บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ถั่วลิสงป่นสุ่มซื้อมาจากร้านค้าในตลาดสด จำนวน 7 แห่ง ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ ตลาดสุเทพ ประตูเชียงใหม่ ช้างเผือก เมืองใหม่ ต้นลำไย หนองหอย และสันป่าข่อย (ดูลักษณะร้านค้าและตลาดในภาคผนวก ก) โดยสุ่มซื้อตลาดละ 3 ร้านๆ ละ 1 กิโลกรัม และสุ่มซื้อตัวอย่าง 3 ช่วง คือ ช่วงฤดูหนาวเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2545 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 และกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 และช่วงฤดูฝนเดือนกรกฎาคม ถึงตุลาคม พ.ศ. 2546 โดยสุ่มตัวอย่างจากร้านค้าเดียวกันทั้ง 3 ช่วง หลังจากนั้นนำตัวอย่างถั่วลิสงป่น (ยกเว้นตัวอย่างที่สุ่มในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547) มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางแบบสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography; HPTLC) หาปริมาณความชื้น และค่าน้ำอิสระ (a_w) ซึ่งค่าน้ำอิสระได้วิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่สุ่มซื้อในช่วงฤดูฝนและในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547

3.1.2 สารเคมีและสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซิน

- อะฟลาทอกซินมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินชนิด B_1, B_2, G_1 และ G_2 ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company และได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งนำมาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) นำสารอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดรวม 4 ชนิด มาละลายด้วยตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วยเบนซีน (benzene) และอะซีโตไนไตร์ล (acetonitrile) อัตราส่วน 98:2 ซึ่งสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินมีความเข้มข้นดังนี้

aflatoxin B_1	0.50 ng/µl
aflatoxin B_2	0.25 ng/µl
aflatoxin G_1	0.50 ng/µl
aflatoxin G_2	0.25 ng/µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ซิลิกาเจล 60 (silica gel 60) ขนาด 70-230 mesh จากบริษัท Merck อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น จากนั้นนำซิลิกาเจลที่อบแล้วมาเติมน้ำจำนวน 1% โดยน้ำหนัก เขย่าให้เข้ากันในภาชนะที่ปิดสนิท ปล่อยไว้นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาบรรจุใส่ลงในคอลัมน์
- สำลีปราศจากไขมันเตรียมโดยนำสำลีไปแช่ในเฮกเซน (hexane) ใช้แท่งแก้วคนให้สำลีดูดซับเฮกเซนอย่างทั่วถึง ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง นำสำลีนั้นมาผึ่งบนถาดเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) ในตู้ดูดควัน (fume hood) เพื่อให้เฮกเซนระเหยออกไปจนหมด อบสำลีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่สะอาดและปิดสนิทก่อนนำมาใช้
- สารซีไลต์ (celite® 545) ใช้ชนิด analytical grade จากบริษัท Fluka Chemika
- โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous) นำเข้าเตาเผาอุณหภูมิสูง 700 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง (Windholz, 1976) ปล่อยให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น เก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทก่อนนำมาใช้
- ตัวทำละลายและสารเคมีต่างๆ เช่น คลอโรฟอร์ม เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์แอนไฮดรัส (diethyl ether anhydrous) อะซีโตน เบนซีน อะซีโตไนไตร์ล และเมทานอล ใช้ชนิด analytical grade จากบริษัท Merck
- สารละลายสำหรับ packing คอลัมน์ เตรียมโดยผสมคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการหาความชื้น

- กรดกำมะถัน (sulfuric acid, H_2SO_4) ความเข้มข้น 95-97% จากบริษัท Merck

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซิน

- เครื่องเขย่า : Yamato shaker Model SA-31 สำหรับเขย่า separatory funnel
- Chromatographic tube : ขนาด 1.5 x 40.0 เซนติเมตร ที่มี teflon stopcock สำหรับ pack ซิลิกาเจล
- เครื่องระเหยสุญญากาศ : Buchi Rotavapor-R E111 ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส ขณะระเหย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องระเหยสุญญากาศ : Romer Evap™ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส ขณะระเหย

Thin Layer Chromatographic Apparatus

- TLC plate : ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร Merck 721 TLC plates ซิลิกาเจล 60 ที่ปราศจากสารที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ก่อนนำมาใช้ให้ชะด้วยเมทานอล แล้วอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยไว้ให้เย็นโดยเก็บไว้ในโถแก้วดูดความชื้น
- Camag Automatic TLC Sample III
- กล่องดำสำหรับส่อง UV : Chromato-VUE รุ่น C-70G UV Viewing System
- Densitometer : Camag TLC Scanner 3 Chromatogram Spectrophotometer
- เครื่องบดไฟฟ้า National รุ่น MX-T2GN
- เครื่อง run แผ่น TLC อัตโนมัติ (automatic developing chamber) : Camag รุ่น ADC

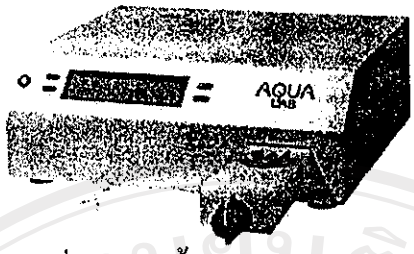
3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหาความชื้น

- เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
- ตู้อบสุญญากาศ บริษัท Precision รุ่น D25
- ถ้วยอะลูมิเนียมก้นแบนสำหรับใช้หาความชื้นตัวอย่างอาหาร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร พร้อมฝาปิด
- คีมคีบ
- โถดูดความชื้นสุญญากาศ (vacuum desiccator)
- ขวดดักก๊าซ (gas washing bottles)

3.2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหาค่า a_w ด้วยเครื่องวัดค่าน้ำอิสระ

- ตลับพลาสติก (a_w box)
- เครื่องวัดค่าน้ำอิสระ (water activity meter : a_w meter)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.1 เครื่องวัดค่าน้ำอิสระ บริษัท Aqua Lab

3.2.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหาความชื้นสัมพัทธ์

- เทอร์โมมิเตอร์ชนิดกระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง (dry and wet thermometers)

3.3 วิธีหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดมา 50 กรัม ถ่ายใส่กรวยแยก ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร สารซีไลต์ 25 กรัม และคลอโรฟอร์มจำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นสกัดเหมือนตัวอย่างปกติตามหัวข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% recovery) ของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินที่เติมลงไปได้ดังนี้

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ดังนี้

สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด B_1 มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.072 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฉะนั้น สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด B_1 = 1.072 ไมโครกรัม

สารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด B_1 = 1.072 x 1,000 นาโนกรัม

ถ้าสารละลายมาตรฐาน 200 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด B_1 = $\frac{1.072 \times 1,000 \times 200}{1,000}$ นาโนกรัม

= 214.4 นาโนกรัม

เติมอะฟลาทอกซินชนิด B_1 = 214.4 นาโนกรัม

ฉะนั้นมีอะฟลาทอกซินชนิด B_1 = $\frac{214.4 \times 1}{50}$ นาโนกรัมต่อกรัม

= 4.29 นาโนกรัมต่อกรัม

แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \frac{C_2 - C_1}{C_{added}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C_1 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_2 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_{added} = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ที่เติมลงในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อกรัม)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของอะฟลาทอกซินชนิด } B_1 = \frac{4.85 - 0}{4.29} \times 100$$

$$= 113.05$$

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด B_2 ดังนี้

สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด B_2 มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฉะนั้น สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด B_2 = 0.312 ไมโครกรัม

สารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด B_2 = 0.312 x 1,000 นาโนกรัม

ถ้าสารละลายมาตรฐาน 200 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด $B_2 = \frac{0.312 \times 1{,}000 \times 200}{1{,}000}$ นาโนกรัม

= 62.4 นาโนกรัม

เติมอะฟลาทอกซินชนิด B_2 = 62.4 นาโนกรัม

ฉะนั้นมีอะฟลาทอกซินชนิด $B_2 = \frac{62.4 \times 1}{5}$ นาโนกรัมต่อกรัม

= 1.25 นาโนกรัมต่อกรัม

แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ} = \frac{C_2 - C_1}{C_{added}} \times 100$$

C_1 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_2 ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_2 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_2 ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_{added} = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_2 ที่เติมลง ในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อกรัม)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของอะฟลาทอกซินชนิด } B_2 = \frac{1.52 - 0}{1.25} \times 100$$

$$= 121.60$$

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด G_1 ดังนี้

สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด G_1 มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.869 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฉะนั้น สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด G_1 = 0.869 ไมโครกรัม

สารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด G_1 = 0.869 x 1,000 นาโนกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถ้าสารละลายมาตรฐาน 200 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด G_1 = $\frac{0.869 \times 1,000 \times 200}{1,000}$ นาโนกรัม

= 173.8 นาโนกรัม

เติมอะฟลาทอกซินชนิด G_1 = 173.8 นาโนกรัม

ฉะนั้นมีอะฟลาทอกซินชนิด G_1 = $\frac{173.8 \times 1}{50}$ นาโนกรัมต่อกรัม

= 3.48 นาโนกรัมต่อกรัม

แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ = $\frac{C_2 - C_1}{C_{added}} \times 100$

C_1 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด G_1ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_2 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด G_1ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_{added} = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด G_1ที่เติมลงในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อกรัม)

เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของอะฟลาทอกซินชนิด G_1 = $\frac{3.86 - 0}{3.48} \times 100$

= 110.92

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด G_2 ดังนี้

สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินชนิด G_2 มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.327 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฉะนั้น สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด G_2 = 0.327 ไมโครกรัม

สารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด G_2 = 0.327 x 1,000 นาโนกรัม

ถ้าสารละลายมาตรฐาน 200 ไมโครลิตร มีอะฟลาทอกซินชนิด G_2 = $\frac{0.327 \times 1,000 \times 200}{1,000}$ นาโนกรัม

= 65.40 นาโนกรัม

เติมอะฟลาทอกซินชนิด G_2 = 65.40 นาโนกรัม

ฉะนั้นมีอะฟลาทอกซินชนิด G_2 = $\frac{65.40 \times 1}{50}$ นาโนกรัมต่อกรัม

= 1.31 นาโนกรัมต่อกรัม

แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ = $\frac{C_2 - C_1}{C_{added}} \times 100$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C_1 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด G_2ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_2 = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด G_2ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อกรัม)

C_{added} = ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด G_2 ที่เติมลงในตัวอย่าง (นาโนกรัมต่อกรัม)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของอะฟลาทอกซินชนิด } G_2 = \frac{0.83 - 0}{1.31} \times 100$$

$$= 63.36$$

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงป่นที่จำหน่ายในตลาดสด ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

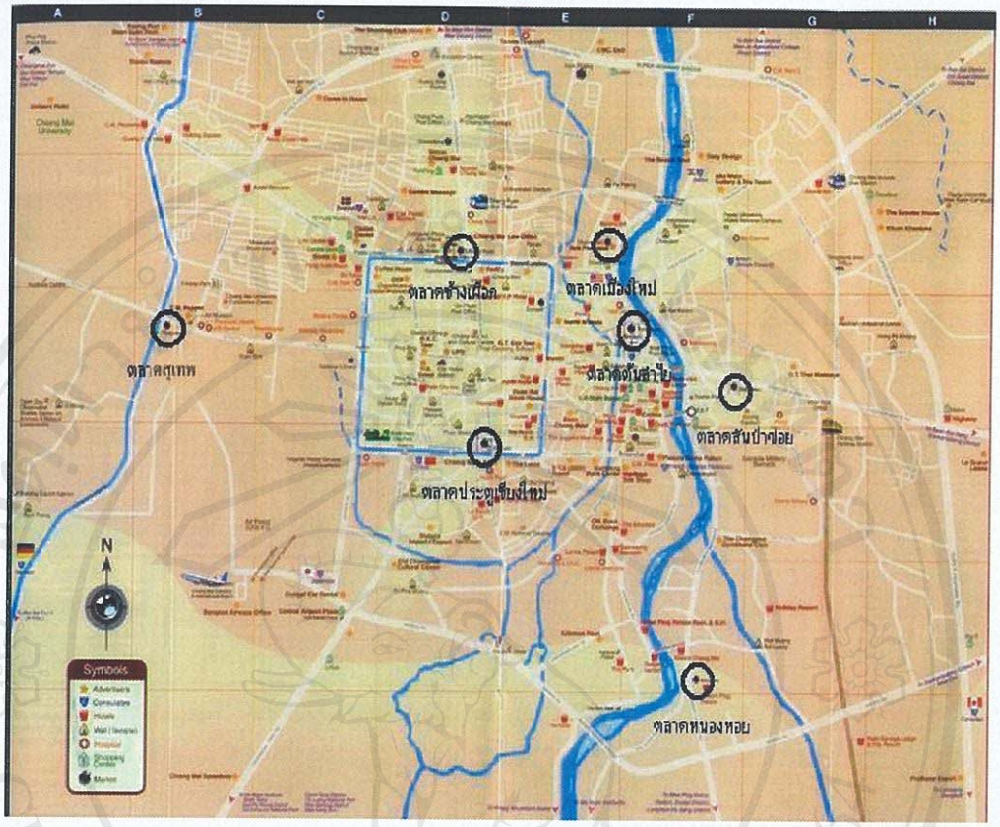
ทดลอง 2 ช่วง คือ ช่วงฤดูหนาวเดือนพฤศจิกายน 2545-กุมภาพันธ์ 2546 และ ช่วงฤดูฝนเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม 2546 โดยมีวิธีการทดลองเหมือนกันทั้งสองช่วงดังนี้

3.4.1.1 การสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงป่น

สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงป่นจากตลาดสดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 7 ตลาด ได้แก่ ตลาดสุเทพ ประตูเชียงใหม่ ช้างเผือก เมืองใหม่ ต้นลำไย หนองหอย และสันป่าข่อย ตำแหน่งของตลาดแสดงดังรูปที่ 3.2 โดยเหตุผลที่เลือกตลาดเหล่านี้ เนื่องจากเป็นตลาดขนาดใหญ่ที่มีทั้งร้านค้าขายปลีกและขายส่งสินค้าออกไปยังตลาดที่อยู่นอกเขตอำเภอเมืองเป็นส่วนมาก ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสที่จะซื้อถั่วลิสงป่นที่มีคุณภาพใกล้เคียงกันทั้งจังหวัด ดังนั้นจึงควรเป็นตัวแทนของอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ได้ ซึ่งการสำรวจตลาดพบว่า มีร้านค้าที่ขายถั่วลิสงป่นในตลาดสุเทพเพียง 3 ร้านเท่านั้น จึงเก็บตัวอย่างถั่วลิสงป่นจากตลาดอื่นๆ จำนวน 3 ร้าน เพื่อให้จำนวนร้านค้าเท่ากันทุกตลาด กรณีตลาดอื่นๆ ที่มีร้านค้าขายถั่วลิสงป่นมากกว่า 3 ร้าน ได้สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงป่นโดยการจับฉลากชื่อร้านค้ามา 3 ร้านจากร้านค้าทั้งหมดของตลาดนั้นๆ

การสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงป่นที่จำหน่ายในร้านค้าจากตลาดแต่ละแห่ง ได้สุ่มตัวอย่างตลาดละ 3 ร้านๆ ละ 1 ครั้งๆ ละ 1 กิโลกรัม แล้วบรรจุตัวอย่างที่สุ่มในถุงพลาสติกแบบใสและรัดด้วยยางรัด จากนั้นนำตัวอย่างมาที่ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานอาหารทางด้านเคมี ศูนย์-วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากแต่ละตลาดมาปิดผนึกใหม่ด้วยความร้อนโดยไล่อากาศในถุงที่บรรจุถั่วลิสงป่นออกให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อเป็นการรักษาสภาพของถั่วลิสงป่นวิธีหนึ่ง แล้วเก็บไว้บนโต๊ะในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.2 แผนที่ตลาดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ที่มา : Saengsangkom (2003)

3.4.1.2 การตรวจวิเคราะห์

นำตัวอย่างถั่วลิสงป่นที่เตรียมจากข้อ 3.4.1.1 มาตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยเริ่มต้นวิเคราะห์หาความชื้นของตัวอย่างทั้งหมดตามข้อ 3.5.5 และหาค่า a_w ตามข้อ 3.5.6 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินวันละ 3 ตัวอย่างไปเรื่อยๆ จนครบ 21 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ค่าที่ได้ทั้งสองค่าจะต้องเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดทั่วไปของ precision ตาม AOAC 1993 (จิตรา, 2545) ถ้าไม่ได้ตามเกณฑ์นี้ ต้องวิเคราะห์ตัวอย่างใหม่อีก 2 ซ้ำ และในการวิเคราะห์แต่ละครั้งจะต้องหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ 1 ตัวอย่าง โดยเปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ได้ต้องเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของการทำเปอร์เซ็นต์การคืนกลับตาม AOAC 1993 (จิตรา, 2545) (ดูตารางเกณฑ์กำหนดทั่วไปของ precision และเปอร์เซ็นต์การคืนกลับในภาคผนวก ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นและค่าน้ำอิสระ (a_w) ในถั่วลิสงป่น

สุ่มเก็บตัวอย่างถั่วลิสงป่นจากตลาดสดจำนวน 7 แห่งในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงฤดูฝนเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม 2546 และสุ่มตัวอย่างเพิ่มอีกตลาดสดละ 1-2 ร้านในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 ได้จำนวนถั่วลิสงป่นทั้งหมดรวม 33 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและค่า a_w แล้วนำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน

3.5 วิธีวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซิน

การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซิน มีขั้นตอนดังนี้ (ดูขั้นตอนการวิเคราะห์เพิ่มเติมในภาคผนวก ค)

3.5.1 การเตรียมคอลัมน์สำหรับทำความสะอาดตัวอย่างที่สกัดได้

การเตรียมทำได้โดยใส่สำลีที่ปราศจากไขมันลงใน chromatographic tube ใช้แท่งแก้วยาวดันสำลีลงไปตรงปลายด้านที่มี stopcock เติมสารละลาย packing ที่เตรียมจากคลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (1:1) ลงไปประมาณ 15 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วยาวกดไล่ฟองอากาศออกจากสำลีให้หมด เติม anhydrous Na_2SO_4 จำนวน 2 กรัม ใช้สารละลาย packing จำนวน 5 มิลลิลิตร ล้าง anhydrous Na_2SO_4 ที่ติดอยู่ข้างผนังคอลัมน์ลงไปรวมกันที่ปลายด้านล่าง ไขให้สารละลาย packing ไหลออกทีละหยดจน anhydrous Na_2SO_4 เรียงตัวเป็นแนวเรียบไม่มีฟองอากาศ และให้มีสารละลาย packing เหลืออยู่เหนือระดับของ anhydrous Na_2SO_4 ประมาณ 5-7 เซนติเมตร นำซิลิกาเจลที่เตรียมไว้มาจำนวน 2 กรัม ผสมกับสารละลาย packing ประมาณ 10-15 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนเป็นสารละลายข้น (slurry) แล้วค่อยๆ เทลงไปในคอลัมน์ ใช้สารละลาย packing อีกประมาณ 5-10 มิลลิลิตร ล้างซิลิกาเจลที่ติดอยู่ข้างผนังคอลัมน์ลงไปรวมกันที่ปลายด้านล่าง ไขสารละลาย packing ให้ไหลออกทีละหยดจนซิลิกาเจลเรียงตัวเป็นแนวเรียบ ไม่มีฟองอากาศ และให้มีสารละลายเหลืออยู่เหนือระดับซิลิกาเจลประมาณ 5-7 เซนติเมตร เติม anhydrous Na_2SO_4 จำนวน 3 กรัม ลงไป โดยกระทำเช่นเดียวกับข้างต้น จะได้ซิลิกาเจลคอลัมน์ จากนั้นไขสารละลาย packing ให้ลดลงเหลือประมาณ 0.5 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าของ anhydrous Na_2SO_4 ก่อนเติมสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างถั่วลิสงป่นลงไป (AOAC, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 วิธีการสกัดอะฟลาทอกซิน

การสุ่มตัวอย่าง

นำตัวอย่างทั้งหมดในถุงจำนวน 1 กิโลกรัม เทใส่ถาดรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด กว้าง x ยาว ประมาณ 30 x 60 เซนติเมตร ผสมให้เข้ากันดี เกลี่ยให้เต็มถาด แล้วแบ่งตามแนวทะแยงมุมทั้ง 2 แนว เลือกด้านตรงข้ามกัน 2 ด้าน ผสมให้เข้ากันเพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด นำตัวอย่างที่สุ่มได้มาบด ด้วยเครื่องเครื่องบดไฟฟ้า National รุ่น MX-T2GN ให้มีความละเอียดขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดมา 50 กรัม ถ่ายใส่กรวยแยก ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร สารซีไลต์ 25 กรัม และคลอโรฟอร์ม จำนวน 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกเทฟล่อนแล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่า เขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่สกัดได้มาผ่านกรวยกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ที่มีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่สกัดได้ 40 มิลลิลิตร (ตัวแทนของตัวอย่างหนัก 10 กรัม) มาระเหยภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ : Buchi Rotavapor-R E111 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้เหลือปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายดังกล่าว แล้วนำไปใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจลที่อิ่มตัวด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (1:1) ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า เปิด stopcock ให้สารละลายค่อยๆ ไหลออกจากคอลัมน์จนเกือบแห้ง แล้วเติมเฮกเซน จำนวน 30 มิลลิลิตร ตามด้วยไดเอทิลอีเทอร์แอนไฮดรัส จำนวน 30 มิลลิลิตร เพื่อล้างไขมัน สารสี และสิ่งเจือปนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ แล้วชะสารอะฟลาทอกซินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย eluting ที่เตรียมมาจากคลอโรฟอร์ม : อะซีโตน (4:1) จำนวน 40 มิลลิลิตร โดยเก็บ eluate ในฟลาสค์ก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยให้เหลือประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ภายใต้สุญญากาศ ใช้ Pasteur pipette ดูดถ่ายสารที่สกัดได้ใส่ลงในหลอดทดลอง ล้างสารสกัดที่ยังคงเหลือในฟลาสค์ก้นกลมด้วยคลอโรฟอร์มประมาณ 1-2 มิลลิลิตร นำใส่รวมในหลอดทดลองเดิม แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ : Romer Evap™

3.5.3 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของอะฟลาทอกซินโดยวิธี HPTLC

นำสารสกัดที่ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ : Romer Evap™ มาเติมตัวทำละลาย (dissolving solvent) ที่เตรียมจากเบนซีน : อะซีโตไนไตร์ล (98:2) จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยเขย่าให้เข้ากันเพื่อช่วยในการละลาย นำสารละลายมาหยด (spot) ลงบนแผ่น TLC plate โดยการใช้ autosample ช่วยในการหยด และแต่ละหยดมีปริมาณสารแต่ละชนิด ดังต่อไปนี้

จุดที่ 1 เป็น standard afla toxin mixture 5 µl

จุดที่ 2 เป็น สารละลายที่สกัดจากตัวอย่าง 10 µl

จุดที่ 3 เป็น recovery 10 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จุดที่ 4 เป็น standard aflatoxin mixture 10 µl

จุดที่ 5 เป็น standard aflatoxin mixture 15 µl

ในระหว่างหยดจะหยดตัวอย่างสลับกับสารละลายมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบค่า R_f ในกรณีที่มีตัวอย่างมากกว่า 1 ตัวอย่าง จะหยดในลักษณะเช่นเดียวกัน คือ จะต้องมีหยดของ standard aflatoxin mixture และหยดรวมของสารละลายที่สกัดจากตัวอย่าง และ standard aflatoxin mixture ปกติใน plate 1 อัน สามารถหยดได้ 16 หยด โดยเว้นขอบด้านข้างด้านละ 2 เซนติเมตร แล้วแต่ความเหมาะสม และหยดในแนวระนาบขึ้นมาจากขอบล่าง 2 เซนติเมตรเช่นกัน เมื่อหยดเสร็จแล้วนำไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน นำ plate ดังกล่าวไปแช่ใน developing solvent ที่เตรียมจากไดเอทิล-อีเทอร์ : เมทานอล : น้ำ (96:2.5:1.5) จำนวน 100 มิลลิลิตร เมื่อขึ้นมาถึง front line (ประมาณ 1 ใน 2 ส่วนของ plate) นำเอา plate ออกจาก chamber แล้ววางไว้ในตู้ดูดควันปล่อยให้สารละลายระเหยจนแห้ง หลังจากนั้น นำ plate ไปอ่านผลภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่มีความยาวคลื่น 365 นาโน-เมตร อะฟลาทอกซินชนิด B_1 และ B_2 จะเรืองแสงสีน้ำเงิน ส่วนอะฟลาทอกซินชนิด G_1 และ G_2 จะเรืองแสงสีเขียว ในกรณีที่ตัวอย่างมีการเรืองแสงเข้มกว่า standard aflatoxin ให้เจือจางตัวอย่างดังกล่าว แล้วหยดใหม่เพื่อให้ความเข้มของการเรืองแสงใกล้เคียงกับ standard aflatoxin แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยเครื่อง Densitometer : Camag TLC Scanner 3 Chromatogram Spectrophotometer

3.5.4 การคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซิน

นำค่า peak height หรือ peak area ของ standard aflatoxin B_1 ทุกจุดที่หยดลงบน TLC plate มาเฉลี่ย แล้วใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ peak height หรือ peak area ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน เมื่อทราบปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ที่พบในตัวอย่าง แล้วคำนวณเป็นส่วนต่อพันล้านส่วน (part per billion, ppb) โดยเปรียบเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ที่พบเป็นนาโนกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_2, G_1 และ G_2 คำนวณในลักษณะเช่นเดียวกันกับอะฟลาทอกซินชนิด B_1 หรือคำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

Aflatoxin B_1 = $(A_x . C . D) / (A . S . 10)$ ng/g sample (ppb)

A_x = peak height หรือ peak area ของตัวอย่างที่วิเคราะห์

A = peak height หรือ peak area เฉลี่ยของ standard aflatoxin B_1 ต่อ 1 µl

S = จำนวน µl ของตัวอย่างที่หยดแล้วได้ความเข้มของการเรืองแสงใกล้เคียงกับ standard aflatoxin B_1

C = ความเข้มข้นของ standard aflatoxin B_1 (ng/µl)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

D = ปริมาตรเป็น µl ของ dissolving solvent ที่ใช้ละลายสารสกัดที่ทำให้แห้งจากตัวอย่าง

10 = factor ที่เกิดจากการแบ่งสารสกัดภายหลังการกรอง เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่าง 10 กรัม (40 มิลลิลิตรของ 200 มิลลิลิตรคลอโรฟอร์มจากตัวอย่าง 50 กรัม)

3.5.5 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในถั่วลิสงป่น

อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 100±1 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไม่เกิน 100 มิลลิเมตรของปรอท เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง) จากนั้นนำถ้วยออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นสุญญากาศ เป็นเวลา 30 นาที ชั่งน้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมเปล่าพร้อมฝาปิด ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียม 2.0 กรัม นำไปอบในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 100±1 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิเมตรของปรอท เป็นเวลาประมาณ 5 ชั่วโมง ระหว่างการอบปล่อยให้อากาศแห้งผ่านขวดดักก๊าซ ซึ่งบรรจุด้วยกรดกำมะถัน เพื่อให้อากาศเข้าในตู้อบสุญญากาศอย่างช้าๆ ประมาณ 2 ฟองต่อวินาที และคอยควบคุมความดันให้อยู่ในช่วงที่กำหนด หลังจากนั้นนำถ้วยออกมาและตั้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นสุญญากาศ เป็นเวลา 30 นาที ชั่งน้ำหนักของถ้วยและตัวอย่างพร้อมฝาปิด แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (AOAC, 1995) (ดูการวิเคราะห์หาความชื้นเพิ่มเติมในภาคผนวก ง)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น ทำได้โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(A + B) - C \times 100}{B}$$

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วยเปล่าพร้อมฝาปิด (กรัม)

B = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

C = น้ำหนักถ้วยพร้อมฝาปิดและตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

3.5.6 วิธีวิเคราะห์หาค่า a_w ด้วยเครื่องวัดค่าน้ำอิสระ (water activity meter : a_w)

ใส่ตัวอย่างถั่วลิสงป่นในตลับพลาสติกสำหรับวัดค่า a_w โดยปริมาณตัวอย่างไม่เกินครึ่งหนึ่งของตลับ แล้วนำไปใส่ในเครื่องวัดค่าน้ำอิสระ หมุนปุ่มจากตำแหน่งเปิดไปยังตำแหน่งอ่าน เครื่องจะเริ่มวัดค่า a_w และเมื่อเครื่องวัดเสร็จจะมีสัญญาณเตือน บันทึกค่า วัดค่า a_w ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ทั้งนี้ก่อนวัดต้องปรับค่ามาตรฐานของเครื่องโดยใช้สารละลายมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.7 วิธีวัดความชื้นสัมพัทธ์

เติมน้ำสะอาดลงในภาชนะที่รองรับเทอร์โมมิเตอร์ชนิดเปียกให้เต็ม จากนั้นวางไว้ตรงจุดที่ต้องการวัดความชื้นสัมพัทธ์ ประมาณ 30 นาที เพื่อให้ความชื้นคงที่ แล้วอ่านค่าบนสเกลของเทอร์โมมิเตอร์ชนิดแห้งและชนิดเปียก นำค่าที่ได้มาหักลบกันแล้วอ่านค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ตามตารางที่ให้ไว้ข้างเทอร์โมมิเตอร์ เช่น ถ้าค่าที่หักลบกันแล้วเท่ากับ 3 ให้ไปอ่านค่าที่ช่อง 3 และเทียบค่าที่ระดับอุณหภูมิของเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะแห้ง

3.5.8 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยในครั้งนี้ใช้หลักการแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) หลังจากตรวจวิเคราะห์เสร็จได้ข้อมูลออกมา นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติโปรแกรม SPSS version 10.0.5 โดยใช้ตาราง ANOVA ดูความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) และใช้ Duncan วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved