ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

วิธีการเลี้ยง และการเก็บตัวอย่างหนู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเลี้ยงหนู

ภาคผนวก ก-1 ข้อมูลทั่วไปและการจัดสภาพในงานเลี้ยงหนูแรท (สำนักสัตว์ทดลอง, 2549)

ภาพที่ ก-1 หนูแรทที่ใช้ในการทดลอง ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Rattus norvegicus*
ที่มา : สำนักสัตว์ทดลอง (2549)

ลักษณะทั่วไป

หนูแรทเป็นหนูที่มีขนาดใหญ่ หางยาวไม่มีขน ขนทั้งตัวสีขาว ตาแดง เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีวงจรการเป็นสัดสั้น และสม่ำเสมอตลอดปี ระยะตั้งท้องสั้น ให้ลูกดก จับต้องได้ง่าย และเป็นที่นิยมนำมาใช้ทดลองอย่างแพร่หลายนั้น เป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมอยู่รวมกันได้ ไม่มีการต่อสู้ทำร้ายร่างกาย แย่งตัวผู้หรือแย่งตัวเมียกัน (สำนักสัตว์ทดลอง, 2549)

ข้อมูลทางสรีรวิทยาของหนูแรท

- ระยะรอบการเป็นสัด 4 - 5 วัน
- ช่วงเป็นสัด 13 - 15 ชั่วโมง
- ระยะตั้งท้อง 20 – 22 วัน
- จำนวนลูกต่อครอก 8 – 12 ตัว
- อายุเมื่อหย่านม 19-21 วัน
- น้ำหนักตัวเมื่อหย่านม (ตัวผู้และตัวเมีย) 45– 70 กรัม
- น้ำหนักตัวเมื่อ โตเต็มวัย
  ตัวผู้ 300 – 350 กรัม
  ตัวเมีย 200 – 250 กรัม
- อายุเมื่อพร้อมผสมพันธุ์ (ตัวผู้และตัวเมีย) 8 – 10 สัปดาห์
- อายุยืน 3 – 4 ปี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

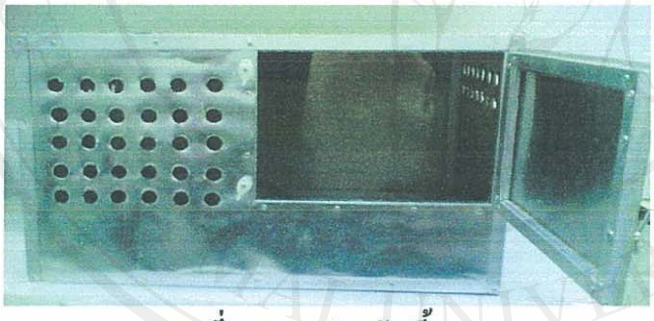
การสังเกตสุขภาพสัตว์

การสังเกตสุขภาพสัตว์เบื้องต้นจะสังเกตโดยการสุ่มตรวจในกรณีที่มีหนูในห้องจำนวนมาก และทำการสังเกตในขณะที่มีการปฏิบัติงานเช่น ขณะทำการเปลี่ยนกรง ให้น้ำ อาหาร โดยการสังเกตการเคลื่อนไหว การหายใจ ระบบสืบพันธุ์ เต้านม หู ตา จมูก ขน ปาก การกินน้ำ อาหาร เป็นต้น (สำนักสัตว์ทดลอง, 2549)

วัสดุอุปกรณ์และสภาพแวดล้อมที่ใช้ในงานเลี้ยง

- กรง

ขนาดของพื้นที่และส่วนสูงที่ไม่เพียงพอของกรงมีส่วนสร้างความกดดัน และความเครียดกับหนู กรงที่มีขนาดเล็กส่วนสูงเตี้ยเกินกว่าที่หนูจะยืนได้ และพื้นกรงไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุที่สร้างความกดดันแก่หนูได้ทั้งสิ้นกรงที่ใช้ในการทดลองเป็นกรงอะลูมิเนียมขนาด กว้าง×ยาว ×สูง เท่ากับ 40×60×45 เซนติเมตร



ภาพที่ ก-2 กรงสำหรับเลี้ยงหนู

- วัสดุรองนอน

ใช้ขี้กบเป็นวัสดุจากโรงไม้นิยมใช้เป็นวัสดุรองนอนกันทั่วโลก เนื่องจากซึมซับน้ำได้ดี และไม่ยุ่ย ขี้กบควรมาจากไม้เนื้ออ่อน ถ้ามาจากไม้เนื้อแข็งมักมีเหลี่ยม มีมุมแข็งและแหลมคม และมียางเป็นอันตรายต่อสัตว์ได้ในการทดทองใช้วัสดุรองเป็นไม้เนื้ออ่อนโดยทำการเปลี่ยนทุก ๆ 4 วัน เพื่อไม่ให้เป็นการสะสมกลิ่นและเชื้อโรค

- อาหาร

หนูแรทต้องการอาหารประมาณ 20 – 30 กรัมต่อตัวต่อวัน อาหารเป็นอาหารอัดเม็ด เป็นวิวัฒนาการมาจากอาหารป่น โดยพ่นไอน้ำเข้าไปคลุกอาหารป่น ผสมตามสูตรโดยมีปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารอาหารดังตารางที่ ก-1 ก่อนเข้าเครื่องอัดเม็ดหรือปั้นเป็นก้อนให้ได้ขนาดที่ต้องการ เม็ดไม่แข็งเกินไป โดยการให้อาหารในการทดลองนั้นเป็นการให้แบบ เต็มที่ตลอดวัน (ad libitum)

ตารางที่ ก-1 ปริมาณสารอาหารในอาหารสูตร082 สำหรับหนูแรท

สารอาหาร	ปริมาณ	สารอาหาร	ปริมาณ
โปรตีน (ร้อยละ)	24	วิตามิน เอ (IU/กิโลกรัม)	20,000
ไขมัน (ร้อยละ)	4.5	วิตามิน ดี (IU/กิโลกรัม)	4,000
เส้นใยอาหาร (ร้อยละ)	5	วิตามิน ซี (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	100
แคลเซียม (ร้อยละ)	1	วิตามิน เค (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	5
ฟอสฟอรัส (ร้อยละ)	0.9	วิตามิน บี 1 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	20
โซเดียม (ร้อยละ)	0.2	วิตามิน บี 2 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	20
โพแทสเซียม (ร้อยละ)	1.17	วิตามินบี 6 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	20
แมกนีเซียม (ร้อยละ)	0.23	วิตามินบี 12 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	0.036
แมงกานีส	171	ไนอาซิน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	100
ทองแดง (พีพีเอ็ม)	22	กรดโฟลิค (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	6
สังกะสี (พีพีเอ็ม)	100	ไบโอติน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	0.4
เหล็ก (พีพีเอ็ม)	180	แพนโทเทนิค (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	60
โคบอลท์ (พีพีเอ็ม)	1.82	คลอลีน คลอไรด์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	1,500
โพแทสเซียม ไอโอไดด์ (พีพีเอ็ม)	1	ความชื้น (ร้อยละ)	12
ซีลิเนียม (พีพีเอ็ม)	0.1	พลังงาน (กิโลแคลลอรี/กิโลกรัม)	3,040

- น้ำ

หนูแรทต้องการน้ำประมาณ 20 – 35 มิลลิลิตร/วัน น้ำดื่มหนูแรทต้องเป็นน้ำสะอาดโดยการให้น้ำในการทดลองนั้นเป็นการให้แบบ เต็มที่ตลอดวัน (ad libitum)

- อุณหภูมิ

อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการเลี้ยงหนูแรทเป็น 25±2 องศาเซลเซียส ความต่างไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่สัตว์สามารถปรับตัวได้ เมื่ออุณหภูมิสูงจะทำให้สัตว์เบื่ออาหาร กินน้ำมาก ไม่ผสมพันธุ์ หงุดหงิด ไม่เลี้ยงลูก กัดลูก เหนื่อย หอบ เลียตัวเอง เมื่ออุณหภูมิต่ำ มีปัญหาคือ กินอาหารมาก กินน้ำน้อย นอน ไม่ผสมพันธุ์ และไม่เลี้ยงลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ความชื้นสัมพัทธ์

คือปริมาณไอน้ำในอากาศวัดค่าเป็นร้อยละ ความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อการระเหยของน้ำและการเจริญเติบโตของเชื้อโรค เชื้อรา ความชื้นสัมพัทธ์ในห้องเลี้ยงหนูแรทเป็นร้อยละ 60-90 ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำจะทำให้หนูแรทเป็นโรคหางขวั้น

- การถ่ายเทอากาศ

การถ่ายเทเอาอากาศใหม่เข้ามาแทนอากาศเก่า เป็นการถ่ายเอาออกซิเจนเข้ามาแทนคาร์บอนไดออกไซด์ในห้อง เป็นการถ่ายเอาอากาศสะอาดเข้ามาแทนอากาศที่มีกลิ่นในห้อง และเป็นการถ่ายเอาอากาศแห้งเข้ามาแทนอากาศชื้นในห้อง สามารถทำได้โดยการติดตั้งพัดลมดูดอากาศออก และเข้า

- แสง

วัดค่าแสงเป็นลักซ์ (ลุกซ์) แสงมีมีความสำคัญต่อวงจรการเป็นสัด หนูแรทมีความต้องการแสง 350 – 400 ลักซ์ นาน ไม่น้อยกว่า 10 ชั่วโมงแต่ที่นิยมใช้คือมีอัตราส่วนของ 12 ชั่วโมงมืดและ 12 ชั่วโมงสว่างในการทดลอง เวลาให้แสงคือตั้งแต่ 8.00-20.00 นาฬิกา

- เสียง

วัดค่าเป็น เดซิเบล ความถี่วัดเป็น เฮิสซ์ (ทุ่มถี่น้อย แหลมถี่มาก) เสียงเป็นอันตรายที่เกิดกับสัตว์ได้ ตกใจ เครียด ไม่สืบพันธุ์ พฤติกรรมเปลี่ยนไป ไม่เลี้ยงลูก ปกติหนูรับเสียงได้ 50 เดซิเบล

ภาคผนวก ก-2 การจับหนู

วิธีทำ

การจับหนูแรทสามารถจับได้ด้วยมือเปล่าแต่ควรปฏิบัติกับหนูที่อยู่ลำพังเพียงตัวเดียวหรือหนูที่ไม่ตื่นตระหนกมากนัก แต่ถ้าหนูที่อยู่รวมกันหลายตัวจะตื่นตกใจได้ง่าย การจับด้วยมือเปล่าจึงค่อนข้างเสี่ยงอันตรายจากการกัดของหนูดังนั้นจึงควรใช้ถุงมือที่ค่อนข้างหนาจะสะดวกกว่า โดยปฏิบัติดังต่อไปนี้ (ปานเทพ, 2535)

1. พยายามต้อนหนูเข้ามุมกรงหรือติดฝาผนังด้านใดด้านหนึ่งโดยกระทำอย่างนุ่มนวลอย่าให้แตกตื่นหรือตกใจ
2. ใช้มือข้างที่จะใช้จับค่อย ๆ สัมผัสตัวหนูเบา ๆ ให้หนูรู้ตัวก่อน แล้วจึงลูบเบา ๆ โดยเลื่อนมือขึ้นไปจับตามตัวจนถึงบริเวณคอและไหล่
3. ใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้รัดรอบคอ โดยอุ้งมืออยู่ที่ส่วนหลังและใช้นิ้วโอบรัดรอบทรวงอกบริเวณใต้ขาหน้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. นิ้วหัวแม่มือจะเป็นตัวกดขากรรไกรหนูไว้ไม่ให้อ้าออกและก้มลงมากัด ถ้าหนูดิ้นมากอาจใช้อีกมืออีกข้างดึงโคนหางให้ตึง หนูจะอยู่กับที่ได้

ภาคผนวก ก-3 วิธีการให้โยเกิร์ต

วิธีทำ

การให้โยเกิร์ตในหนูนั้นทำการทำให้ในช่วงเย็นโดยปฏิบัติดังนี้ (ปานเทพ, 2535)

1. นำโยเกิร์ตที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นมาปั่นด้วยเครื่องปั่นด้วยความเร็วสูงสุดเป็นระยะเวลา 30 วินาที จะได้โยเกิร์ตที่มีลักษณะเหลว
2. ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร สูบโยเกิร์ตขึ้นมาจนครบ 5 มิลลิลิตร
3. ป้อนโยเกิร์ตให้หนูโดยค่อย ๆ ดันกระบอกสูบจนครบปริมาตร
4. ทำการให้โยเกิร์ตหนู จนได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน

ภาคผนวก ก-4 อาหารไขมันสูง

ส่วนประกอบ

อาหาร 082 สำหรับหนูแรท (สำนักสัตว์ทดลอง, ประเทศไทย)	900 กรัม
เนย	100 กรัม

วิธีทำ

ละลายเนยด้วยความร้อนในหม้อต้มจากนั้นใส่อาหารหนูปกติที่ปั้นเป็นก้อนแล้วลงไปผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันทิ้งไว้ให้อาหารเย็นที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสในตู้เย็น

ภาพที่ ก-3 อาหารปกติ (ซ้าย) และอาหารไขมันสูง (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก-5 การทำเครื่องหมายระบุหนู

วิธีทำ

ในการทำการทดลอง การทำเครื่องหมายระบุตัวสัตว์ทดลองทำเพื่อป้องกันความซ้ำซ้อนและสับสนในการทดสอบ โดยต้องกระทำได้สะดวก รวดเร็ว รบกวนสัตว์ให้น้อยที่สุด โดยทำการเขียนด้วยสีโดยการจับหนูด้วยถุงมือ ทำการตรึงหางหนูแล้วใช้ปากกาทำตำหนิโดยการเขียนตัวอักษรลงบนหางหนู จากนั้นรอจนสีแห้ง (ปานเทพ, 2535)

ภาคผนวก ก-6 การเก็บตัวอย่างมูลหนู

วิธีทำ

ทำการเก็บมูลหนูโดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นชุบด้วยแอลกอฮอล์ป้ายที่ปลายก้นของหนูเพื่อทำการฆ่าเชื้อแล้วต่อด้วยใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำเย็นป้ายที่ปลายก้นเพื่อกระตุ้นให้หนูถ่ายมูล จากนั้นทำการรองมูลหนูด้วยถุงพลาสติคที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ภาพ ก-4 ตัวอย่างมูลของหนูในกลุ่มควบคุมบวก (P) กลุ่มทดลอง (E) และกลุ่มควบคุมลบ (N)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

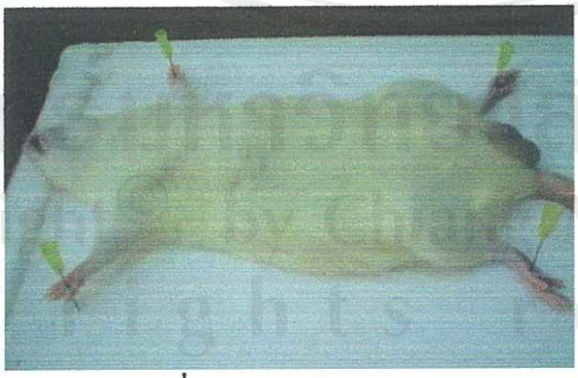
ภาคผนวก ก-7 การเก็บตัวอย่างเลือด และอวัยวะภายในของหนู

วิธีทำ

1. ใช้สำลีชุบ คลอโรฟอร์มวางในขวดโหลที่มีฝา ซึ่งสามารถป้องกันการระเหยของคลอโรฟอร์มออกมาภายนอก จากนั้นนำตะแกรงตาข่ายวางวางเหนือสำลีที่ก้นขวดเพื่อป้องกันตัวสัตว์แตะกับน้ำยา จับหนูแรทลงในภาชนะดังกล่าวคราวละ 1 ตัว หนูแรทจะแดงอาการปีนป่ายขวดใช้จมูกสูดดมสักพักแล้วนิ่งยืนขึ้นใช้ขาหน้าทั้งสองเกาและขยี้บริเวณจมูกกับปาก โดยมีอาการหายใจเร็วขึ้นหนูแรทจะสลบทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณคลอโรฟอร์มที่ใช้ว่ามากน้อยเพียงใด (ปานเทพ, 2535) ดังแสดงในภาพที่ ก-5

ภาพที่ ก-5 การวางยาสลบหนูทดลองในโถสลบ

2. หลังจากนั้นจับสัตว์นอนหงายบนโต๊ะตรึงตัวหนูให้แน่นโดยใช้เข็มเบอร์ 21 ตรึงเท้าทั้ง 4 ข้างของสัตว์ทดลองดังแสดงใน ภาพที่ ก-6



ภาพที่ ก-6 การตรึงหนูทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. จากนั้นใช้มีดกรีดเปิดหนังแล้วใช้ปากคีบจับหนังบริเวณแนวกึ่งกลางตัวแล้วถลกหนังไปทางซ้ายและขวาทำการตรึงด้วยเข็มเบอร์ 21 ใช้กรรไกรตัดบริเวณกระดูกซี่โครงทั้ง 2 ข้างแล้วพลิกขึ้นไปทางด้านหน้าจะเห็นหัวใจอยู่ในช่องอกดังแสดงในภาพที่ ก-7

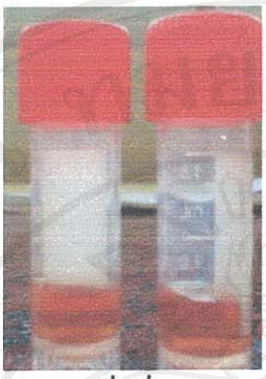
ภาพที่ ก-7 การผ่าเปิดช่องอกของหนูทดลอง

4. ใช้แทงเข็มลงไปที่หัวใจห้องล่างซ้าย พร้อมกับเริ่มดูดเลือดอย่างช้า ๆ เมื่อแทงเข้าห้องหัวใจจะมีเลือดเข้ามาในกระบอกฉีดยาให้เห็นค่อยๆสูบเลือดจนได้ปริมาณที่ต้องการ ในภาพที่ ก-8

ภาพที่ ก-8 การเจาะเลือดจากหัวใจของหนู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. นำไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือดกับซีรั่ม ดูดแยกซีรั่มจะได้ตัวอย่างดังภาพที่ ก-9

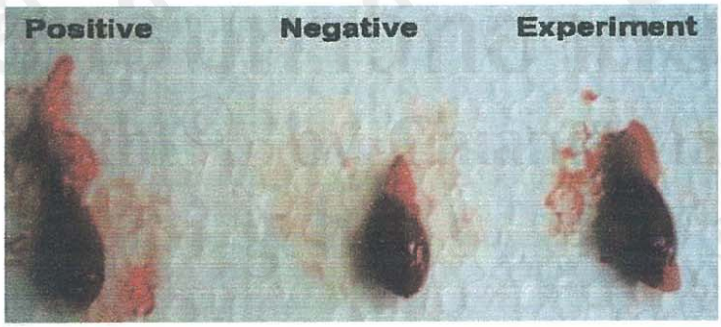


ภาพที่ ก-9 ตัวอย่างซีรั่มที่ได้รับการปั่นแยกแล้ว

6. ทำการแยกลำไส้เล็กดังภาพที่ ก-10 ใส่ในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการเพาะเชื้อ

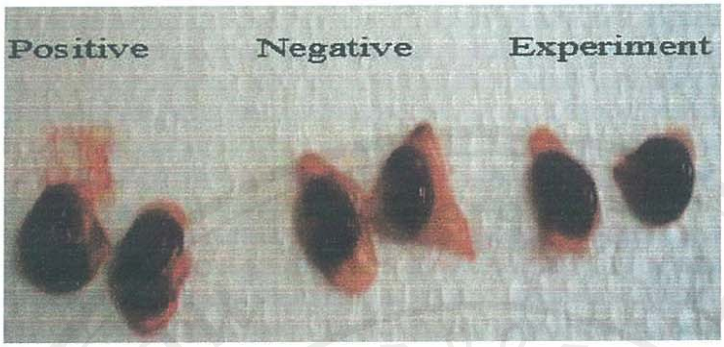
ภาพที่ ก-10 การเก็บตัวอย่างลำไส้

7. ทำแยกหัวใจ (ภาพที่ ก-11) ไต (ภาพที่ ก-12) ตับ (ภาพที่ ก-13) และม้าม (ภาพที่ ก-14) ชั่งน้ำหนัก

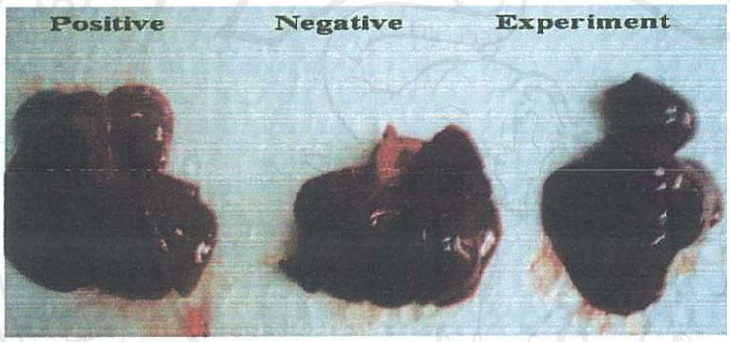


ภาพที่ ก-11 ตัวอย่างหัวใจของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มทดลอง เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา

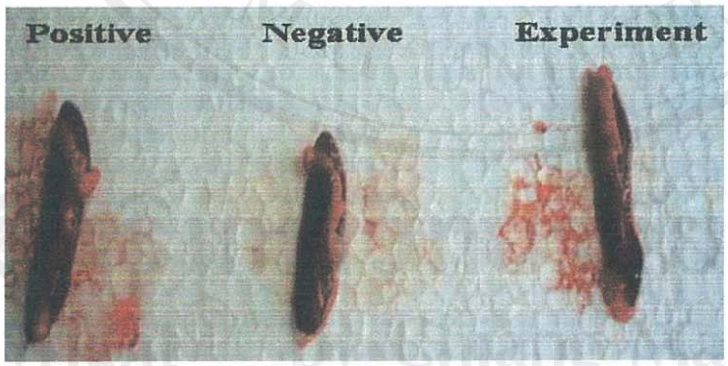
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ก-12 ตัวอย่างไตของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มทดลอง เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา



ภาพที่ ก-13 ตัวอย่างตับของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มทดลอง เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา



ภาพที่ ก-14 ตัวอย่างม้ามของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมบวก กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มทดลอง เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ช

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในกระแสเลือด

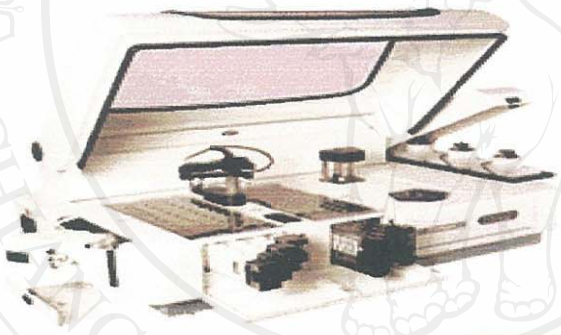
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเลือด

ภาคผนวก ข-1 การวิเคราะห์คอเลสเตอรอลรวม (วิสุทธิ์ กังวานตระกูล และ ลิ่มทอง วีรชาติยานุกูล, 2545)

เครื่องมือและน้ำยา

1. เครื่องมือวิเคราะห์ Liasys (AMS Srl, Italy) (ภาพที่ ข-1)
2. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tubes) ขนาด 15 มิลลิลิตร
3. หลอดตัวอย่าง (sample cup)
4. เครื่องปั่นแยกซีรั่ม
5. ชุดน้ำยาวิเคราะห์คอเลสเตอรอล (Humandiagnostics Germany)



ภาพที่ ข-1 เครื่องวิเคราะห์เคมีคลินิค Liasys

หลักการ (Principle)

$$\text{Cholesterolester} + H_2O \xrightarrow{\text{Chol esterase}} \text{Cholesterol} + \text{Fatty acid}$$

$$\text{Cholesterol} + \tfrac{1}{2}O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Chol oxidase}} \text{Cholestenone} + H_2O$$

$$2H_2O + \text{4-Aminoantipyrine} + \text{Phenol} \longrightarrow \text{Quinoneimine} + 4H_2O$$

วิธีทำ

1. นำซีรั่มที่ปั่นแยกได้มาใส่ในหลอดตัวอย่าง
2. ใช้เมาท์กดที่ routine เลือก worklist เลือกแร็คที่ต้องการแล้วเลือกตำแหน่ง sample cup ใส่ข้อมูลของตัวอย่างที่ต้องการตรวจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เลือกการ test ตรวจคอเลสเตอรอล โดยใช้เมาท์คลิ๊ก แล้วคลิ๊ก
4. ใช้เมาท์ คลิ๊กที่จอภาพ (monitor) แล้วคลิ๊กที่ปุ่ม start จากนั้นเลือก work list ใช้เม้าท์คลิ๊ก เลือกแร็คให้ตรงกับตำแหน่งที่วางให้ตรงกัน
5. คลิ๊ก OK เครื่องจะทำงานทันทีโดยเครื่องจะทำการตรวจวัดและรายงานผลของคอเลสเตอรอลได้ ในหน่วย มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ทางเครื่องพิมพ์

สารควบคุมคุณภาพ

Control serum ชนิดค่าปรกติ Serodos N ผลิตภัณฑ์ บริษัท Humandiagnostics, Germany
Control serum ชนิดค่าสูง Serodos P ผลิตภัณฑ์ บริษัท Humandiagnostics, Germany

ระบบควบคุมคุณภาพ

ผลการตรวจวิเคราะห์ control serum อยู่ภายใต้ขอบเขตสูงต่ำ ของ control serum ทั้งสองชนิด ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกินร้อยละ1.3 ช่วงวิเคราะห์ 0.0-750 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ภาคผนวก ข-2 การวิเคราะห์ เอชดีแอลคอเลสเตอรอล (วิสุทธิ์ กังวานตระกูล และ ลิ่มทอง วีรชาติยานุกูล, 2545)

เครื่องมือและน้ำยา

1. เครื่องมือวิเคราะห์ Liasys (AMS Srl, Italy)
2. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tubes) ขนาด 15 มิลลิลิตร
3. หลอดตัวอย่าง (sample cup)
4. เครื่องปั่นแยกซีรั่ม
5. ชุดน้ำยาวิเคราะห์เอชดีแอล-คอเลสเตอรอล (Humandiagnostics, Germany)

หลักการ

เป็นการใช้ Anti-Human-lipoprotein ไปจับกับ VLDL และ chylomicron ทำให้เหลือแค่ HDL ที่สามารถทำปฏิกิริยากั คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส และ คอเลสเตอรอลออกซิเดส ได้สีผสมน้ำเงิน ซึ่งความเข้มข้นของสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ เอชดีแอลคอเลสเตอรอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทำ

1. นำซีรั่มที่ปั่นแยกได้มาใส่ใน sample cup
2. ใช้เมาท์กดที่ routine เลือก worklist เลือกแร็คที่ต้องการแล้วเลือกตำแหน่ง sample cup ใส่ข้อมูลของตัวอย่างที่ต้องการตรวจ
3. เลือกการ test เอชดีแอลคอเลสเตอรอลโดยใช้เมาท์คลิ๊ก แล้วคลิ๊ก
4. ใช้เมาท์คลิ๊กที่จอภาพแล้วคลิ๊กที่ปุ่ม start จากนั้นเลือก work list ใช้เม้าท์คลิ๊กเลือกแร็คให้ตรงกับตำแหน่งที่วางให้ตรงกัน
5. คลิ๊ก OK เครื่องจะทำงานทันทีโดยเครื่องจะทำการตรวจวัดและรายงานผลของเอชดีแอลคอเลสเตอรอลได้ในหน่วย มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ทางเครื่องพิมพ์

สารควบคุมคุณภาพ

Calibrator HDL-Cholesterol

ระบบควบคุมคุณภาพ

วัดได้สูงสุด 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หากสูงเกินให้เจือจางด้วยน้ำเกลือชนิดร้อยละ 0.9 (normal saline) อัตราส่วน 1:1 ทำซ้ำอีกครั้งผลที่ได้คูณ 2

ภาคผนวก ข-3 การวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (วิสุทธิ์ กังวานตระกูล และ ลิ่มทอง วีรชาติยานุกูล, 2545)

เครื่องมือและน้ำยา

1. เครื่องมือวิเคราะห์ Liasys (AMS Srl, Italy)
2. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tubes) ขนาด 15 มิลลิลิตร
3. หลอดตัวอย่าง (sample cup)
4. เครื่องปั่นแยกซีรั่ม
5. ชุดน้ำยาวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Humandiagnostics, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักการ

$$\text{Triglyceride} + H_2O \xrightarrow{\text{lipase}} \text{Glycerol} + \text{Fatty acids}$$

$$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{glycerolkinase}} \text{Glycerol-3-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerol-3-P} + O_2 \xrightarrow{\text{G-3-P-oxidase}} \text{Dihydroxyacetone-P} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-Aminoantipyrine} + \text{4-Chlorophenol} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{Quinoneimine} + 4H_2O$$

วิธีทำ

1. นำซีรั่มที่ปั่นแยกได้มาใส่ใน sample cup
2. ใช้เมาท์กดที่ routine เลือก worklist เลือกแร็คที่ต้องการแล้วเลือกตำแหน่ง sample cup ใส่ข้อมูลของตัวอย่างที่ต้องการตรวจ
3. เลือกการ test ไตรกลีเซอไรด์โดยใช้เมาท์คลิ๊ก แล้วคลิ๊ก
4. ใช้เมาท์ คลิ๊กที่จอภาพแล้วคลิ๊กที่ปุ่ม start จากนั้นเลือก work list ใช้เม้าท์คลิ๊กเลือกแร็คให้ตรงกับตำแหน่งที่วางให้ตรงกัน
5. คลิ๊ก OK เครื่องจะทำงานทันทีโดยเครื่องจะทำการตรวจวัดและรายงานผลของไตรกลีเซอไรด์ได้ในหน่วย มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ทางเครื่องพิมพ์

หมายเหตุ

ค่าสูงเกิน 1000 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ต้องเจือจางซีรั่ม หรือพลาสม่า อัตราส่วน 4:1 ด้วยน้ำเกลือชนิดร้อยละ 0.9 (normal saline) ทำซ้ำ ผลที่ได้คูณด้วย 5

ภาคผนวก ข-4 การคำนวณ แอลดีแอลคอเลสเตอรอล

ในการคำนวณหาปริมาณของแอลดีแอลคอเลสเตอรอลใช้สมการมาตรฐานของ Friedewald (standard friedewald equation) (Friedewald, 1972)

แอลดีแอลคอเลสเตอรอล = คอเลสเตอรอลรวม- เอชดีแอลคอเลสเตอรอล - 0.2ไตรกลีเซอไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางเคมี และทางจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

ภาคผนวก ค-1 สารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่างและวิธีเตรียม

สารละลายสำหรับเจือจาง (Vinderola and Reinheimer, 2000)

สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (peptone water, Merck, Germany)

วิธีเตรียม

ชั่ง peptone water 1 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เตรียมในขวด duran ขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาตรขวดละ 90 มิลลิลิตร และใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อปริมาณหลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ค-2 วิธีการเตรียมตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการหาปริมาณ *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. และ Enterobacteriaceae (Vinderola and Reinheimer, 1999)

ตัวอย่างลำไส้

1. หลังทำการเจาะเลือดทำการแยกลำไส้เล็กใส่ลงในถุงพลาสติคที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้กรรไกร ผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดสำไส้เล็กเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในถุงพลาสติกบนเครื่องชั่ง ชั่งจนได้น้ำหนัก 10 กรัม เติมสารละลายเจือจางปริมาณ 90 มิลลิลิตร ตีผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomucher เป็นเวลา 5 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่ เจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:100 (10^{-2})
3. เจือจางตัวอย่างอาหารจนได้ความเจือจาง 1:1,000,000,000 (10^{-9})

ตัวอย่างโยเกิร์ต

1. ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อ ตักตัวอย่างโยเกิร์ตใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร บนเครื่องชั่ง ชั่งจนได้น้ำหนัก 10 กรัม เขย่าขวดขึ้นลงอย่างแรง ระยะการเขย่า 60 เซนติเมตร 20 ครั้ง จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:100 (10^{-2})
3. เจือจางตัวอย่างอาหารจนได้ความเจือจาง 1:1,000,000,000 (10^{-9}).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่างมูลหนูทดลอง

1. ทำการเก็บมูลหนูทดลองโดยใช้ไม้พันสำลีที่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชุบด้วยแอลกอฮอล์ป้ายที่ปลายก้นของหนูทดลอง แล้วใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำเย็นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช่นกันเดียวป้ายที่ปลายก้นของหนูทดลอง ทำการรองมูลหนูด้วยถุงพลาสติคที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักเติมสารละลายเปปโตนลงไปในอัตราส่วน 1:100 (10^{-2}) น้ำหนักต่อปริมาตร ตีผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomacher เป็นเวลา 5 นาที
2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:100 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:1,000 (10^{-3})
3. เจือจางตัวอย่างอาหารจนได้ความเจือจาง 1:1,000,000,000 (10^{-9})

ภาคผนวก ค-3 การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Bifidobacterium* spp. (Vinderola and Reinheimer, 1999)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LP-MRS agar มีดังนี้

1. MRS broth (Himedia, India)
2. ผงวุ้น
3. ลิเทียมคลอไรด์ (Lithium choride, Fisher Scientific, England)
4. กรดโพรพิโอนิค (Propionic acid, Fluka, Germany)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 55.15 กรัม และ ผงวุ้น15 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาณ1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด เติมลิเทียมคลอไรด์ 0.3 กรัม และ กรดโพรพิโอนิค 0.2 กรัม นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์

1. การเพาะเชื้อตัวอย่างอาหาร
   1.1 ใช้ปิเปตขนาด 0.1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่เจือจางที่ 10^{-3}-10^{-8} ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละ 2 จาน
   1.2 ทำการ spread plate สารละลายให้ทั่วจาน ทิ้งไว้จนหน้าวุ้นแห้ง คว่ำจานเพาะเชื้อ
2. การบ่มเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำจานเพาะเชื้อใส่ลงใน anaerobic jar ใส่สารจับออกซิเจนลงไป แล้วปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. การนับโคโลนีและการรายงานผล

หลังจากบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากจำนวนโคโลนีในการทำซ้ำ รายงานผลการตรวจนับเป็นจำนวนเชื้อเริ่มต้นในรูปของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (CFU/g) หรือล็อกของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (log CFU/g)

ภาคผนวก ค-4 การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Shamala *et al.*, 2000)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร
3. ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
4. เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 กรัม
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar มีดังนี้

1. MRS broth
2. ผงวุ้น

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 55.15 กรัม และ ผงวุ้น 15 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์

1. การเพาะเชื้อตัวอย่างอาหาร
   1.1 ใช้ปิเปตขนาด 0.1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่เจือจางที่ 10^{-3}-10^{-8} ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละ 2 จาน
   1.2 ทำการ spread plate สารละลายให้ทั่วจาน ทิ้งไว้จนหน้าวุ้นแห้ง คว่ำจานเพาะเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การบ่มเชื้อ

นำจานเพาะเชื้อบ่มในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. การนับโคโลนีและการรายงานผล

หลังบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากจำนวนโคโลนีในการทำซ้ำ รายงานผลการตรวจนับเป็นจำนวนเชื้อเริ่มต้นในรูปของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (CFU/g) หรือ ล็อกของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (log CFU/g)

ภาคผนวก ค-5 การตรวจหาปริมาณเชื้อ Enterobacteriaceae (Montesi, 2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2 หลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร
3 ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
4 เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 กรัม
5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส
6 ตู้บ่มเพาะเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Merck, Germany) ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.1±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์

1. การเพาะเชื้อตัวอย่างอาหาร

1.1 ใช้ปิเปตขนาด 0.1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารที่เจือจางที่ 10^{-3}-10^{-8} ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละ 2 จาน

1.2 ทำการ spread plate สารละลายให้ทั่วจาน ทิ้งไว้จนหน้าวุ้นแห้ง คว่ำจานเพาะเชื้อ

2. การบ่มเชื้อ

นำจานเพาะเชื้อบ่มในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การนับโคโลนีและการรายงานผล

หลังบ่มเชื้อตามกำหนดเวลาแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนีหาค่าเฉลี่ยจากจำนวนโคโลนีในการทำซ้ำ รายงานผลการตรวจนับเป็นจำนวนเชื้อเริ่มต้นในรูปของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (CFU/g) หรือ ล็อกของจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (log CFU/g)

ภาคผนวก ค-6 การย้อมสีแกรม (gram's stain) (เรณู ปิ่นทอง, 2537)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ห่วงถ่ายเชื้อ
2. แผ่นสไลด์
3. สารละลาย crystal violet
4. สารละลาย gram's iodine
5. สารละลาย ethanol ร้อยละ 95
6. สารละลาย safranino carbon fuchsin
7. กล้องจุลทรรศน์

วิธีทำ

1. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะน้ำสะอาดลงบนแผ่นสไลด์ จำนวน 1 ห่วง
2. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อลงบนหยดน้ำบนสไลด์ เกลี่ยให้กระจาย
3. ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ ประมาณ 1 วินาที
4. หยดสารละลาย crystal violet ลงให้ท่วมรอยที่เกลี่ยทิ้งไว้นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งล้างด้วยน้ำสะอาด
5. หยดสารละลาย gram's iodine ลงให้ท่วมรอยที่เกลี่ยทิ้งไว้นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งล้างด้วยน้ำสะอาด
6. ล้างสารละลาย ethanol ร้อยละ 95 อย่างรวดเร็ว จนไม่มีสีน้ำเงินของสารละลาย crystal violet ออกมาแต่ต้องไม่เกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด
7. หยดสารละลาย safranino carbon fuchsin ลงให้ท่วมรอยที่เกลี่ยทิ้งไว้นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งล้างด้วยน้ำสะอาด ซับให้แห้ง

นำไปตรวจลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่ติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์บันทึกลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างลักษณะของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค-7 การตรวจหาปริมาณเชื้อ คอลิฟอร์ม (อิสรา วัฒนนภาเกษม, 2546)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร
4. ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
5. เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 กรัม
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส
7. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส
8. หลอดดักแก๊ส

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายผงอาหาร lauryl tryptose broth ลงในน้ำกลั่น ปิเปตอาหารลงในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซลงไป นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อ ตักตัวอย่างโยเกิร์ตใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร บนเครื่องชั่ง ชั่งจนได้น้ำหนัก 10 กรัม เขย่าขวดขึ้นลงอย่างแรง ระยะการเขย่า 60 เซนติเมตร 20 ครั้ง จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตรใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารที่เจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:100 (10^{-2}) เจือจางตัวอย่างอาหารจนได้ความเจือจาง 1:1,000 (10^{-3})

2. การใส่ตัวอย่างอาหาร

ปิเปตตัวอย่างอาหารความเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ10^{-3} ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดอาหารที่มี Lauryl tryptose broth หลอดละ 9 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 3 หลอด รวมเป็น 9 หลอด

3. การบ่มเชื้อ

บ่มหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่างอาหารแล้วในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

4. การตรวจนับและการรายงานผล

หลังจากบ่มเชื้อตามที่กำหนดแล้ว ตรวจนับจำนวนหลอดทดลองที่มีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สแล้วเทียบตามตารางที่ ค-1 รายงานผลเป็น MPN/กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การยืนยันผล

นำอาหารในหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นหลอดละ 1 ลูป เพาะลงในอาหารที่มี Brilliant green lactose bile broth แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สแสดงว่าเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

ตารางที่ ค-1 แมคคราริตีที่ 1

Number of positivetube			MPN/g.
			3 tube method
0	0	0	<3
0	0	1	<3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6
0	1	2	9
0	1	3	12
0	2	0	6
0	2	1	9
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	4
1	0	1	7
1	0	2	11
1	0	3	15
1	1	0	7
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	19
1	2	0	11
1	2	1	15
1	2	2	20
1	2	3	24
1	3	0	16
1	3	1	20
1	3	2	24
1	3	3	29

Number of positive tube			MPN/g.
			3 tube method
2	0	0	9
2	0	1	14
2	0	2	20
2	0	3	26
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	1	3	34
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	2	3	42
2	3	0	29
2	3	1	36
2	3	2	44
2	3	3	53
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>2400

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค-8 การตรวจหายีสต์และรา (อิสรา วัฒนนภาเกษม, 2546)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลองขนาด 15 x 160 มิลลิเมตร
3. ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร
4. เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 กรัม
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลายสำหรับเจือจางและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลายสำหรับเจือจาง สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (NaCl, Merck, Germany) (มอก. 335/1-2523)
2. Yeast extract glucose chloramphenical agar (Difco, USA)

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อ ตักตัวอย่างโยเกิร์ตใส่ในขวดที่มีสารละลายเจือจาง 90 มิลลิลิตร บนเครื่องชั่ง ชั่งจนได้น้ำหนัก 10 กรัม เขย่าขวดขึ้นลงอย่างแรง ระยะการเขย่า 60 เซนติเมตร 20 ครั้ง จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)

2. การใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
   - 2.1 ใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของตัวอย่างอาหารลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน
   - 2.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างอาหาร จานละ 15-20 มิลลิลิตร
   - 2.3 ผสมตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว
3. การบ่มเชื้อ

บ่มจานเพาะเชื้อที่ 25 ±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4. การตรวจนับโคโลนีและการรายงานผล

หลังบ่มอาหารตามกำหนดระยะเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10-150 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจากโคโลนีในการทำซ้ำ รายงานการตรวจนับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นจำนวนเชื้อเริ่มต้นในรูปโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (log CFU/g) ถ้ามีหลายความเจือจางใช้สูตรความเจือจางดังนี้

$$\text{ปริมาณยีสต์และราต่อตัวอย่าง 1 กรัม} = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2)\, d}$$

ΣC คือ ผลรวมของโคโลนีที่นับได้บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนีทั้งหมด

n_1 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

n_2 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางที่สองที่สามารถนับได้

d คือ ความเจือจางแรกที่สามารถนับได้ที่ความเจือจาง 10^{-1} d เท่ากับ 10^{-1}

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ภาคผนวก ค-9 การวิเคราะห์หาความเป็นกรด-ด่าง (AOAC, 1998)

ชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดกับน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่องบดผสมอาหาร ("National", Model MXT31GN) นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ("Orion", Model 520A) ซึ่งได้มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มี pH เท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับแล้ว

ภาคผนวก ค-9 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ก่อนและหลังอินเวอร์ชันตามวิธีของ Lane and Eynon ใน AOAC (1998)

สารเคมี

- สารละลาย Fehling no. 1
  ละลายคอปเปอร์ซัลเฟทเพนทาไฮเดรต (Copper sulfate pentahydrate : $CuSO_4 .5H_2O$) จำนวน 34.639กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร
- สารละลาย Fehling no. 2
  ละลายโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท (Sodium potassium tartrate หรือ Rochelle salt : $KNaC_4O_5.4H_2O$) จำนวน 173 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร โดยขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลาย Carrez I

  ละลาย Zinc acetate dehydrate 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร
- สารละลาย Carrez II

  ละลายโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
- สารละลายเมธิลีนบลูเข้มข้นร้อยละ 1

  ละลายเมธิลีนบลู 1 กรัมด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน (D_1)

เตรียมตัวอย่างโยเกิร์ตข้าวกล้องโดยชั่งตัวอย่างโยเกิร์ต 42 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Clearing agent หรือ สารละลาย Carrez I และ Carrez II อย่างละ 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันดีตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที แล้วกรอง เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน

Preliminary titration

นำสารละลายตัวอย่างโยเกิร์ตข้าวกล้องที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร (ชนิดปลายงอ) ไล่ฟองอากาศให้หมด ปิเปตสารละลาย Fehling reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Fehling no. 1 และ Fehling no. 2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใส่ลูกแล้วขนาดเล็กลงไป 2-3 เม็ด นำไปต้มให้เดือดบนตะเกียงบุนเซน ไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมธิลีนบลูลงไป 1-2 หยดไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมดเหลือแต่ตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

Accurate titration

ปิเปตสารละลาย Fehling reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Fehling no. 1 และ Fehling no. 2 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ในพลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ใส่ลูกแล้วขนาดเล็กลงไป 2-3 เม็ด เติมสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ไตเตรทครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนานสองนาที หยดสารละลายเมธิลีนบลูลงไป 1-2 หยดแล้วไตเตรทจนสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟ้าหายไปหมด โดยต้องไตรเตรทให้เสร็จภายในเวลา 3 นาที ตั้งแต่เริ่มเดือด จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์หลังอินเวอร์ชัน (D_2)

นำสารละลายน้ำตาลที่เหลือจากการไตเตรทหาน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชันปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 6.34 นอร์มอล จำนวน 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนานประมาณ 10 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปรับปริมาตรส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมล่าร์ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปริมาตร แล้วทำการไตเตรทเช่นเดียว กับการหาน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชั่น

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

น้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ) = น้ำตาลรีดิวซ์หลังอินเวอร์ชัน (D_2) - น้ำตาลรีดิวซ์ก่อนอินเวอร์ชัน (D_1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(สำเนา)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

(ฉบับที่ 289) พ.ศ.2548

เรื่อง นมเปรี้ยว

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง นมเปรี้ยว

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(1)(2)(4)(5)(6)(7) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและ เสรีภาพของบุคคลซึ่งมาตรา 29 ประกอบกับมาตรา 35 มาตรา 39 มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิก

(1) ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่46 (พ.ศ.2523) เรื่องนมเปรี้ยวลงวันที่28 มกราคมพ.ศ.2523

(2) ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 99 (พ.ศ.2529) เรื่อง นมเปรี้ยว (ฉบับที่ 2) ลงวันที่12 มีนาคม พ.ศ.2529

ข้อ 2 ให้นมเปรี้ยว เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ

ข้อ 3 นมเปรี้ยว (Fermented milk) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากน้ำนมจากสัตว์ที่นำมาบริโภคได้ หรือส่วนประกอบของน้ำนมที่ผ่านการทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแล้วหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรืออันตราย ทำให้ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น และอาจปรุงแต่งกลิ่นรส สี หรือเติมวัตถุเจือปนอาหาร สารอาหารหรือส่วนประกอบอื่นที่มิใช่นมด้วยก็ได้ ทั้งนี้ให้รวมถึงนมเปรี้ยวที่นำมาผ่านการฆ่าเชื้อ การแช่เย็น หรือการทำให้แห้งด้วย

ข้อ 4 นมเปรี้ยวแบ่งตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักได้ ดังนี้

(1) โยเกิร์ต (Yoghurt) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย สเตรปโทค็อกคัส เทอร์โมฟิลัส (*Streptococcus thermophilus*) และแล็กโทบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) หรือแล็กโทบาซิลลัส ซับสปีชีส์ อื่น

(2) นมเปรี้ยวแอซิโดฟิลัส (Acidophilus Milk) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแล็กโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส (*Lactobacillus acidophilus*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) นมเปรี้ยวเคเฟอร์ (Kefir) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่แล็กโทบาซิลลัส เคฟิไร (*Lactobacillus kefiri*) หรือแล็กโทค็อกคัส (*Lactococcus*) และแอซีโทแบกเตอร์(*Acetobacter*) และไคลเวอโรไมซีส มาร์เซียนัส (*Kluyveromyces marxianus*) และแซ็กคาโรไมซีส ยูนิสปอรัส(*Saccharomyces unisporus*) หรือแซ็กคาโรไมซีส เซรีวิซิอี(*Saccharomyces cerevisiae*) หรือแซ็กคาโรไมซีสแอซิกูอัส (*Saccharomyces exiguus*)

(4) นมเปรี้ยวคูมิส (Kumys) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่แล็กโทบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส (*Lactobacillus delbrueckii*subsp. *bulgaricus*) และไคลเวอโรไมซีส มาร์เซียนัส (*Kluyveromyces marxianus*)

(5) นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดที่แตกต่างหรือนอกเหนือจากที่กำหนดไว้ใน(1)-(4) เช่น แล็กโทบาซิลลัส คาเซอิ ซับสปีชีส์ ชิโรต้า (*Lactobacillus casei* subsp. *shirota*) บิฟิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*) นมเปรี้ยวตาม (1)(2)(3) และ (4) อาจใส่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักชนิดอื่นเพิ่มเติมจากที่กำหนดได้

ข้อ 5 การเติมสารอาหารในนมเปรี้ยว ให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประกาศกำหนด โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการอาหาร

ข้อ 6 นมเปรี้ยวที่จะนำไปผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก ต้องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังต่อไปนี้

(1) พาสเจอร์ไรส์ หมายความว่า กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งจะไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์สูญเสียลักษณะที่ต้องการเมื่อผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อดังกล่าว โดยใช้อุณหภูมิและเวลาอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้

(1.1) อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า หรือ

(1.2) อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า

(2) ยูเอชทีหมายความว่า กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 100 องศาเซลเซียส ขึ้นไปและคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ตามระยะเวลาที่เพียงพอจะทำลายจุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มจำนวนเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิปกติ แล้วบรรจุในภาชนะและในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ

(3) กรรมวิธีอย่างอื่นที่มีมาตรฐานเทียบเท่ากรรมวิธีตาม (1) หรือ (2) ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการอาหาร

ข้อ 7 นมเปรี้ยวที่มิได้ปรุงแต่งต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1) มีกลิ่นรสตามลักษณะของนมเปรี้ยวนั้น

(2) มีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.7 ของน้ำหนัก สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(1)(2)(3) และ (5)

(3) มีมันเนยดังนี้

(3.1) น้อยกว่าร้อยละ 15 ของน้ำหนัก สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(1) และ (2)

(3.2) น้อยกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนัก สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(3)(4) และ (5)

(4) มีค่าความเป็นกรด โดยคำนวณเป็นกรดแลกติก ดังนี้

(4.1) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.6 ของน้ำหนัก สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(1)(2) และ (3)

(4.2) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.7 ของน้ำหนัก สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(4)

(4.3) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.3 ของน้ำหนัก สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(5)

(5) มีจุลินทรีย์ที่ใช้ในกรรมวิธีการหมักคงเหลือในนมเปรี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก 1 กรัม แล้วแต่กรณี ดังนี้

(5.1) แบคทีเรียไม่น้อยกว่า 10,000,000 โคโลนี

(5.2) ยีสต์ไม่น้อยกว่า 10,000 โคโลนี

(6) ไม่ใช้วัตถุกันเสีย

(7) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

(8) ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มน้อยกว่า 3 ต่อนมเปรี้ยว 1 กรัม โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)

(9) ตรวจพบเชื้อราได้ไม่เกิน 100 โคโลนี สำหรับนมเปรี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก 1 กรัม

(10) ตรวจพบยีสต์ไม่เกิน 100 โคโลนี สำหรับนมเปรี้ยวที่ไม่ได้ใช้ยีสต์ในการหมัก และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก 1 กรัม

(11) ตรวจพบยีสต์และเชื้อราได้ไม่เกิน10 โคโลนีสำหรับนมเปรี้ยวที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก1 กรัม

ข้อ 8 นมเปรี้ยวที่ปรุงแต่ง ต้องมีนมเป็นส่วนผสมในปริมาณไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนัก และมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังนี้

(1) กรณีไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(1)(6)(7)(8)(9) และ (10) สำหรับคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(2)(3)(4) และ (5) ให้เป็นไปตามสัดส่วนของนมที่ใช้เป็นส่วนผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) กรณีที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ7(1)(6)(7)(8) และ(11) สำหรับคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(2)(3) และ (4) ให้เป็นไปตามสัดส่วนของนมที่ใช้เป็นส่วนผสม

ข้อ 9 นมเปรี้ยวแช่แข็งเมื่อกลับคืนสภาพเดิมแล้ว (thawing) ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังนี้

(1) กรณีที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักและไม่ได้ปรุงแต่ง ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ7(1)(2)(3)(4)(6)(7)(8)(9) และ(10) และต้องมีจุลินทรีย์และยีสต์ที่ใช้ในการหมักเหลืออยู่และมีชีวิตด้วย

(2) กรณีที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักและปรุงแต่ง ต้องมีนมเป็นส่วนผสมในปริมาณไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนัก และมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(1)(6)(7)(8)(9) และ (10) และต้องมีจุลินทรีย์และยีสต์ที่ใช้ในการหมักเหลืออยู่และมีชีวิตด้วย สำหรับคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(2)(3) และ (4) ให้เป็นไปตามสัดส่วนของนมที่ใช้เป็นส่วนผสม

(3) กรณีที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักและไม่ได้ปรุงแต่ง ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ7(1)(2)(3)(4)(6)(7)(8) และ (11)

(4) กรณีที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักและปรุงแต่ง ต้องมีนมเป็นส่วนผสมในปริมาณไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของน้ำหนัก และมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(1)(6)(7)(8) และ (11) สำหรับคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(2)(3)และ (4) ให้เป็นไปตามสัดส่วนของนมที่ใช้เป็นส่วนผสมข้อ 10 นมเปรี้ยวชนิดแห่งเมื่ออยู่ในสภาพพร้อมบริโภคตามวิธีละลายเพื่อบริโภคที่ระบุไว้บนฉลากต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังนี้

(1) กรณีไม่ปรุงแต่งต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(1)(2)(3)(4)(6)(7)(8) และ (11)

(2) กรณีปรุงแต่งต้องมีนมเป็นส่วนผสมในปริมาณไม่น้อยกว่าร้อยละ50 ของน้ำหนักและมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(1)(6)(7)(8) และ (11) สำหรับคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 7(2)(3) และ (4) ให้เป็นไปตามสัดส่วนของนมที่ใช้เป็นส่วนผสมกรณีที่มีวัตถุประสงค์การใช้ต่างจากวรรคหนึ่ง อาจมีคุณภาพหรือมาตรฐานต่างจากวรรคหนึ่งได้ แต่ต้องเป็นไปตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประกาศกำหนด โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการอาหาร

ข้อ 11 นมเปรี้ยวที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักและที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักตามข้อ 6(1)ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาหลังบรรจุจนถึงผู้บริโภค และระยะเวลาการบริโภคต้องไม่เกิน 30 วัน นับจากวันที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่าย แต่ทั้งนี้ไม่รวมนมเปรี้ยวแช่แข็งหรือนมเปรี้ยวชนิดแห้ง กรณีที่จะแสดงระยะเวลาการบริโภคเกินกว่าที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กำหนดตามวรรคหนึ่ง ต้องมีมาตรการในการควบคุมคุณภาพหรือมาตรฐานผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาตั้งแต่หลังการบรรจุถึงการจำหน่ายถึงผู้บริโภคเป็นไปตามหลักเกณฑ์ที่ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการอาหาร

ข้อ 12 นมเปรี้ยวที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักตามข้อ6(2) ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิปกติในระยะเวลาไม่น้อยกว่า 5 วัน นับแต่วันที่บรรจุในภาชนะก่อนออกจำหน่าย เพื่อตรวจสอบว่ายังคงมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามที่กำหนดและไม่เปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะเดิมที่ทำขึ้นแต่ทั้งนี้ไม่รวมนมเปรี้ยวแช่แข็งหรือนมเปรี้ยวชนิดแห้ง

ข้อ 13 การใช้วัตถุเจือปนอาหารนอกจากวัตถุกันเสีย ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วัตถุเจือปนอาหารกรณีตรวจพบวัตถุกันเสียที่ตกค้างมาจากวัตถุที่ใช้ปรุงแต่งกลิ่น รส สี หรือส่วนประกอบอื่นที่มิใช้นมที่เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย ปริมาณที่ตรวจพบจะต้องไม่เกินปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ในวัตถุดิบเหล่านั้น แล้วแต่กรณี

ข้อ 14 ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้านมเปรี้ยวเพื่อจำหน่ายต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ข้อ 15 การใช้ภาชนะบรรจุนมเปรี้ยว ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องภาชนะบรรจุ

ข้อ 16 การแสดงฉลากของนมเปรี้ยว ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลากเว้นแต่การใช้ชื่ออาหารของนมเปรี้ยวและการแสดงข้อความสำหรับนมเปรี้ยวบางชนิดให้ปฏิบัติ ดังต่อไปนี้

(1) ชื่ออาหารของนมเปรี้ยว

(1.1) นมเปรี้ยวตามข้อ 4(1) ให้ใช้ชื่ออาหารว่า “โยเกิร์ต” หรือ “นมเปรี้ยวโยเกิร์ต” สำหรับกรณีที่ประสงค์จะใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยว” ต้องกำกับชื่ออาหารด้วยข้อความว่า “ชนิดโยเกิร์ต”

(1.2) นมเปรี้ยวตามข้อ 4(2) ให้ใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยวแอซิโดฟิลัส” สำหรับกรณีที่ประสงค์จะใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยว” ต้องกำกับชื่ออาหารด้วยข้อความว่า “ชนิดแอซิโดฟิลัส”

(1.3) นมเปรี้ยวตามข้อ 4(3) ให้ใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยวเคเฟอร์” สำหรับกรณีที่ประสงค์จะใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยว” ต้องกำกับชื่ออาหารด้วยข้อความว่า “ชนิดเคเฟอร์”

(1.4) นมเปรี้ยวตามข้อ 4(4) ให้ใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยวคูมิส” สำหรับกรณีที่ประสงค์จะใช้ชื่ออาหารว่า “นมเปรี้ยว” ต้องกำกับชื่ออาหารด้วยข้อความว่า “ชนิดคูมิส”

(1.5) “นมเปรี้ยว” สำหรับนมเปรี้ยวตามข้อ 4(5)การใช้ชื่ออาหารของนมเปรี้ยวอาจใช้ชื่อทางการค้าได้ แต่ต้องมีข้อความตาม (1.1) (1.2) (1.3) (1.4) หรือ (1.5) แล้วแต่กรณี กำกับชื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารด้วย โดยจะแสดงอยู่ในบรรทัดเดียวกับชื่อทางการค้าก็ได้ และจะมีขนาดตัวอักษรต่างกับชื่อทางการค้าก็ได้ แต่ต้องสามารถอ่านได้ชัดเจน

(2) นมเปรี้ยวเคเฟอร์และนมเปรี้ยวคูมิส ต้องแสดงข้อความดังต่อไปนี้ด้วย

(2.1) "มีเอทธิลแอลกอฮอล์ไม่เกิน ...%" (ความที่เว้นไว้ให้ระบุปริมาณแอลกอฮอล์เป็นร้อยละของน้ำหนัก) ด้วยตัวอักษรที่อ่านได้ชัดเจน บริเวณเดียวกับชื่ออาหารหรือเครื่องหมายการค้า

(2.2) "เด็กและสตรีมีครรภ์ ไม่ควรรับประทาน" ด้วยตัวอักษรที่อ่านได้ชัดเจน

(3) นมเปรี้ยวที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักตามข้อ 6 ต้องแสดงข้อความ "พาสเจอร์ไรส์" หรือ"ยูเอชที" เป็นส่วนหนึ่งของชื่ออาหารหรือกำกับชื่ออาหาร แล้วแต่กรณี

ข้อ 17 ให้ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้านมเปรี้ยวที่ได้รับเลขสารบบอาหารอยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยื่นขอแก้ไขรายละเอียดให้ถูกต้องตามประกาศนี้ ภายในหนึ่งร้อยแปดสิบวัน นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ และยังคงใช้ฉลากเดิมต่อไปได้ แต่ต้องไม่เกินหนึ่งปีนับวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 18 ประกาศนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 17 มกราคม พ.ศ. 2548

(ลงชื่อ) สุดารัตน์ เกยุราพันธุ์

(สุดารัตน์ เกยุราพันธุ์)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(คัดจากราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไปเล่ม 122 ตอนพิเศษ 021ง ลงวันที่11 มีนาคม พ.ศ 2548)

รับรองสำเนาถูกต้อง

นางสาวพัชนี อินทรลักษณ์

(นางสาวพัชนี อินทรลักษณ์)

นักวิชาการอาหารและยา 8 ว.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ จ-1 น้ำหนักตัวของหนูในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน และร้อยละน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น

เวลา(วัน)	น้ำหนัก (กรัม)		
	กลุ่มทดลอง	กลุ่มควบคุมบวก	กลุ่มควบคุมลบ
0	189.17 ^{a} ±14.83	189.33 ^{a} ±15.67	189.83 ^{a} ±15.17
7	240.50 ^{a} ±17.50	248.67 ^{a} ±28.67	243.67 ^{a} ±18.33
14	294.50 ^{a} ±32.50	310.50 ^{a} ±37.50	297.17 ^{a} ±26.83
21	318.83 ^{a} ±33.17	346.50 ^{a} ±40.50	316.33 ^{a} ±21.67
28	348.33 ^{a} ±35.67	371.50 ^{a} ±56.50	333.17 ^{a} ±25.83
35	367.50 ^{a} ±36.50	392.67 ^{a} ±69.33	355.83 ^{a} ±17.17
42	398.17 ^{ab} ±37.17	428.33 ^{a} ±65.67	375.50 ^{b} ±24.50
ร้อยละน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น	110.30 ^{b} ±15.35	125.95 ^{a} ±23.55	97.77 ^{c} ±4.81

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ n=6
ตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ร้อยละน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น = [(น้ำหนักสุดท้าย-น้ำหนักเริ่มต้น) / น้ำหนักเริ่มต้น] × 100 (Ibrahim, 2005)

ตารางที่ จ-2 น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูหลังการได้รับอาหารและโยเกิร์ตเป็นระยะเวลา 42 วัน

กลุ่มตัวอย่าง	น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม)			
	ไต	ม้าม	หัวใจ	ตับ
กลุ่มทดลอง (n=6)	3.49 ^{a} ±0.50	0.96 ^{b} ±0.17	1.33 ^{a} ±0.41	13.41 ^{b} ±1.04
กลุ่มควบคุมบวก (n=6)	3.70 ^{a} ±0.78	1.32 ^{a} ±0.48	1.50 ^{a} ±0.45	14.21 ^{a} ±1.57
กลุ่มควบคุมลบ (n=6)	3.42 ^{a} ±0.39	1.23 ^{a} ±0.37	1.31 ^{a} ±0.05	12.50 ^{b} ±0.52

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ
ตัวเลขในคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ จ-3 ปริมาณเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ในมูลของหนูในวันที่ 0, 14, 28 และ 42 และในลำไส้เล็ก

กลุ่มตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ *Bifidobacterium* spp. (log CFU/g)				
	วันที่ 0	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	ลำไส้เล็ก
กลุ่มทดลอง (n=6)	5.71 ^{a} ±0.79	6.64 ^{a} ±0.68	7.27 ^{a} ±0.27	7.53 ^{a} ±0.75	8.79 ^{a} ±0.68
กลุ่มควบคุมลบ (n=6)	5.87 ^{a} ±0.64	6.00 ^{ab} ±0.79	6.64 ^{ab} ±0.85	6.57 ^{b} ±0.91	7.37 ^{b} ±1.64
กลุ่มควบคุมบวก (n=6)	5.80 ^{a} ±0.62	5.84 ^{b} ±0.63	6.50 ^{b} ±1.09	6.34 ^{b} ±0.96	7.18 ^{b} ±1.32

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ
ตัวเลขในคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ จ-4 ปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในมูลของหนูในวันที่ 0, 14, 28 และ 42 และในลำไส้เล็ก

กลุ่มตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ *lactobacillus* spp. (log CFU/g)				
	วันที่ 1	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	ลำไส้เล็ก
กลุ่มทดลอง (n=6)	5.72 ^{a} ±0.84	6.28 ^{a} ±1.19	6.54 ^{a} ±0.76	6.80 ^{a} ±0.66	7.56 ^{a} ±0.80
กลุ่มควบคุมลบ (n=6)	5.81 ^{a} ±0.70	6.04 ^{a} ±0.89	6.16 ^{a} ±0.89	6.26 ^{b} ±0.19	6.91 ^{ab} ±0.67
กลุ่มควบคุมบวก (n=6)	5.83 ^{a} ±0.53	5.97 ^{a} ±0.71	6.01 ^{a} ±0.73	6.32 ^{b} ±0.23	6.57 ^{b} ±1.31

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ
ตัวเลขในคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ จ-5 ปริมาณเชื้อ Enterobacteriaceae ในมูลของหนูในวันที่ 0, 14, 28 และ 42 และในลำไส้เล็ก

กลุ่มตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ Enterobacteriaceae (log CFU/g)				
	วันที่ 0	วันที่ 14	วันที่ 28	วันที่ 42	ลำไส้เล็ก
กลุ่มทดลอง (n=6)	5.63 ^{a} ±0.88	6.04 ^{a} ±0.69	6.08 ^{a} ±1.00	6.13 ^{a} ±0.58	5.51 ^{a} ±0.89
กลุ่มควบคุมลบ (n=6)	5.72 ^{a} ±0.76	6.18 ^{a} ±0.81	6.24 ^{a} ±0.17	6.36 ^{a} ±0.27	5.82 ^{a} ±0.69
กลุ่มควบคุมบวก (n=6)	5.60 ^{a} ±0.67	6.28 ^{a} ±0.05	6.30 ^{a} ±0.05	6.33 ^{a} ±0.09	5.96 ^{a} ±0.65

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ
ตัวเลขในคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ จ-6 ปริมาณไขมันในเลือดหนูหลังการได้รับอาหารและโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum* เป็นระยะเวลา 42 วัน

กลุ่มตัวอย่าง	ปริมาณของไขมันในเลือด (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)			
	คอเลสเตอรอลรวม	ไตรกลีเซอไรด์	เอชดีแอลคอเลสเตอรอล	แอลดีแอลคอเลสเตอรอล
กลุ่มทดลอง (n=6)	64.2 ^{b} ±16.2	44.2 ^{a} ±26.2	38.6 ^{ab} ±12.4	17.0 ^{a} ±8.0
กลุ่มควบคุมบวก (n=6)	77.2 ^{a} ±6.2	44.6 ^{a} ±31.6	46.4 ^{a} ±17.4	23.4 ^{a} ±23.6
กลุ่มควบคุมลบ (n=6)	50.4 ^{c} ±2.4	57.8 ^{a} ±13.2	30.4 ^{b} ±4.4	7.8 ^{a} ±1.8

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ
ตัวเลขในคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสิทธิโชค ริตเพ็ชร
วัน เดือน ปี เกิด	10 มิถุนายน 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ ปีการศึกษา 2542
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved