

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

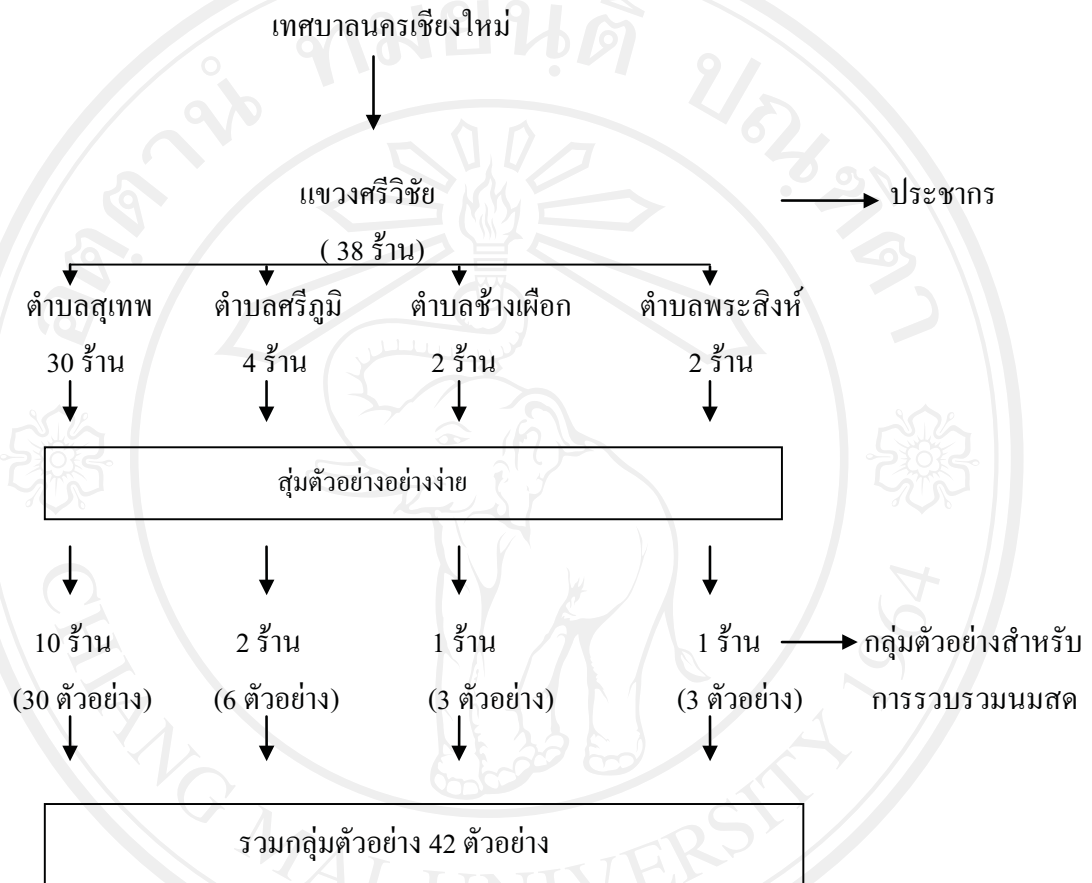
การศึกษาเรื่องการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ปนเปื้อนในนมสดที่จำหน่ายในเขตเทศบาลนครเชียงใหม่ครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ (Survey study) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ปนเปื้อนในนมสดที่จำหน่ายในแขวงศรีวิชัย เขตเทศบาลนครเชียงใหม่ มีวิธีดำเนินการศึกษาดังนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร คือ นมสดพร้อมดื่มในลักษณะต้มสุกแล้วจำหน่ายในร้านเพื่อการบริโภคในแขวงศรีวิชัย ซึ่งมีทั้งหมด 4 ตำบล ได้แก่ ตำบลสุเทพ (30) ตำบลศรีภูมิ (4) ตำบลช้างเผือก (2) และตำบลพระสิงห์ (2) จำนวนร้านนมทั้งหมด 38 ร้าน ดังตารางที่ 3.1

กลุ่มตัวอย่าง คือ นมสดจากร้านขายนมสดพร้อมดื่มในแขวงศรีวิชัย เขตเทศบาลนครเชียงใหม่ คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากร้านขายนมสดร้านเดียวกัน โดยร้านที่มีสาขาเลือกด้วยวิธีสุ่มเลือกร้านที่มีสาขา 1 ร้านเนื่องจากแหล่งที่มาของนมมาจากแหล่งเดียวกันและวิเคราะห์หาปริมาณสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 เก็บตัวอย่างนมสดเป็นเวลา 1 เดือนทำการสุ่มจากร้าน 4 ตำบล คือ ตำบลสุเทพ ตำบลศรีภูมิ ตำบลช้างเผือกและตำบลพระสิงห์ โดยใช้หลักการสุ่มตามสัดส่วนของจำนวนร้านที่มีอยู่ในแต่ละตำบล (proportional sampling) ได้จำนวนร้านในแต่ละตำบลดังนี้ ตำบลสุเทพ จำนวน 10 ร้าน ตำบลศรีภูมิ จำนวน 2 ร้าน ตำบลช้างเผือก จำนวน 1 ร้าน ตำบลพระสิงห์ จำนวน 1 ร้านรวม 14 ร้านที่เป็นกลุ่มตัวอย่างในการรวบรวมนมสดโดยเก็บตัวอย่างนมสด 3 ครั้งทุก 10 วันจนครบ 1 เดือนดังแผนภูมิ 3.1

แผนภูมิที่ 3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ด้วยการแบ่งแบบชั้นภูมิ



จากแผนภูมิที่ 3.1 จะเห็นว่าในจำนวน 14 ร้าน ได้ตัวอย่างนมสด 42 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์หาสารอะฟลาทอกซินเอ็ม 1

ตารางที่ 3.1 การรวบรวมตัวอย่างนมสด จำนวน 14 ร้านในแขวงศรีวิชัย

แขวงศรีวิชัย	ร้านที่	จำนวนตัวอย่างนมสด			รวม
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
		10 มี.ค.2553	20 มี.ค. 2553	30 มี.ค. 2553	
	1	1	1	1	3
	2	1	1	1	3
	3	1	1	1	3
	4	1	1	1	3
	5	1	1	1	3
	6	1	1	1	3
	7	1	1	1	3
	8	1	1	1	3
	9	1	1	1	3
	10	1	1	1	3
	11	1	1	1	3
	12	1	1	1	3
	13	1	1	1	3
	14	1	1	1	3
	รวม	14	14	14	42

ตาราง 3.1 จำนวนตัวอย่างนมสดที่เก็บในพื้นที่จำหน่ายจำนวน 14 ร้านและทำการเก็บ ตัวอย่าง
ละ 3 ครั้งโดยเว้นระยะห่างทุก 10 วันได้จำนวนตัวอย่างนมสดทั้งหมด 42 ตัวอย่าง

All rights reserved

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้ ELISA KIT ในการตรวจวัดสาร อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในตัวอย่างนมสด ประกอบด้วย การรวบรวมข้อมูลตัวอย่างนมสดจากแหล่งต่างๆและ RIDASCREEN® FAST ในการวิเคราะห์ตัวอย่างนมสดจากร้านซึ่งเก็บจากร้านขายนมสดในแขวงศรีวิชัย เขตเทศบาลนครเชียงใหม่

การรวบรวมข้อมูล

ผู้ศึกษาเป็นผู้รวบรวมตัวอย่างนมสดจากร้านจำหน่ายนมสด ในแขวงศรีวิชัยจากจำนวน 14 ร้าน ด้วยตนเองครั้งละ 1 ตัวอย่างโดยการเก็บ 3 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน รวม 42 ตัวอย่าง และดำเนินการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิเคราะห์หาสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หาสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ด้วยชุดทดสอบ Elisa kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) เป็นดังนี้

วิธีวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 โดยชุดทดสอบ RIDASCREEN® FAST

ชุดทดสอบ RIDASCREEN® FAST ใช้หลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยแอนติบอดีต่อ แอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี เกาะติดอยู่กับหลุมทดสอบ จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานของ อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 และอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 เอนไซม์คอนจูเกต ลงในหลุมทดสอบ จากนั้นเติมแอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี ลงไป ซึ่งจะทำให้ Free Aflatoxin M₁ และอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 เอนไซม์คอนจูเกต เกิดการแย่งจับกับแอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี (Competitive Enzyme Immunoassay) ขณะเดียวกันแอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี จะไปจับกับแอนติบอดีต่อ แอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี ที่เกาะอยู่ที่ผิวของหลุมทดสอบ ส่วน Free Aflatoxin M₁ และอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 เอนไซม์คอนจูเกต ที่ไม่ถูกจับจะถูกล้างออก แล้วเติม substrate/chromogens บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เอนไซม์คอนจูเกต จะเปลี่ยนสี chromogen เป็นสีน้ำเงินเติม stop solution จะเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงิน กลายเป็นสีเหลือง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วน ผกผันกับปริมาณของอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1

ตัวอย่างขั้นตอนการวิเคราะห์

1. นำน้ำนมมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 g ที่ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที (หรือนำตัวอย่างไปแช่เย็นที่ 10 °C ก่อนแล้วค่อยนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง)
2. หลังจากเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้วแยกชั้นครีมออกไปโดยใช้ Pasteur pipette
3. ใช้ skimmed milk (นมที่เอามันเนยออกแล้ว) ที่ได้มาทดสอบ 50 μ l / wells

Dilution factor 1

Limit of detection < 367 ng/l (พีพีที)

(ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้)

Limit of quantification 500 ng/l (พีพีที)

(ปริมาณค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้)

Test Implementation – การเตรียมอุปกรณ์และข้อควรระวัง

1. เมื่อจะทำการทดสอบจะต้องนำชุดทดสอบออกจากตู้เย็น และวางทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของชุดทดสอบเท่ากับอุณหภูมิห้อง
2. ปฏิบัติการจะเริ่มหลังจากเติมแอนตี้ อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี จึงไม่ควรทำการทดลองเกิน 3 strips ถ้าใช้ single step pipette แต่สามารถทำมากกว่านี้ได้หากใช้ multistep pipette
3. นำชุดทดสอบเก็บในตู้เย็นทันทีที่ทำการทดสอบเสร็จ
4. ห้ามปล่อยหลุมทดสอบ แห่งในทุกขั้นตอนของการทดสอบ
5. การล้างหลุมทดสอบจะต้องทำตามวิธีที่กำหนดเพื่อให้ได้ค่าถูกต้อง
6. ในขั้นตอนของการบ่มจะต้องเก็บ plate ในที่มืด แนะนำให้บ่มในลิ้นชัก
7. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 สามารถใช้หปริมาณ สารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในตัวอย่างได้โดยตรง

สารเคมีและสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1

1. หลุมทดสอบจำนวน 48 หลุม (6strips แต่ละ strips มี 8 แถว) ทุกหลุมจะมีแอนติบอดีต่อแอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม1 แอนติบอดี เกาะติดอยู่
2. สารละลายมาตรฐาน สารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 จำนวน 5 ขวด ขวดละ 1.3 มิลลิลิตร ประกอบด้วย ความเข้มข้น 5 พีพีบี คือ 0 พีพีที 250 พีพีที 500 พีพีที 1000 พีพีที 2000 พีพีที
3. Conjugate (peroxidase conjugate Aflatoxin M₁) จำนวน 1 ขวด ฝาสีแดงปริมาตร 3มิลลิลิตร
4. แอนตี้อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี จำนวน 1 ขวด ชนิดพร้อมใช้ ฝาสีดำปริมาตร 3 มิลลิลิตร
5. Substrate / Chromogens (stained red) จำนวน 1 ขวด แบบหยด ขวดและฝาสีขาว ปริมาตร 6 มิลลิลิตร
6. Stop solution (1N sulfuric acid) จำนวน 1 ขวด แบบหยด ขวดสีขาวฝาสีเหลือง ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เครื่องมือสำหรับอ่านค่าการดูดกลืนแสง (ELISA reader 450nm) 50 μ l , 100 μ l and 1000 μ l micropipettesและ ขวดตัวอย่างนมสดขนาด 30 ซีซี

ขั้นตอนวิเคราะห์

1. นำหลอดทดสอบใส่ใน holder เท่ากับจำนวนที่ต้องการทดสอบ (หลอดทดสอบ ที่ไม่ได้ใช้เก็บในถุง foil ที่มีสารดูดความชื้น ปิดให้สนิท นำไปเก็บในตู้เย็น)

2. ปิเปต(pipette)สารละลายมาตรฐาน / ตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างน้ำนมและจำนวนรีานที่จำหน่ายนมสด

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Std 1	ต.ย.1 ร.1	ต.ย.1 ร.8	ต.ย.1 ร.14	ต.ย.2 ร.6	ต.ย.2 ร.12	ต.ย.3 ร.4	ต.ย.3 ร.10
B	Std 2	ต.ย.1 ร.3	ต.ย.1 ร.9	ต.ย.2 ร.1	ต.ย.2 ร.7	ต.ย.2 ร.13	ต.ย.3 ร.5	ต.ย.3 ร.11
C	Std 3	ต.ย.1 ร.4	ต.ย.1 ร.10	ต.ย.2 ร.2	ต.ย.2 ร.8	ต.ย.2 ร.14	ต.ย.3 ร.6	ต.ย.3 ร.12
D	Std 4	ต.ย.1 ร.5	ต.ย.1 ร.11	ต.ย.2 ร.3	ต.ย.2 ร.9	ต.ย.3 ร.1	ต.ย.3 ร.7	ต.ย.3 ร.13
E	Std 5	ต.ย.1 ร.6	ต.ย.1 ร.12	ต.ย.2 ร.4	ต.ย.2 ร.10	ต.ย.3 ร.2	ต.ย.3 ร.8	ต.ย.3 ร.14
F	ต.ย.1 ร.1	ต.ย.1 ร.7	ต.ย.1 ร.13	ต.ย.2 ร.5	ต.ย.2 ร.11	ต.ย.3 ร.3	ต.ย.3 ร.9	

3. ปิเปต (pipette) Enzyme conjugates (ฝาสีแดง) 50 ไมโครลิตรลงไปใน แต่ละหลุมทดสอบ
4. ปิเปต (pipette) แอนติอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 แอนติบอดี (ฝาสีดำ) 50 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละหลุมเจาะPlateเบาๆเพื่อให้สารละลายผสมกันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง(20- 25 °C / 68-77°F) 10± 1 นาที
5. เทน้ำออก เคาะบนกระดาษซับจนแน่ใจว่าไม่มีน้ำยาเหลืออยู่ในแต่ละหลุม ล้างplate ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำ DI 250 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เคาะบนกระดาษซับไม่ให้มีหยดน้ำเกาะติดอยู่ในแต่ละหลุม
- 6.ปิเปต (pipette) Substrate / Chromogens 100 µl ลงในในแต่ละหลุม เคาะ plate เบาๆ บ่มในที่มืด 5±0.5 นาที
- 7.ปิเปต (pipette) Stop solution 100 µl ลงในในแต่ละหลุม เคาะ plate เบาๆ
- 8.นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD ที่ 450 nm) ควรอ่านภายใน 10 นาที หลังการเติมStop solution

การอ่านผล

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างจะนำมาหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงของค่า zero standard คูณด้วย 100 โดยที่ zero standard จะคำนวณได้เท่ากับ 100% และค่าการดูดกลืนแสงจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์

absorbance standard (or sample)

_____ x 100=% absorbance

absorbance zero standard

ค่า Standard ที่คำนวณได้ระบบจะนำไปคำนวณเป็นกราฟ semilogarithmic ซึ่งจะใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับหาความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในนม มีหน่วยเป็น ng/l ซึ่งสามารถอ่านผลโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานและตัวอย่างจากกราฟได้โดยตรง

แผนภูมิที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในนม

ตัวอย่างนม

นำนมมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500g ที่ 10 °C 10 นาที

แยกชั้นครีมออกไปโดยใช้ Pasteur pipette

ใช้ Skimmed milk ที่ได้มาทดสอบ 50 µl / wells

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ที่พบในตัวอย่างนมสด