บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วย 5 ขั้นตอนคือ การเตรียมตัวอย่าง การเตรียมเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ การวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ แต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดในการดำเนินการดังต่อไปนี้

1. <u>การเตรียมตัวอย่าง</u> แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนย่อยคือ

1.1 ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลองมี 2 พันธุ์คือ พันธุ์สุวรรณ 1 และพันธุ์สุวรรรณ 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อการส่งออกของไทย อย่างละ 60 กิโลกรัม ข้าวโพดทั้ง 2 พันธุ์นี้ได้มาจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ข้าวโพดแต่ละพันธุ์ได้ผ่านการอบแห้งมาแล้ว เมื่อนำมาวัดความชื้นในเมล็ดโดยใช้เครื่องวัดความชื้นในเมล็ด พบว่าข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 และพันธุ์สุวรรณ 2 มีความชื้นในเมล็ดเป็นร้อยละ 10.17 และ 11.61 ตามลำดับ แบ่งข้าวโพดแต่ละพันธุ์มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยวิธี Contaminant Branch (CB) ของ Food and Drug Administration ใน Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1980 (54) จำนวน 2 ซ้ำ พบว่าข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 มีปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 เป็น 58.82 ppb และมีชนิด B_2 อยู่ 3.91 ppb ส่วนข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 2 มีแอฟฟลาทอกซิน B_1 จำนวน 0.01 ppb และมีชนิด B_2 อยู่ 0.1 ppb

1.2 นำเชื้อรา <u>Aspergillus flavus</u> ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar จำนวน 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง near ultraviolet (NUV) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Sterile distilled water) ให้มีจำนวนสปอร์ของ <u>A. flavus</u> ประมาณ 10^6 สปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยการหยด Tween 80 ลงไป 2-3 หยด เพื่อให้สปอร์เปียกน้ำได้ดียิ่งขึ้น

ทำให้การวัดจำนวนสปอร์ด้วย Haematometer แม่นยำยิ่งขึ้น ต่อจากนั้นนำน้ำกลั่นที่มีสปอร์ของเชื้อราตามกำหนดมาใส่ลงในข้าวโพดที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อข้าวโพด 1 กิโลกรัม แล้วคลุกเคล้าข้าวโพดเพื่อให้สปอร์ของเชื้อรากระจายตัวไปทั่วข้าวโพด ก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่มีอยู่ในตอนเริ่มต้นการทดลอง โดยวิธี CB ใน AOAC 1980 ดังกล่าวมาข้างต้น พบว่า ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 มีแอฟฟลาทอกซิน B_1 อยู่ 444.62 ppb และชนิด B_2 จำนวน 36.98 ppb และพบว่าข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 2 มีแอฟฟลาทอกซิน B_1 จำนวน 292.86 ppb และชนิด B_2 จำนวน 33.45 ppb

1.3 นำส่วนที่เหลือมาชั่งถุงละ 500 กรัมจำนวน 54 ถุง โดยบรรจุในถุงพลาสติคที่ป้องกันความชื้น นำแต่ละถุงมาปรับความชื้นในเมล็ดให้ได้ร้อยละ 14.5 18 และ 26 ตามลำดับ โดยการเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จำนวนหนึ่งลงไปในข้าวโพด และปิดถุงพลาสติคให้สนิท ด้วยเครื่อง sealer นำข้าวโพดที่มีความชื้นต่าง ๆ กันนี้ไปเก็บไว้ในตู้ที่ปรับอุณหภูมิไว้ 3 ระดับคือ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ ดังนั้นจะได้ข้าวโพดที่แต่ละพันธุ์ที่อุณหภูมิและความชื้น 9 ระดับ ดังนี้

1. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 14.5 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ
2. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 18 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ
3. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 26 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ
4. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 14.5 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ
5. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 18 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ
6. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 26 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ
7. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 14.5 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ

8. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 18 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ

9. ข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ดร้อยละ 26 จำนวน 6 ถุง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ

1.4 เมื่อครบกำหนดตามวันดังกล่าวแล้ว จึงนำข้าวโพดมาวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน ตามวิธีวิเคราะห์ของ AOAC 1980 อีก โดยทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ข้าวโพดที่ครบกำหนดตามเวลาดังกล่าวแล้ว ถ้ายังมิได้วิเคราะห์จะนำไปแช่เย็นไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

2. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์</u>

2.1 เครื่องชั่ง (Mettler analytical balance)

2.2 Chromatographic tube ขนาด 22 x 300 มิลลิเมตร stopcock ทำด้วย teflon

2.3 เครื่องระเหยแบบหมุนที่ความดันต่ำ (Buchii rotary vacuum evaporator)

2.4 High speed TLC scanner cs-920 ของ Shimadzu

2.5 กระดาษกรอง Whatman (No 1) พร้อมกรวยแก้ว

2.6 Wrist-Action Shaker ของ Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, U.S.A.

2.7 Hot Air Oven ของ Memmert, England

2.8 Muffle Furnance Size 3 ของ Gallenkamp, England

2.9 Thin Layer Chromatographic Apparatus

- Thin Layer Precoated Plate No. 5721 ของ E. Merck ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร
- Micro-syringe ขนาด 10 µl และ 25 µl ของ Hamilton
- Desiccating Storage Cabinet

2.10 เครื่อง Scaler Model 310 ของ Master Mfg. Co. Ltd.

2.11 เครื่องวัดความชื้นในเมล็ด (Electronic Moisture Tester) ของ Fred Stein Laboratories, Inc. Atchison, Kansas, U.S.A.

2.12 Haematometer ของ Olympus, Tokyo Japan

2.13 เครื่องบดข้าวโพด Lister ของ R.A. Lister Farm Equipment Ltd. England

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1 Standard aflatoxin B_1 และ B_2 ของ Makor Chemicals Ltd. Jerusalem, Israel

3.2 Chloroform เป็น analytical reagent ผลิตโดย E. Merck

3.3 Anhydrous sodium sulfate เป็น analytical reagent ผลิตโดย Fluka-garantic

3.4 Glass wool ผลิตโดย British Drug House Chemical Ltd.

3.5 Silica gel 60 for Column Chromatography เป็น analytical reagent ผลิตโดย E.Merck

3.6 Hexane เป็น analytical reagent ผลิตโดย J.T. Baker Chemical Co.

3.7 Ether, anhydrous เป็น analytical reagent ผลิตโดย J.T. Baker Chemical Co.

3.8 Methanol, absolute เป็น analytical reagent ผลิตโดย J.T. Baker Chemical Co.

3.9 Benzene เป็น analytical reagent ผลิตโดย E.Merck

3.10 Acetonitrile เป็น analytical reagent ผลิตโดย E.Merck

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Benzene-acetonitrile mixture (98 + 2)

2. Chloroform-methanol mixture (97 + 3)

3. Ether-methanol-water mixture (96 + 3 + 1)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน

นำข้าวโพดมาวิเคราะห์หาปริมาณของ aflatoxin B_1 และ B_2 โดยวิธี CB ใน AOAC 1980 ดังนี้

4.1 เตรียม column chromatography ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตร ชั้นล่างสุดประกอบด้วย glass wool ก้อนเล็ก ๆ ถัดขึ้นมาเป็นชั้นของ anhydrous sodium sulfate จำนวน 5 กรัม ถัดขึ้นมาอีกเป็นชั้นของ silica gel จำนวน 10 กรัม ต่อมาเป็นชั้นของ anhydrous sodium sulfate จำนวน 15 กรัม ในระหว่างที่เตรียม column นี้ จะใช้ chloroform เป็นตัวช่วยให้ anhydrous sodium sulfate และ silica gel ตกตะกอนลงมาได้เร็วขึ้น และต้องระวังอย่าให้ column แห้ง

4.2 บดข้าวโพดที่จะวิเคราะห์ให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดพืช แล้วนำข้าวโพดมาชั่งตัวอย่างละ 50 กรัมนำมาใส่ Flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่น้ำ 20 มิลลิลิตรแล้วใส่ chloroform 200 มิลลิลิตรปิดจุก แล้วนำมาเขย่าบน Shaking machine 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บของเหลวใสโดยใช้ cylinder รองรับ ในระหว่างกรองให้ใช้กระจกนาฬิกาปิดบนกรวยแก้ว เพื่อป้องกันมิให้ chloroform ระเหยไป เก็บเอาของเหลวใสจำนวน 40 มิลลิลิตร (equivalent กับ sample จำนวน 10 gm) มาผ่าน column

4.3 นำของเหลวจำนวน 40 มิลลิลิตร ที่กรองได้มาผ่าน column พอใกล้หมดให้ผ่าน hexane จำนวน 150 มิลลิลิตรลงใน column จากนั้นผ่าน ether ลงใน column จำนวน 150 มิลลิลิตร พอ ether ใกล้หมดเปลี่ยนที่รองรับของเหลวใหม่เป็นขวดแก้วก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วผ่าน eluting agent คือ chloroform-methanol (97 + 3) ซึ่งเตรียมใหม่ ๆ จำนวน 150 มิลลิลิตรลงไปใน column นำของเหลวที่รองรับได้ในขวดก้นกลมมาระเหย โดยใช้เครื่อง rotary vacuum evaporator โดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส หรือประมาณ 35 องศาเซลเซียส เมื่อใกล้แห้งใช้ pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดของเหลวออกมาใส่ในขวดแก้วรูป pear shape ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วล้างที่เหลือด้วย chloroform จำนวน 5 มิลลิลิตร นำ toxin ที่สกัดได้ในขวด pear shape ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator อีกครั้งหนึ่ง ให้เหลือ toxin เป็นฟิล์มแห้งติดอยู่ก้นขวด

4.4 Thin layer chromatography

นำ toxin ที่ได้มาละลายใน chloroform ที่ทราบปริมาตร แล้วมาทำ Thin layer chromatography โดยเทียบกับ standard aflatoxin B_1 และ B_2 โดยใช้ ether-methanol-water (96 + 3 + 1) ซึ่งเตรียมใหม่ ๆ จำนวน 100 มิลลิลิตร เป็น developing agent

นำ plate ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ solvent ระเหยไป นำ plate มาดูการเรืองแสงใน uv light ถ้ามี aflatoxin B_1 และ B_2 จะเกิดเรืองแสงสีฟ้าขึ้น

นำ plate ไปหาปริมาณของ aflatoxin B_1 และ B_2 โดยใช้เครื่อง TLC Scanner

4.5 การคำนวณหาปริมาณ aflatoxin (หน่วยเป็น ppb)

$$\text{ปริมาณ aflatoxin} = \frac{A}{B} \times \text{concentration of standard (mg/ml)} \times \frac{\text{dilution factor}}{10}$$

A คือความสูงของ peak ของ sample เมื่อ spot 1 µl

B คือความสูงของ peak ของ standard เมื่อ spot 1 µl

5. <u>วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

ผลของการทดลองที่ได้จะทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Factorial Analysis of Variance