของ PCR product ส่วนในกรณีของ real-time PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบผลจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

4.4 ไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพด MON810 และข้าวโพดที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง MON810 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น ๆ (gene stacked cultivars) ยกเว้นการตรวจที่เมล็ดเดี่ยว ๆ หรือตรวจที่ต้นข้าวโพดโดยตรง

4.5 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์นี้ไม่ตรงกับข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมและพืชอื่น ๆ (ข้อมูลจาก GenBank® ที่สืบค้นด้วย BlastN® 2.2.1 เมื่อ 1 กรกฎาคม 2001) นอกจากนี้ยังเป็น primer ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการดัดแปรขึ้นมา ไม่ได้เกิดตามธรรมชาติ

4.6 ไม่พบการเพิ่มปริมาณของ primer นี้เมื่อตรวจสอบกับข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมและถั่วเหลือง GTS 40-3-2 รวมถึงข้าวโพด Bt11, Event176 (Bt176) และ T25

4.7 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายมี 1 copy

4.8 ยีน Bt ที่ใช้ในการดัดแปรข้าวโพดชนิด MON810 ได้มาจากแบคทีเรียในดิน Bacillus *thuringiensis* subsp. *Kurstaki* ซึ่งทำให้ข้าวโพด MON810 สามารถสร้างโปรตีนที่ป้องกันจากการเจาะทำลายของ European corn borer larvae เนื่องจากโปรตีนที่สร้างขึ้นในพืชจะเริ่มทำงานในลำไส้ของแมลงที่กัดกินเข้าไป และทำให้เกิดรูที่ผนังลำไส้ ส่งผลให้ระบบการดูดซึมเสียสมดุลและเซลล์ในลำไส้ถูกทำลาย

5. สารเคมี (Reagent)

5.1 Water, PCR grade

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

5.3 $MgCl_2$ solution ความเข้มข้น 25 mmol/l

5.4 dNTP solution ความเข้มข้นของแต่ละ nucleotide เท่ากับ 2.5 mM (รวมเป็น 10 mM)

5.5 Oligonucleotides ความเข้มข้นของแต่ละเส้นเท่ากับ 10 µM ให้ PCR-product ขนาด 170 bp

5.5.1 Forward primer: ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No AF434709 ซึ่งเป็นลำดับเบสของจีโนมของข้าวโพด

VW01: 5'- TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA Cg -3'

5.5.2 Reverse primer: ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอของ Accession No V00141, J02048 โดย primer นี้ตรงกับลำดับเบสของ CaMV 35S promoter

VW03: 5'- TCC ATC TTT ggg ACC ACT gTC g-3'

5.6 Thermostable DNA polymerase (สำหรับ hot-start PCR), 5 IU/µl

5.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ : *Hae* III และ *Mwo* I

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ (Apparatus)

6.1 Thermal cycler

6.2 Electrophoresis chamber พร้อม power supply ขนาด 5V/cm

6.3 Ultraviolet (UV) trans-illuminator ที่สามารถให้ความยาวคลื่นที่ 312 nm.

6.4 เครื่องบันทึกภาพ เช่น photo-document หรือ กล้อง CCD

7. ขั้นตอนการทดสอบ (Procedure)

7. 1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (PCR setup)

เตรียมสารเคมีในหลอดสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยเฉพาะให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร เพื่อให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายดังตารางที่ M810_1

ตาราง *M810_1*

Reagent	Final concentration	Volume per sample (µl)
Sample DNA	10 ng to 50 ng	2
Water		14.8
10 x PCR buffer (without $MgCl_2$)	1 ×	2.5
$MgCl_2$-solution[a], 25 mmol/l	2 mmol/l	2.0
dNTP solution, 10 mmol/l	0.4 mmol/l	1.0
Primer VW01, 10 µmol/l	0.5 µmol/l	1.25
Primer VW03, 10 µmol/l	0.5 µmol/l	1.25
Taq DNA polymerase, 5 IU/µl	1 IU	0.2
[a] ถ้า PCR buffer มีส่วนผสมของ $MgCl_2$ ให้ปรับค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ $MgCl_2$ ให้เท่ากับ 1.5 mmol/l		

7.2. สารควบคุม (PCR controls)

7.2.1 positive extraction controls

7.2.2 extraction blank controls

7.2.3 positive DNA target controls เช่น 0.1% CRM MON810 maize

7.2.4 negative DNA target controls

7.2.5 amplification reagent controls

7.3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (Temperature-time programme)

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ตามระบุในตาราง M810_2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับเครื่อง GeneAmp® 2400 หรือ GeneAmp® 9600 และใช้เอนไซม์ AmpliTaq Gold® DNA polymerase ถ้าใช้เครื่องนอกเหนือจากนี้อาจต้องมีการปรับเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ตามต้องการ

ตาราง *M810_2*

Step	Time/temp
Activation/Initial denature	12 min/95°C
Amplification	30 s/95°C
	30 s/64°C
	30 s/72°C
Number of cycles	40
Final extension	10 min/72°C

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการทำงานของ heat-activated DNA polymerase อาจแตกต่างไปตามแต่ละผู้ผลิต ให้ปรับเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าว ตามคำแนะนำจากผู้ผลิต

7.4 ตรวจสอบ PCR product

โดยการแยกผ่านเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า และย้อมสีด้วย EtBr (ตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อาหารเล่ม 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2558)

7.5 การยืนยันผล

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mwo* I และ/หรือ *Hae* III ซึ่งตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON810 เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae* III จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 เส้นคือ 126 bp, และ 44 bp และเมื่อย่อยด้วย *Mwo* I จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 109 bp และ 61 bp

8. การคำนวณและการรายงานผล (Calculation and expression of results)

8.1 ตัวอย่างทดสอบจะถือว่าให้ผลบวกถ้าให้ขนาดของ PCR-product เท่ากับ positive controls คือ 170 bp และผลของ PCR controls ทั้งหมดให้ผลตามระบุในข้อ 9

8.2 การสรุปผล :

8.2.1 สรุปผลว่าผลการทดสอบให้ผลเป็นบวก กรณีที่ผลการทดสอบให้ผลบวกทั้ง 2 subsample และผลของชุดควบคุมเป็นไปตามระบุในข้อ 9

8.2.2 ถ้าผลวิเคราะห์ทั้ง 2 subsample ต่างกันให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ถ้าผลวิเคราะห์ยังเหมือนเดิมให้สรุปผลเป็นลบ

8.3 การรายงาน

8.3.1 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นบวก ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON810 (MON810 maize) พบ/detected

8.3.2 ผลการวิเคราะห์ที่เป็นลบ ให้รายงาน

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิด MON810 (MON810 maize) ไม่พบ/not detected

9. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ (Assuring the quality of test results)

ทุกครั้งที่ทำ PCR ต้องมีการใช้ควบคุมโดยที่เมื่อทำ PCR เรียบร้อยแล้วผลของสารควบคุมที่ถือว่าใช้ได้และผลการวิเคราะห์สามารถแปลผลได้คือ

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

10. รายละเอียดอื่น

-

ภาคผนวก

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 1
วิธีมาตรฐานทางเคมี

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

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

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

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 2
วิธีมาตรฐานทางเคมี

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

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 2009	วิธีตรวจวิเคราะห์ยีสต์และราในอาหารโดยวิธี pour plate และ spread plate
2	DMSc F 2010	วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* ในอาหาร
3	DMSc F 2011	วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร
4	DMSc F 2012	วิธีตรวจวิเคราะห์ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารโดยวิธี MPN
5	DMSc F 2013	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร โดยวิธี pour plate
6	DMSc F 2014	วิธีตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง โดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธีมาตรฐานทางกายภาพ

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

รายชื่อวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3

วิธีมาตรฐานทางเคมี

ที่	รหัสวิธี	วิธี
1	DMSc F 1042	การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ
2	DMSc F 1043	การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรตและซัลเฟตในน้ำ
3	DMSc F 1044	การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในน้ำ
4	DMSc F 1045	การวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แคดเมียม โครเมียม ทองแดง แมงกานีส นิกเกิล สังกะสี และเงินในน้ำ
5	DMSc F 1046	การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในน้ำ
6	DMSc F 1047	การวิเคราะห์ปริมาณใยอาหารทั้งหมดในอาหารโดย Enzymatic-Gravi metric Method
7	DMSc F 1048	การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มในน้ำส้มสายชูโดยวิธี Titration
8	DMSc F 1049	การตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรดในซอสบางชนิดโดยวิธี Titration
9	DMSc F 1050	การวิเคราะห์ค่าของกรดในน้ำมันและไขมัน
10	DMSc F 1051	การวิเคราะห์ Phenolic Antioxidants ในน้ำมัน, ไขมันและเนย
11	DMSc F 1052	การวิเคราะห์สารโพลาร์ในน้ำมันและไขมันโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
12	DMSc F 1053	การวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมต ในผักผลไม้
13	DMSc F 1054	การวิเคราะห์ปริมาณ 3-chloro-1, 2- propanediol (3-MCPD) ในอาหารและส่วนผสมอาหาร

วิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา

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

วิธีมาตรฐานทางชีวโมเลกุล

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