บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatograph : SHIMADZU)
2. เครื่องวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (pH-meter: Satorius PB 10, Germany)
3. เครื่องชั่ง ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance Dielhemim: HF-3000G, Switzerland)
4. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electric analytical balance: Satorius A120S, Germany)
5. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave: Airayama HA-300MIV, Japan)
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath: Gallenkamp, England)
7. ตู้บ่ม (Incubator: Heraeus B6200, England)
8. ไมโครเวฟ (Microwave Oven: National NV-K652, Japan)
9. เครื่องกวนผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot Plate and Magnetic Stirrer: Whatman HPMS, England)
10. ไมโครปิเปตต์ 100-1000 µl
11. เครื่องผสม (vortex mixer: Scientific Industries G-560E, U.S.A.)
12. เตาอบ (Oven: Heng Wei ELE-1450A)
13. เครื่องผสม (กล้วยน้ำไท รุ่นUM-20)
14. แผ่นเมมเบรน (Nylon 66 Membranes 0.45 µm x 47 mm.: SUPELCO, U.S.A.)
15. แผ่นเมมเบรน (Syringe Filter CA 0.45 µm x 13 mm.: Vertical, Thailand)
16. จานเพาะเชื้อแบบพลาสติกปลอดเชื้อ
17. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 เครื่องแก้ว

1. ปิเปตขนาด 1.0, 5.0, 10.0 มิลลิลิตร
2. ขวดวัดปริมาตร(Volumetric flask) ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ml.

3. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 ml.
4. กระบอกตวง
5. กรวยกรอง
6. หลอดหยดพร้อมลูกยาง
7. ชุดกรองเมมเบรน เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 mm. (SUPELCO, U.S.A.)
8. ชุดกรองเมมเบรน Syringe Filter 10 มิลลิลิตร
9. ขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
10. หลอดทดลอง
11. หลอดดักก๊าซ (Durham tube)
12. เข็มขนาด 100 ไมโครลิตร (Syringe: Hamilton)

3.2 สารเคมี

1. กรดทาทาริก (L(+)-Tartaric acid : Fluka AG, Chemische Fabrik CH-947 Buchs.)
2. กรดเบนโซอิก (Benzoic acid GR for analysis : Merck®, Germany)
3. กรดซอร์บิก (Sorbic acid : Fluka, Switzerland)
4. น้ำ (Water HPLC Fluorescence : Fisher Scientific, UK)
5. เมทานอล (Methanol Gradient Grade for Liquid Chromatography : Merck®, Germany)
6. กรดอะซิติค (acetic acid gracial)
7. แอมโมเนียมอะซีเตต (Ammonium acetate GR for analysis : Merck®, Germany)
8. PCA (Plate Count agar : Merck®, Germany)
9. PDA (Potato Dextrose agar : Merck®, Germany)
10. Peptone Water (buffered) (Merck®, Germany)
11. Lauryl Sulfate broth (Merck®, Germany)
12. EMB agar (Merck®, Germany)
13. EC broth (Merck®, Germany)
14. Brilliant Green Bile Broth 2 % (Merck®, Germany)
15. กลูโคส (D(+)-Glucose Monohydrate : Merck®, Germany)
16. Simmons Citrate agar (GIBC Laboratories Life Technologies Inc.,USA.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

17. Gram crystal violet
18. Gram iodine
19. Kovac's reagent
20. MR-VP broth
21. α-naphthol solution
22. Potassium hydroxide เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์
23. Methyl red solution

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำพริกหนุ่มที่วางจำหน่ายในตลาด

สุ่มตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มจากตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ 6 แห่ง รวมทั้งสิ้น 34 รายๆ ละ 2 ครั้ง โดยเว้นระยะห่างของการสุ่มตรวจ 2 สัปดาห์ ทำการวิเคราะห์ครั้งละ 2 ซ้ำดังนี้

3.3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (BAM, 1998)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัมใส่ในถุง stomacher เติมสารละลาย 0.1% peptone water จำนวน 225 กรัม นำเข้าเครื่องตีป่น (stomacher) 2 นาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 เท่า เรียกว่า dilution 1:10 (10^{-1})
2. ผสมสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากันโดย เครื่องผสม (vortex) ทำเจือจางอาหารโดยดูดอาหารที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.1% peptone water หลอดละ 9 มล. เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่องผสมจะได้อาหารที่มีความเจือจาง 1:100(10^{-2}) ทำการเจือจางต่อไปด้วยวิธีการเดียวกันจนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม
3. ปิเปตสารละลาย ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 3 ระดับความเข้มข้นที่ติดกันใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน (duplicate)
4. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA หลอมเหลว อุณหภูมิ 44-46 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-15 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เขย่าจานให้สารละลายอาหารกระจายทั่วจานเพาะเชื้อโดยเขย่าไปข้างหน้า ข้างหลัง หมุนวนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกา ระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ
5. ปล่อยให้อาหารวุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 3 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้งสอง รายงานผลการตรวจนับในรูปโคลีต่ออาหาร 1 กรัม cfu/g (ml)

3.3.1.2 เชื้อยีสต์และรา (Yeast and Mould) (BAM, 1998)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 25-50 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมสารละลายเจือจาง peptone water เข้มข้น 0.1% หรือ phosphate buffer ในอัตราส่วน 1:10 นำเข้าเครื่องตีป่น (stomacher) นาน 2 นาที
2. ทำเจือจางอาหารในสารละลายเจือจาง หลอดละ 9 มล. จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับที่ติดกัน
3. ให้ใช้ปิเปตที่อุดด้วยสำลีดูดสารละลายอาหารความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาณ 1 มล. ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15 x 100 มม. (จานพลาสติกหรือแก้ว)
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริก เข้มข้น 10% อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ 20-25 มล. ผสมให้เข้ากันโดยหมุนในทิศตามเข็มนาฬิกาและทวนเข็มนาฬิกา ให้ทำ dilution ละ 2 จาน
5. ไม่ควรใช้เวลาในการเตรียมสารละลายอาหารจนถึงขั้นตอนการเกลี่ยเชื้อหรือ pour plate นานเกิน 20 นาที
6. บ่มเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ และห้ามวางจานเพาะเชื้อซ้อนกันเกิน 3 จาน บ่มเพาะเชื้อนาน 5 วัน ห้ามเคลื่อนไหวจานเพาะเชื้อก่อนครบกำหนดระยะเวลาการบ่มเพาะ นับจำนวนโคโลนีของเชื้อในจานที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี
7. เฉลี่ยจำนวนเชื้อจากทั้ง 2 จาน รายงานการพบเชื้อยีสต์และราเป็น cfu/g หรือ cfu/ml โดย คำนวณการพบเชื้อยีสต์และรา ดังนี้
   7.1 กรณีที่ตัวเลขหลักที่ 3 เป็นเลข 6 หรือสูงกว่านี้ให้ปัดขึ้น เช่น 456 = 460
   7.2 กรณีที่ตัวเลขหลักที่ 3 เป็นเลข 4 หรือต่ำกว่านี้ให้ปัดลง เช่น 454 = 450
   7.3 กรณีที่ตัวเลขหลักที่ 3 เป็นเลข 5 ให้พิจารณาตัวเลขหลักที่ 2 ว่าน้อยกว่าหรือมากกว่า 5 โดยถ้าเลขหลักที่ 2 น้อยกว่า 5 ให้ปัดลง เช่น 445 = 440
   แต่ถ้าเลขหลักที่ 2 มากกว่าหรือเป็น 5 ให้ปัดขึ้น เช่น 455 = 460
   7.4 กรณีที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อขึ้นเลยทุกระดับความเข้มข้น ให้รายงานการพบเชื้อยีสต์และราน้อยกว่า 1 คูณระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1.3 โคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) (BAM, 1998)

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่น เติมสารละลายเพื่อเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีป่นนาน 2 นาที ได้สารละลายตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 (10^{-1})
2. ทำให้เจือจางต่ออีก 10 เท่า โดยใช้สารละลายตัวอย่างจากข้อ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายเพปโทนเพื่อเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอาหารเจือจาง 1:100 (10^{-2}) แล้วทำเจือจางต่อไปอีก 10 เท่า โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับที่กล่าวมา จะได้สารละลายอาหารเจือจาง 1:1000 (10^{-3})
3. ปิเปตสารละลายเจือจางที่มีความข้น10^{-1}, 10^{-2} และ10^{-3} ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ lauryl sulfate tryptose broth (LSB) ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส หลอดละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด
4. บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง สังเกตุหลอดที่ขุ่นและเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ให้อ่านผลเป็นบวก นำหลอดที่ให้ผลบวกไปทดสอบยืนยัน (confirmation) ต่อ
5. ตรวจขั้นยืนยัน โดยนำหลอดที่ให้ผลบวก (เกิดก๊าซ) เกิดขึ้นมาเขย่าเบาๆ แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อซึ่งเผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ห่วง (Loop) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ brilliant green broth 2% ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง ตรวจดูการเกิดก๊าซและบันทึกผล
6. คำนวณค่าเอ็มพีเอ็นต่อกรัม (MPN/g) ของโคลิฟอร์มจากจำนวนหลอดอาหาร brilliant green broth 2% ที่ให้ผลบวก (มีก๊าซเกิดขึ้น) ตามตารางที่ ข-1 ในภาคผนวก ข

3.3.1.4 *Escherichia coli (E. coli)* (BAM, 1998)

1. นำหลอดอาหาร lauryl sulfate tryptose broth ที่มีก๊าซเกิดขึ้นมาเขย่าเบาๆ ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อ เขี่ยเชื้อจำนวน 1 ห่วง (Loop) ลงในหลอดอาหาร EC broth ที่บรรจุหลอดดักก๊าซ นำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 45.5 องศาเซลเซียส สังเกตุการเกิดก๊าซหลังการบ่ม หลอดที่เกิดก๊าซให้อ่านค่าเป็นบวก นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN ในตารางที่ ข-1ภาคผนวก ข จะได้ค่า MPN ของ faecal coliform จากตัวอย่างอาหาร 1 กรัม
2. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟฆ่าเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร ECbroth ที่เกิดก๊าซขีดเป็นเส้น (streak) ลงบนผิวหน้าอาหาร Levine-EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีที่มีสีม่วงแดงเข้มมีจุดสีดำตรงกลาง ลักษณะแบน มี metallic sheen

3. ถ่ายเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะตามข้อ 2 จานเพาะเชื้อละ 2 โคโลนี ลงในหลอดอาหาร ที่ plate count agar มีผิวหน้าเอียง โคโลนีละ 2 หลอด บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ้าไม่มีโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตามข้อ 2 ให้เลือกโคโลนีที่ลักษณะใกล้เคียงมากที่สุด จานเพาะเชื้อละ 1 โคโลนี
4. นำเชื้อจากหลอดอาหาร plate count agar ที่บ่มเพาะนาน 18 ชั่วโมง มาย้อมสีกรัมดังนี้
   4.1 หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด
   4.2 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อจากหลอดอาหาร plate count agar นำไปกระจายในหยดน้ำกลั่นบนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อทำให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์
   4.3 หยดสารละลาย gram crystal violet ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
   4.4 หยดสารละลาย gram iodine ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
   4.5 ล้างสี crystal violet ส่วนเกินออกโดยเอียงสไลด์แล้วหยดแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ให้ไหลผ่านสไลด์ 15-30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ
   4.6 หยดสารละลาย gram safranin ลงไปให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ซับน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง
   4.7 ตรวจดูรูปร่าง ลักษณะการเรียงตัว และการติดสีกรัมของเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ถ้าพบเชื้อที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นและกลม ติดสีกรัมลบ ไม่มีสปอร์ ให้นำหลอดอาหาร plate count agar ที่เหลืออีกหลอดหนึ่งไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

- **การทดสอบ Indole** - เพาะเชื้อลงใน tryptone broth บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยด kovac's reagent 1-2 หยด เมื่อเกิดวงแหวนสีแดงบนผิวด้านบนของหลอดอาหารแสดงว่าเกิดการสร้างอินโดล รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) ถ้าเป็นสีเหลืองแสดงว่าไม่มีการสร้างอินโดล รายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)
- **การทดสอบ Voges-Proskauer (VP)** - เพาะเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลอง ขนาด 13x100 มิลลิเมตร ทดสอบ VP โดยเติมสารละลาย α-naphthol solution จำนวน 0.6 มิลลิลิตร และสารละลาย potassium hydroxide ความเข้มข้น 40% จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ถ้ามีสีชมพูหรือม่วงเกิดขึ้น รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนสี รายงานผลการทดสอบเป็นลบ(Negative)

- **การทดสอบ Methyl red** - นำ MR-VP medium ที่เหลือไปทดสอบปฏิกิริยา methyl red โดยหยด methyl red solution จำนวน 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน เมื่อมีสีแดงเกิดขึ้น รายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) ถ้าเป็นสีเหลืองรายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)
- **การทดสอบ Citrate** - เพาะเชื้อในอาหารเอียง simmons citrate agar โดยการแทง (stab) ลงในวุ้น และขีดเป็นเส้นบนผิวหน้าของอาหารวุ้น บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง นำไปอ่านผลโดยดูการเปลี่ยนสีของบรอมไทมอลบลู ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีรายงานผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) และถ้าสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลงรายงานผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)

คำนวณค่า MPN ของ *E. coli* โดยเทียบค่าจากตาราง MPN ในตารางข-1 ภาคผนวก ข จากเชื้อที่ติดสีกรัมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่มีสปอร์ ทำให้เกิดก๊าซจากน้ำตาลแลคโตส และให้ผลการทดสอบ IMViC (indole, methyl red, Voges-Proslauer และ citrate) เป็น ++-- หรือ -+--

Coliforms	Indole	Methyl Red	Voges-Proskauer	Citrate
Escherichia coli	+/-	+	-	-

3.3.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและเบนโซอิก (AOAC, 2000)

สุ่มตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มจากตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ 6 แห่ง รวมทั้งสิ้น 34 รายๆ ละ 2 ครั้ง โดยเว้นระยะห่างของการสุ่มตรวจ 2 สัปดาห์ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณวัตถุกันเสีย (กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก) ครั้งละ 2 ซ้ำโดยเครื่อง HPLC ดังรายละเอียดต่อไปนี้

HPLC: SHIMADZU; JAPAN

คอลัมน์: C18 ODS-3 เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 ไมโครเมตร ความกว้างขนาด 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การ์ด คอลัมน์: Inertsil ODS-3 เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 ไมโครเมตร ความกว้างขนาด 4.0 มิลลิเมตร ความยาว 10 มิลลิเมตร

เฟสเคลื่อนที่: แอมโมเนียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ต่อ เมทานอล อัตราส่วน 60:40

ปริมาณการฉีดต่อครั้ง: 20 ไมโครลิตร

อัตราการไหล: 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องแปลผลยูวีที่ความยาวคลื่น: 235 นาโนเมตร

ดีเทคเตอร์: โฟโต้ ไดโอด แอเร (photo diode array; PDA)

3.3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution)

1. กรดเบนโซอิก 5,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm)
   ละลายกรดเบนโซอิก 0.5025 กรัมด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักสารคิดตามความบริสุทธิ์ เบนโซอิกมีความบริสุทธิ์ 99.5%)
2. กรดซอร์บิก 5,000 ส่วนในล้านส่วน
   ละลายกรดซอร์บิก 0.5050 กรัมด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักสารคิดตามความบริสุทธิ์ ซอร์บิกมีความบริสุทธิ์ 99%)
3. ผสมสารละลายมาตรฐาน1,000ส่วนในล้านส่วน (ppm) โดยปิเปต กรดเบนโซอิก 5,000 ส่วนในล้านส่วน และ กรดซอร์บิก 5,000 ส่วนในล้านส่วน อย่างละ10 มิลลิลิตรมาผสมกัน ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 50 มิลลิลิตร
4. เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10, 30, 50, 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน โดยปิเปตสารละลายความเข้มข้น 1,000ส่วนในล้านส่วน มา 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชาสำหรับเก็บไว้ใช้งานต่อไป
5. กรองด้วยชุดกรอง Syringe Filter แผ่นเมมเบรน CA 0.45 μm x 13 mm. ก่อนฉีดเข้าเครื่อง

3.3.2.2 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

1. สารละลายเมทานอลกรองด้วยชุดกรองเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 mm. แผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน
2. สารละลายแอมโมเนียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ละลายแอมโมเนียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.38 กรัม ในน้ำ HPLC Grade ปรับปริมาตรให้ครบ500 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรดด่างด้วยกรดอะซีติกจนค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 4.5-4.6 กรองด้วยชุดกรองเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 mm. แผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3.3.2.3 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในตัวอย่าง

1. ใช้เครื่องปั่นปั่นตัวอย่างอาหารให้ละเอียด
2. ชั่งตัวอย่างอาหารน้ำหนัก 2 กรัมโดยประมาณ เติมเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วย เมทานอล เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
3. รินส่วนใสมากรองด้วยชุดกรอง Syringe Filter แผ่นเมมเบรน CA 0.45 µm x 13 mm. ก่อนฉีดเข้าเครื่อง
4. ฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10, 30, 50, 70 และ 90 ส่วนในล้านส่วน ที่ผ่านการกรองด้วย ชุดกรอง Syringe Filter แผ่นเมมเบรน CA 0.45 µm x 13 mm. เข้าเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร
5. สร้างกราฟมาตรฐานของสารสารละลายมาตรฐาน
6. ฉีดสารละลายตัวอย่าง ที่ผ่านการกรองด้วย ชุดกรอง Syringe Filter แผ่นเมมเบรน CA 0.45 µm x 13 mm. เข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
7. เปรียบเทียบปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้กับกราฟมาตรฐาน
8. เครื่องจะประมวลผลแสดงปริมาณสารออกมาในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

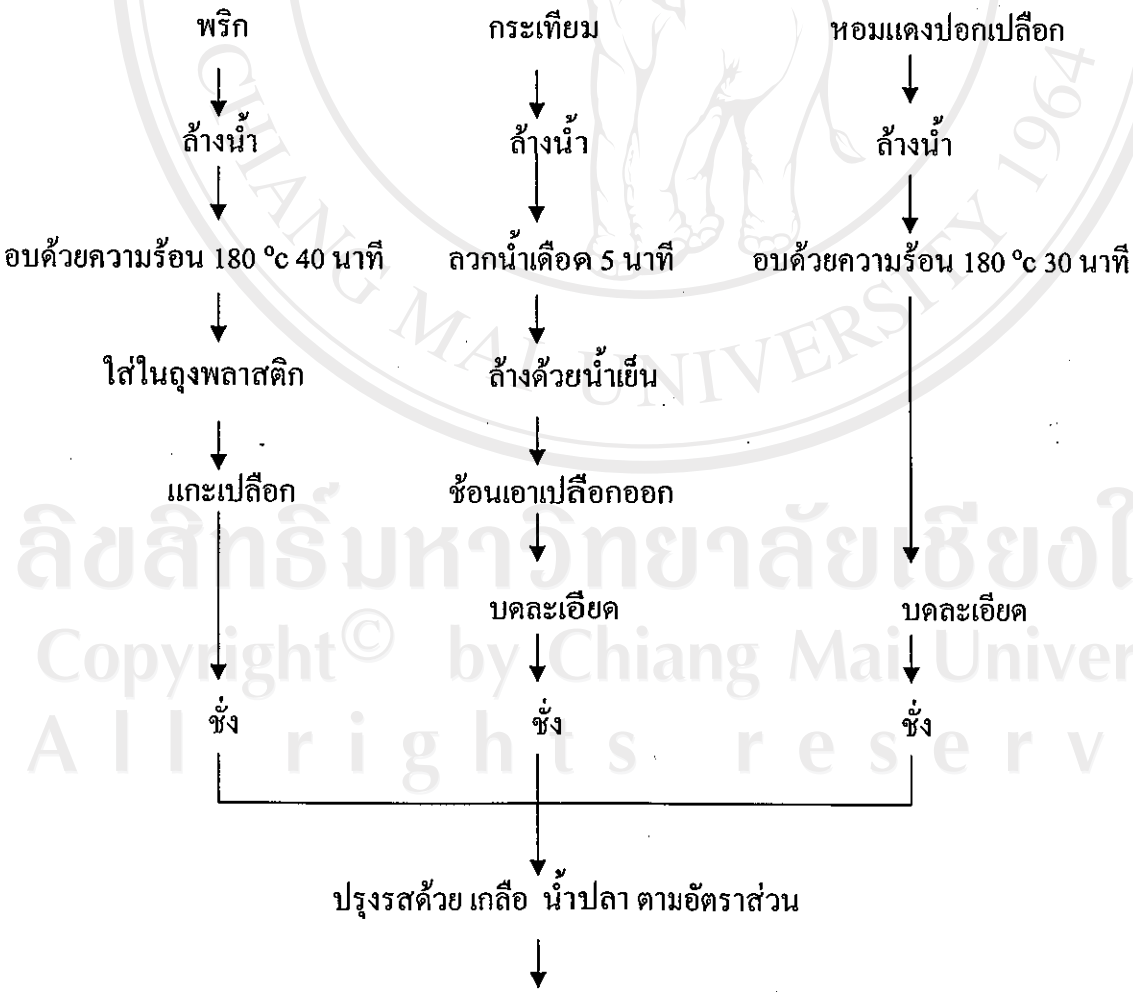
3.3.3 ถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับจีเอ็มพีแก่ผู้ประกอบการน้ำพริกหนุ่ม

จัดอบรมเชิงปฏิบัติการ เพื่อให้ความรู้ด้านสุขลักษณะที่ดีในการผลิตแก่ผู้ประกอบการเพื่อปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องในกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานตามหลักเกณฑ์ของ จีเอ็มพี ประชาสัมพันธ์โครงการฝึกอบรม "การถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับสุขลักษณะที่ดีของการผลิต (จีเอ็มพี) แก่ผู้ประกอบการน้ำพริกหนุ่ม" โดยมีจดหมายเชิญพร้อมเอกสารตอบรับให้แก่ผู้ประกอบการน้ำพริกหนุ่มในจังหวัดเชียงใหม่ ทั้งขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ ในตลาด 9 แห่ง ได้แก่ ตลาดต้นพยอม วโรรส ต้นลำไย ศิริวัฒนา รวมโชค หนองหอย สันป่าข่อย สมเพชร และตลาดสันทราย การอบรมแบ่งเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3.1 การอบรมภาคทฤษฎี เกี่ยวกับหลักการของระบบจีเอ็มพี และการขออนุญาติด้านอาหาร โดยคุณมโนรมภ์ สินธพอาชากุล เภสัชกร 7 จากกลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นวิทยากรฝึกอบรม

3.3.3.2 การอบรมภาคปฏิบัติ สาธิตการผลิตน้ำพริกหนุ่มที่ถูกต้องตามหลักจีเอ็มพี โดยแบ่งกลุ่มผู้เข้ารับการอบรมเป็น 4 กลุ่มเพื่อผลิตน้ำพริกหนุ่ม วัตถุดิบในการทำน้ำพริกหนุ่ม ได้แก่ พริกสด กระเทียม หอมแดง ซื้อมาจากร้านค้าส่งในตลาดเมืองใหม่ ทำการล้างวัตถุดิบ พริกและหอมแดงนำไปอบในเตาอบที่ความร้อน 180 °c 30 และ 40 นาทีตามลำดับ แกะเปลือกพริก ผสมวัตถุดิบ ได้แก่ พริก หอมแดง กระเทียม เข้าด้วยกันโดยเครื่องผสมปรุงรสด้วยน้ำปลาและเกลือ ในอัตราส่วนพริก 700 กรัม หอมแดง 100 กรัม กระเทียม 100 กรัม น้ำปลา 100 กรัม เกลือ 1 ช้อนโต๊ะ บรรจุน้ำพริกในขวดแก้วขวดละ 170 กรัม นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 31 นาที กระบวนการผลิตดังแสดงในตามแผนผังต่อไปนี้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมด้วยเครื่องผสมความเร็วปานกลาง 5 นาที

↓

บรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 5 ออนซ์ ขวดละ 170 กรัม

↓

ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

3.3.4 ศึกษาการจัดการเกี่ยวกับสุขลักษณะที่ดีของการผลิตของผู้ประกอบการน้ำพริกหนุ่ม

3.3.4.1 ออกสำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสภาพปัจจุบัน และปัญหาของผู้ประกอบการในการผลิตน้ำพริกหนุ่มภายใต้ขอบเขตของหลักเกณฑ์ของจีเอ็มพี ทั้งในด้านสถานที่ตั้งอาคารการผลิตเครื่องมือ เครื่องจักรและอุปกรณ์ในการผลิต การควบคุมกระบวนการผลิต การสุขาภิบาล การบำรุงและรักษาและการทำความสะอาด และบุคลากรและสุขลักษณะผู้ปฏิบัติงาน จากผู้ประกอบการทั้งหมด 4 ราย หลังจากการอบรมจีเอ็มพี โดยคัดเลือกจากผู้ประกอบการที่มีความสมัครใจที่จะให้เข้าเยี่ยมชมโรงงานและกระบวนการผลิต และมีความสนใจที่จะปรับปรุงกระบวนการผลิตให้สอดคล้องตามข้อกำหนดของระบบจีเอ็มพี

3.3.4.2 ตรวจประเมินสถานที่ผลิตอาหารตามหลักเกณฑ์ของจีเอ็มพี 2 ครั้ง คือก่อนและหลังปรับปรุงการผลิตโดยใช้แบบประเมินของกองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข (แบบ ตส.1) โดยเน้นถึงพัฒนาการของสถานประกอบการในการนำหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหารไปประยุกต์ใช้ เพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐานตามหลักเกณฑ์ของจีเอ็มพี

3.3.4.3 สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำพริกหนุ่มตรวจหาคุณภาพทางจุลินทรีย์และเคมีเป็นระยะๆ โดยทำการสุ่มตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 3 สัปดาห์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงด้านสุขลักษณะ และการรักษามาตรฐานการผลิตด้วยการตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางเคมี เช่นเดียวกับข้อที่ 3.3.1 และ 3.3.2

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเก็บตัวอย่างแบบสำรวจหลังจากตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีแล้วจะนำข้อมูลที่ได้มานำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นอกจากนี้ข้อมูลในส่วนของการประเมินโรงงาน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสถานประกอบการในการนำหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหารไปประยุกต์ใช้ ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 11.0 โดยทดสอบความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved