

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

3.1 รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาแบบเชิงสำรวจ (Survey research) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินและความชื้นในพริกแห้งป่นที่จำหน่ายในตลาดเทศบาล จังหวัดลำปาง ในรูปแบบการจำหน่าย 3 รูปแบบ คือแบบคั๊กแบ่งขาย แบบมัดปิดปากถุงด้วยยางรัด แบบบรรจุถุงพลาสติก และเชื่อมปิดถุงด้วยความร้อน โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 5 ร้านค้า ที่จำหน่ายครบทั้ง 3 รูปแบบ ในระหว่างเดือนมีนาคม ถึง เมษายน พ.ศ. 2545

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

3.2.1 ขอบเขตของประชากร

ประชากรของพริกแห้งป่นที่นำมาศึกษา เป็นพริกแห้งป่นที่จำหน่ายในตลาดเทศบาล 1 (ภาค ออมสิน)และตลาดเทศบาล 2 (ภาคอัสวิน) เขตเทศบาลเมือง จังหวัดลำปาง มีร้านค้าจำหน่ายพริกแห้งป่นทั้ง 2 ตลาด จำนวน 5 ร้านค้า ที่จำหน่ายทั้ง 3 รูปแบบและพริกแห้งเม็ดใหญ่ ที่ตั้งวางจำหน่ายในระหว่างเดือน มีนาคม – เมษายน พ.ศ. 2545

3.2.2 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างของพริกแห้งป่นและพริกแห้งเม็ดใหญ่ที่นำมาวิเคราะห์ โดยเก็บตัวอย่างจากร้านค้าต่าง ๆ ที่จำหน่ายพริกแห้งป่นในรูปแบบที่จำหน่ายครบทั้ง 3 แบบ คือแบบคั๊กแบ่งขาย แบบมัดปิดปากถุงด้วยยางรัด และแบบบรรจุถุงพลาสติกแล้วเชื่อมปิดถุงด้วยความร้อน ที่มีวางจำหน่ายในเขตตลาดเทศบาล จังหวัดลำปาง ซึ่งมี 5 ร้านค้า โดยนำตัวอย่างพริกแห้งป่นมาร้านค้าละ 3 รูปแบบรูปแบบละ 100 กรัม หรือ 1 ถุง รวมพริกแห้งป่นทั้งหมด 15 ตัวอย่าง และพริกแห้งเม็ดใหญ่ที่มีสภาพ 3 รูปแบบคือ พริกแห้งเม็ดใหญ่สภาพปกติ พริกแห้งเม็ดใหญ่ที่มีเชื้อราปรากฏให้เห็น และ พริกแห้งเม็ดใหญ่ที่คัดเชื้อราปรากฏให้เห็นทิ้งแล้ว ในช่วงเดือน มีนาคม – เมษายน พ.ศ. 2545

3.3 วิธีเก็บตัวอย่าง

พริกแห้งป่นที่ซื้อมาจากตลาดเทศบาลจังหวัดลำปาง ร้านค้าละ 100 กรัมหรือ 1 ถุงและพยายามรักษาอุณหภูมิระหว่างรอส่งวิเคราะห์ไม่ให้สูงกว่า 5 องศาเซลเซียส (เก็บในตู้เย็นหรือห้องเย็น) ถ้าพบว่าถุงจำหน่ายใดมีเชื้อราขึ้นให้แยกถุงนั้นออกก่อน

สำหรับการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าต่าง ๆ ที่เก็บมาต้องเป็นตัวแทนที่แท้จริงของพริกแห้งป่น (โดยนำพริกแห้งป่นในแต่ละแบบของการจำหน่ายมารวมกันแล้วผสมให้เข้ากันและตักสุ่มแยกออกมาตามจำนวนที่ใช้ทดสอบ) เพื่อให้ตัวอย่างพริกแห้งป่นคงสภาพเหมือนในขณะเก็บ ไม่สลายตัว เน่าเสียหรือเกิดเชื้อราเพิ่มขึ้น ขณะการเก็บรักษา ภาชนะที่ใช้ในการบรรจุต้องสะอาด มีความทนทานและปิดได้สนิทเพื่อป้องกันการปะปนจากภายนอกและไม่ถูกทำลายในระหว่างการส่งตัวอย่าง ตัวอย่างพริกแห้งป่นคนละชนิด ต้องแยกบรรจุต่างกัน พริกแห้งป่นที่บรรจุในถุงพลาสติก ถุงพลาสติก ต้องแห้งสะอาดและปิดสนิท ตัวอย่างพริกแห้งป่นที่ต้องการตรวจสอบหาอะฟลาทอกซินจากเชื้อราควรนำส่งในทันทีที่เก็บตัวอย่างพริกแห้งป่นเพื่อป้องกันการสร้างอะฟลาทอกซินเพิ่มเติม

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชุดวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน Veratox[®] ของบริษัท NEOGEN CORPORATION CO., LTD. มีความสามารถในการตรวจสอบละเอียดถึง 1 ppb.

3.4.1 ชุดวิเคราะห์

1. Antibody – coated Microwell (well ที่ไม่มีเครื่องหมายสีแดง)
2. Red – Marked Mixing Well (well ที่มีเครื่องหมายสีแดง)
3. Control ความเข้มข้น 0 5 15 และ 50 ppb. บรรจุในขวดติดฉลากสีเหลือง
4. Congugate บรรจุในขวดติดฉลากสีฟ้า
5. Substrate บรรจุในขวดที่ติดฉลากสีเขียว
6. Red – Stopping บรรจุในขวดที่ติดฉลากสีแดง

3.4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เมทธานอลเกรด ACS	น้ำกลั่น
ภาชนะบรรจุตัวอย่างการสกัดและบีกเกอร์ หรือฟาส	กระบอกตวง
กระดาษกรอง Whatman # 1	กรวยกรอง
เครื่องปั่นความเร็ว 1 ลิตร	เครื่องบด
เครื่องชั่ง	ปิเปต
กระดาษซับน้ำหรือวัสดุที่ใช้แทนกันได้	Microwell holder
Reagent boat	นาฬิกาจับเวลา

3.5 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่าง

3.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

การสุ่มตัวอย่างพริกแห้งป่นเพื่อทำการวิเคราะห์ โดยนำพริกแห้งป่นทั้งหมดในแต่ละชนิดของการบรรจุหรือจำหน่ายมาผสมกันแล้วทำการสุ่มอีกครั้งหนึ่งในปริมาณ 50 กรัม ก่อนที่จะนำพริกแห้งป่นมาทำการสกัด และเก็บรักษาพริกแห้งป่นที่ยังไม่ได้ใช้ ที่อุณหภูมิระหว่าง 2 – 8 องศาเซลเซียส

3.5.2 การสกัดตัวอย่าง

1. การเตรียม เมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เมทธานอล ACS grade 7 ส่วน ผสมน้ำกลั่น 3 ส่วน
2. นำตัวอย่างพริกแห้งป่นมาคดโดยประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างให้ละเอียดขนาด 20 mesh หรือเท่าผงกาแฟสำเร็จรูป
3. ผสมตัวอย่างพริกแห้งป่น 50 กรัม กับเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 250 มิลลิลิตร ปั่นโดยใช้เครื่องปั่น 2 นาที
4. กรองด้วยกระดาษกรองหรือวัสดุที่ใช้แทนกันได้ให้ได้อย่างน้อย 5-15 มิลลิลิตร
5. ตัวอย่างที่สกัดได้ใช้ตรวจหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน

3.6 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. นำ Red- Marked Mixing well จำนวน 1 well ต่อ 1 ตัวอย่าง รวม control อีก 4 well ที่ความเข้มข้น 0 5 15 และ 50 ppb. ตามลำดับใส่เข้าไปในล๊อคของ Microwell holder
2. นำ Antibody – coated Well มาเท่ากับจำนวนของ Mixing well ในข้อที่ 1 ใส่ในล๊อค Microwell holder ทำเครื่องหมายไว้ที่ด้านข้างเพื่อป้องกันการสลับตัวอย่าง เก็บ well ที่ไม่ได้ใช้ใส่ของฟอยล์พร้อมสารดูดความชื้น ปิดให้สนิท
3. จุด conjugate จากขวดที่ติดฉลากสีฟ้าลงใน Mixing well ใส่ well ละ 100 ul ใช้ทิปใหม่ทุกครั้งจุดตัวอย่างที่สกัดได้รวมทั้ง Control 100 ul ใส่ลงใน mixing well
4. ใช้ปิเปต ผสมส่วนผสม โดยจุด ขึ้น-ลง 3 ครั้ง จากนั้นย้ายส่วนผสม 100 ul ใส่ใน Antibody - coated Well เขย่าโดยการเลื่อนไปมาในแนวราบประมาณ 10 - 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (18 –30 องศาเซลเซียส) ที่ Mixing well
5. ล้าง Antibody – coated well ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 5 ครั้ง จากนั้นนำมาเคาะเบา ๆ ให้หยดน้ำหมดบนผ้าหรือแผ่นกระดาษซับน้ำ
6. เปลี่ยนทิปใหม่ จุด Substrate ที่บรรจุในขวดติดฉลากสีเขียว ปริมาณ 100 ul ใส่ลงไปในแต่ละ well เขย่าเบา ๆ 10 - 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

7. เติม Red stopping ที่บรรจุในขวดติดฉลากสีแดง จำนวน 100 ml ในทุก well
8. เขย่าเบา ๆ เช็ดด้านล่างของ well ให้แห้ง สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใน 20 นาที

3.7 การหาคุณภาพ การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบตัวอย่างพริกแห้งป่นและพริกแห้งเม็ดใหญ่เพื่อหาปริมาณอะฟลาทอกซิน และทำการตรวจสอบโดยการอ่านผลการวิเคราะห์ซึ่งกระทำโดยเจ้าหน้าที่คนเดียวกันตลอดการ ทดลอง เมื่อตรวจสอบพบอะฟลาทอกซินในพริกแห้งป่น ต้องนำตัวอย่างนั้นมายืนยันโดยการทำการ ทดสอบซ้ำอีกครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยช่วงของปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบ ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นใน การทดสอบไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าค่าที่ได้มีความแม่นยำ

3.8 วิธีการเก็บตัวอย่างข้อมูลและสถานที่วิเคราะห์

การตรวจหาสารอะฟลาทอกซินในครั้งนี้ เป็นการศึกษาระดมทุน (survey research) โดยการ เก็บตัวอย่างพริกแห้งป่น จากร้านค้าที่วางจำหน่ายครบทั้ง 3 รูปแบบ มาจำนวน 5 ร้านค้า แล้วเอาแต่ละ รูปแบบมาผสมกัน แล้วส่งพริกแห้งป่นและพริกแห้งเม็ดใหญ่ไปตรวจหาอะฟลาทอกซิน ที่มีอยู่ใน พริกแห้งป่นและตรวจหาอะฟลาทอกซินในพริกแห้งเม็ดใหญ่ในสภาพต่าง ๆ ณ ห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์จุลินทรีย์ แผนกเทคนิคอาหาร บริษัทลำปางฟู๊ดโปรดักส์ จำกัด จังหวัดลำปาง

3.9 วิธีการแปรผลข้อมูล และหน่วยที่ใช้

3.9.1 การอ่านผลจากการวิเคราะห์

สีของตัวอย่างอ่อนกว่า Control – ตัวอย่างมีปริมาณสารพิษมากกว่า Control

สีของตัวอย่างเข้มกว่า Control – ตัวอย่างมีปริมาณสารพิษน้อยกว่า Control

3.9.2 หน่วยที่ใช้

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน ในหน่วยของ ppb. หรือ หนึ่งส่วน ในพันล้านส่วนของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ในพริกแห้งป่นที่นำมาตรวจสอบ

3.10 วิธีการหาความชื้น

การให้ความร้อนอบพริกแห้งป่นเพื่อระเหยน้ำที่มีอยู่ในพริกแห้งป่นจนของแข็งหรือพริกแห้ง ป่นที่ต้องการหาความชื้นเหลือมีน้ำหนักคงที่

3.10.1 ตัวอย่างของพริกแห้งป่น

นำพริกแห้งป่น หรือพริกแห้งเม็ดใหญ่มาป่นให้ละเอียดแบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ตามลักษณะที่ เก็บมาเพื่อทำการวิเคราะห์หาความชื้น

3.10.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
2. งานอดูมิเนียมก้นดินพร้อมฝาปิด
3. ตู้อบไฟฟ้า
4. โถแก้วดูดความชื้น
5. คีม

3.10.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. นำงาน ออดูมิเนียมพร้อมฝาซึ่งล้างสะอาดมาเขียนหมายเลขงานกับฝาให้ตรงกันแล้วนำไปอบในตู้อบโดยเปิดฝาวางไว้ใกล้ ๆ งาน ใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
2. เมื่อครบเวลาให้ใช้คีมคีบฝาปิดงาน นำมาใส่ในโถแก้วดูดความชื้น รอจนอุณหภูมิเย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้องจึงทำการชั่งน้ำหนัก
3. ชั่งพริกแห้งป่นประมาณ 20 กรัม (อย่างละเอียด) ใสลงในงานอดูมิเนียม
4. นำงานที่บรรจุพริกแห้งป่นแล้วเข้าอบในตู้อบ โดยเปิดฝาวางไว้ใกล้ ๆ งาน โดยใช้ อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
5. เมื่อครบเวลาให้ใช้คีมคีบฝาปิดงาน นำมาใส่ในโถแก้วดูดความชื้น รอจนกระทั่ง อุณหภูมิเย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จึงทำการชั่งน้ำหนัก
6. หลังจากชั่งน้ำหนักเสร็จ ให้นำไปอบซ้ำอีกประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วทำเช่นเดียวกับข้อที่ 5 เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอีก ข้อมูลที่ได้จะเป็นน้ำหนักที่สูญเสียไปที่ใช้คำนวณหาปริมาณความชื้นตามสูตรดังนี้

3.10.4 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{\text{นน.ที่หายไป (กรัม)}}{\text{นน. ตัวอย่างพริกแห้งป่น (กรัม)}} \times 100$$