ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ฉบับที่ 98 (พ.ศ.2529)

เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข
ฉบับที่ 98 (พ.ศ.2529)
เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6 (3) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 80 (พ.ศ.2527) เรื่อง กำหนดมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ลงวันที่ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2527

ข้อ 2 ให้อาหารที่มีสารปนเปื้อนที่ผลิตเพื่อจำหน่าย นำเข้าเพื่อจำหน่าย หรือที่จำหน่าย เป็นอาหารที่กำหนดมาตรฐาน

ข้อ 3 สารปนเปื้อน หมายความว่า สารที่ปนเปื้อนกับอาหารซึ่งเกิดจากกระบวนการผลิต กรรมวิธีการผลิต โรงงานหรือสถานที่ผลิต การดูแลรักษา การบรรจุ การขนส่งหรือการเก็บรักษา หรือ เกิดเนื่องจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม

ข้อ 4 อาหารที่มีสารปนเปื้อนต้องมีมาตรฐาน โดยตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินข้อกำหนด ดังต่อไปนี้

(1) โลหะ

(ก) ดีบุก 250 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

(ข) สังกะสี 100 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

(ค) ทองแดง 20 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

(ง) ตะกั่ว 1 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เว้นแต่อาหารที่มีสารตะกั่วปนเปื้อนตามธรรมชาติในปริมาณสูง ให้มีได้ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

(จ) สารหนู 2 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

(ฉ) ปรอท 0.5 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับอาหารทะเล และไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับอาหารอื่น

(2) อะฟลาทอกซิน 20 ไมโครกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

(3) สารปนเปื้อนอื่น ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อ 5 ประกาศฉบับนี้ มิให้ใช้บังคับแก่อาหารที่ผลิตเพื่อจำหน่าย นำเข้าเพื่อจำหน่าย หรือที่จำหน่าย ที่ได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ หรืออาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน และในประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดปริมาณของสารปนเปื้อนไว้โดยเฉพาะหรือกำหนดไว้เป็นอย่างอื่นแล้ว

ประกาศฉบับนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 21 มกราคม พ.ศ.2529

มารุต บุนนาค
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(ราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษ เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2529)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินด้วย

ชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร 1 ชุด ประกอบด้วย

รูป ข. 1 ชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร ของกรมวิชาการเกษตร

1. หลุมทดสอบ เป็นหลุมพลาสติกขนาดเล็ก (1 stripe เท่ากับ 8 หลุมทดสอบ)
2. อะฟลาทอกซินมาตรฐาน (สารละลายมาตรฐานของอะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่ง) ที่ระดับความเข้มข้น 0 4 10 20 และ40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
3. อะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) ซึ่งก็คือเอ็นไซม์คอนจูเกต (Aflatoxin B1 Horseradish Peroxidase Conjugate (AFB_1-HRP)) จำนวน 6 หลอด (100 ไมโครลิตรต่อหลอด)
4. conjugate buffer 8 มิลลิลิตร
5. ซับสเตรท (substrate tetramethylbenzidine (TMB)) 12 มิลลิลิตร พร้อมใช้งาน
6. washing buffer (0.1 M Phosphate Buffer Saline with Tween 20 (PBS-T)) 100 มิลลิลิตร
7. ที่ล็อคหลุมทดสอบ

สิ่งที่ต้องเตรียม

1. เมธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร
2. เครื่องชั่ง
3. เครื่องแก้วสำหรับกรอง และเจือจางสารสกัด
4. กระดาษกรองเบอร์ 4
5. automatic micropipet ขนาด 50 ไมโครลิตรพร้อมทิป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำแนะนำก่อนการวิเคราะห์

1. ก่อนทำการวิเคราะห์นำชุดตรวจสอบออกจากตู้เย็นมาวางให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนใช้งาน
2. นำอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) จำนวน 1 หลอด มาเจือจางด้วย conjugate buffer ส่วนที่เจือจางแล้วถ้าใช้ไม่หมดปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส
3. นำ stripe ออกจากถุงฟอยด์เท่าที่ต้องการใช้ในแต่ละครั้ง ที่เหลือเก็บไว้ในถุงเดิมที่ 2-8 องศาเซลเซียส อย่าให้โดนน้ำ
4. เปลี่ยนทิปทุกครั้งที่เปลี่ยนการดูดสารสกัดตัวอย่าง
5. การดูดหรือปล่อยสารละลายอย่าให้ปลายทิปสัมผัสกับสารละลายในหลุมหรือด้านข้างของหลุมทดสอบ
6. ระวังขั้นตอนการบ่มแต่ละครั้ง ควรจะบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง
7. ขั้นตอนการล้างเป็นขั้นตอนที่สำคัญ อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้องได้ ดังนั้นต้องล้างหลุมทดสอบให้สะอาด
8. นำชุดตรวจสอบเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ทันทีหลังการใช้งาน

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 เตรียม washing buffer ที่พร้อมใช้งาน

เตรียมโดยนำ washing buffer (0.1 M Phosphate Buffer Saline with Tween 20) 100 มิลลิลิตร มาเจือจางเป็น 0.01 M Phosphate Buffer Saline with Tween 20 (PBS-T) โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร จะได้ washing buffer ที่พร้อมใช้งาน 1,000 มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ ในการเจือจางสารสกัดตัวอย่าง และใช้ล้างหลุมทดสอบ

1.2 เตรียม อะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) ที่พร้อมใช้งาน

1.3 เตรียมโดยการเติม conjugate buffer 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) ซึ่งมีปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลอด เขย่าเล็กน้อยให้เป็นเนื้อเดียวกันหรือกลับหลอดขึ้นลงให้เข้ากัน จะได้อะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) ที่พร้อมใช้งาน ปริมาตร ถ้าใช้ไม่หมด เก็บส่วนที่เหลือในหลอดเดิมปิดฝาให้สนิทแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างพริกป่นที่ใช้ต้องสุ่มมาอย่างน้อย 1 กิโลกรัม แล้วนำมาสกัดอะฟลาทอกซินด้วยวิธีการ ดังนี้

2.1 ชั่งพริกป่น 20 กรัมลงในขวดแก้ว

2.2 เติมเมธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรลงในขวด เขย่านาน 5 นาที

2.3 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 - 10 นาที

2.4 นำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

2.5 เก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในหลอดแก้วที่สะอาดปิดสนิท

2.6 เจือจางสารสกัดโดยใช้สารละลาย washing buffer ที่พร้อมใช้งานก่อนนำไปวิเคราะห์ ในอัตราส่วน 1:3 (สารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร รวมกับสารละลาย washing buffer ที่พร้อมใช้งาน 3 มิลลิลิตร) ในสารละลายที่เตรียมได้นี้คืออะฟลาทอกซินที่สกัดได้จากตัวอย่าง

3. วิเคราะห์หาอะฟลาทอกซิน

3.1 เตรียมหลุมทดสอบให้เพียงพอกับตัวอย่างที่จะทดสอบ ใช้หลุมทดสอบ 5 หลุมทดสอบสำหรับอะฟลาทอกซินมาตรฐาน และหลุมทดสอบอื่นๆที่เหลือสำหรับอะฟลาทอกซินที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง

3.2 หยดอะฟลาทอกซินมาตรฐานทุกระดับความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมทดสอบต่อความเข้มข้น

3.3 หยดอะฟลาทอกซินที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง (free aflatoxin) ตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมทดสอบ จำนวน 3 หลุมทดสอบ (1 ตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)

3.4 หยดอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) หลังจากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 – 30 นาที อะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่งจากอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin) จะแข่งขันกันจับแอนติบอดีที่ก้นหลุมทดสอบกับอะฟลาทอกซินที่สกัดได้จากตัวอย่าง

3.5 หลังจากครบเวลาการบ่มแล้ว เทสารในหลุมทดสอบทิ้งโดยการคว่ำหลุมทดสอบ

3.6 ล้างหลุมทดสอบ โดยเติม washing buffer ลงในหลุมทดสอบให้เต็มทุกหลุม แล้วคว่ำทิ้ง ควรล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.7 คว่ำหลุมทดสอบบนกระดาษแล้วเคาะให้แห้ง

3.8 หยด ซับสเตรท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบทุกหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 – 10 นาที ซับสเตรทจะจับกับเอนไซม์ที่ผูกติดกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อะฟลาทอกซิน เกิดปฏิกิริยาสีฟ้า หากเกิดสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีอะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง (free toxin)หรือมีน้อย หากเกิดสีฟ้าอ่อนแสดงว่ามีอะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง (free toxin) มาก และถ้าหากว่าในหลุมทดสอบของตัวอย่างมีสีอ่อนมากหรือเกือบใส แสดงว่าตัวอย่างนั้นมีอะฟลาทอกซินสูงกว่า 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

4. การอธิบายขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบของสารละลายมาตรฐาน

เพื่อให้เข้าใจได้ง่ายยิ่งขึ้นจึงได้กำหนดสัญลักษณ์ของสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการเกิดปฏิกิริยา (รูป ข.2) สำหรับการเกิดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบสารละลายมาตรฐานนั้นเป็นไปตามขั้นตอนของการวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินในหัวข้อ 3 ซึ่งแสดงไว้ในรูป ข. 3 หลังเกิดปฏิกิริยาแล้วทำการเทียบสีของสารละลายในหลุมทดสอบของตัวอย่างกับสีของสารละลายมาตรฐานที่เกิดขึ้น หากความเข้มของสีฟ้าในสารละลายที่ได้จากตัวอย่างมีค่าอยู่ระหว่างความเข้มของสีฟ้าใดๆ สามารถอ่านค่าออกมาเป็นความเข้มข้นของ อะฟลาทอกซินอยู่ในช่วงนั้น ดังนั้นชุดตรวจสอบนี้สามารถอ่านค่า ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินได้ 5 ช่วง ดังนี้ ช่วง 0 – 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วง > 4 – 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วง > 10 – 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วง > 20 – 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ > 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในรูป ข. 4 สีของสารละลายมีสีเกือบใส แสดงว่าตัวอย่างนี้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินสูงกว่า 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

แทน แอนติบอดี

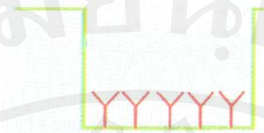
แทน อะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง (free toxin)

แทน อะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin)

แทน สีฟ้าที่เกิดขึ้น

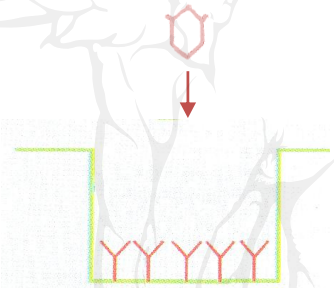
รูป ข. 2 สัญลักษณ์แทนสารต่างๆที่ทำปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

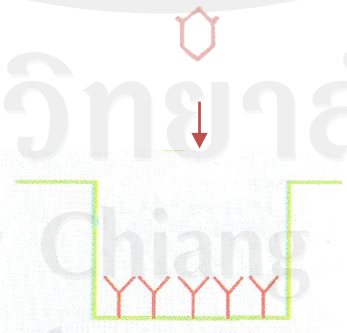


1 เตรียมหลุมทดสอบซึ่งเคลือบด้วยแอนติบอดี

2 หยดอะฟลาทอกซินมาตรฐานทุกระดับความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมทดสอบต่อความเข้มข้น

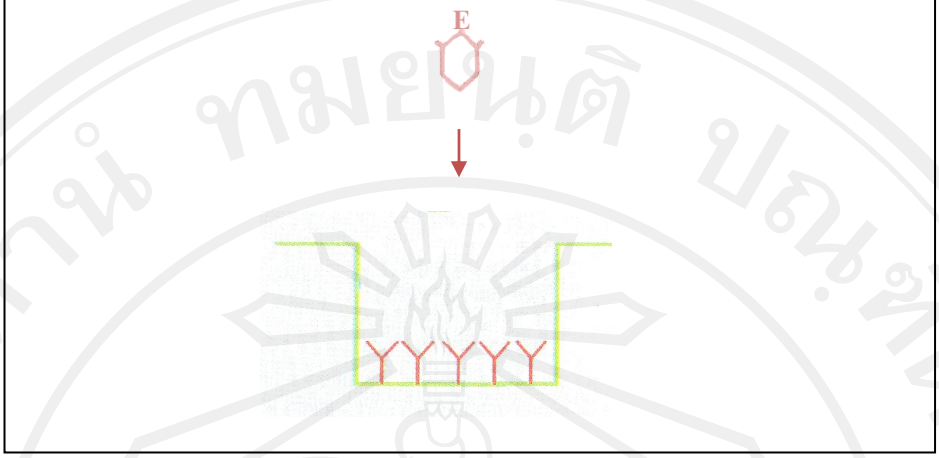


3. หยดอะฟลาทอกซินที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง (free aflatoxin) ตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมทดสอบ จำนวน 3 หลุมทดสอบ (1 ตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ)



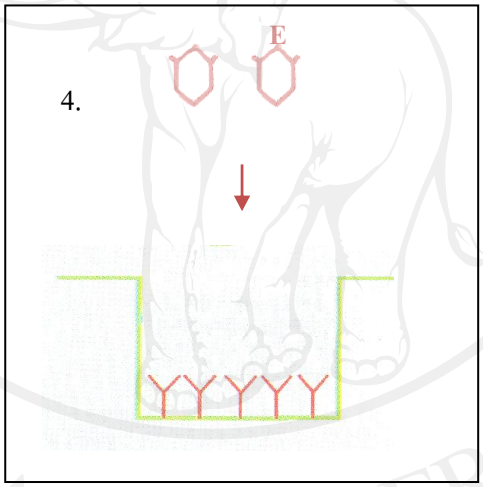
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. หยดอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับเอนไซม์ชี้บอก (labeled toxin)



4. บ่มในที่มืด 20 – 30 นาที

4.



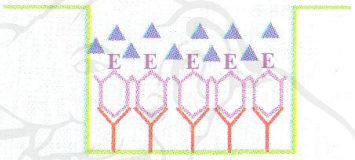
5. เทสารในหลุมทดสอบทิ้งโดยการคว่ำหลุมทดสอบ

6. ล้างหลุมทดสอบ โดยเติม washing buffer ลงในหลุมทดสอบให้เต็มทุกหลุม แล้วคว่ำทิ้ง ควรล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง

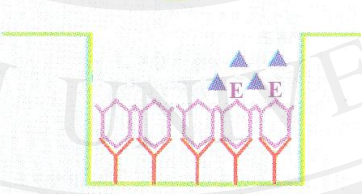
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. คว่ำหลุมทดสอบบนกระดาษแล้วเคาะให้แห้ง

8. หยด ซับสเตรท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบทุกหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 – 10 นาทีซับสเตรทจะจับกับเอนไซม์ที่ผูกติดกับอะฟลาทอกซิน เกิดปฏิกิริยาสีฟ้า

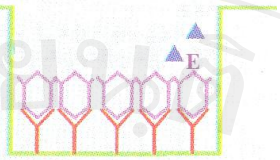


ลักษณะของสัญลักษณ์ในหลุมทดสอบที่ไม่มีอะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง หรือมีอะฟลาทอกซิน 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม



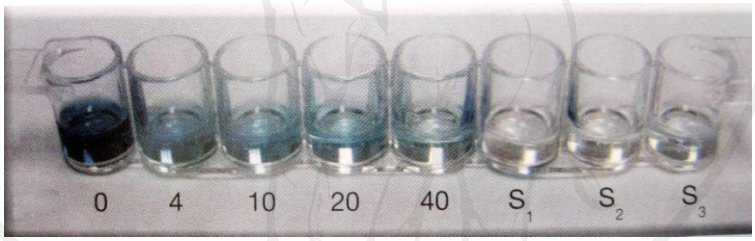
ลักษณะของสัญลักษณ์ในหลุมทดสอบที่ไม่มีอะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง หรือมีอะฟลาทอกซิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลักษณะของสัญลักษณ์ในหลุมทดสอบที่ไม่มีอะฟลาทอกซิน
จากตัวอย่าง หรือมีอะฟลาทอกซิน 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

รูป ข. 3 สัญลักษณ์การทำปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ



หลุมทดสอบอะฟลาทอกซินมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น
0 4 10 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

หลุมทดสอบของตัวอย่าง
พริกป่น ซ้ำที่ 1 2 และ3

รูป ข. 4 สีของสารละลายหลังการทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน
เท่ากับ 0 4 10 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวดุจดาว ชูน้อย
วัน เดือน ปี เกิด	13 มิถุนายน 2528
ประวัติการศึกษา	
2545	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย จังหวัดตรัง
2551	ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved