

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากร

3.1.1. โรงงานผลิตอาหารชั้นสำหรับโคนม คัดเลือกโรงงานผลิตอาหารชั้นที่สามารถให้ความร่วมมือได้จำนวน 3 โรงงาน

3.1.2 อาหารโคนม เก็บตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ทุกชนิดในแต่ละโรงงานที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตเป็นอาหารชั้นสำหรับโคนม โดยวัตถุดิบเหล่านั้นต้องเป็นวัตถุดิบที่เก็บรักษาไว้ในโรงงานเท่านั้น ตัวอย่างอาหารชั้น ต้องเป็นอาหารชุดที่ใช้วัตถุดิบที่เก็บตัวอย่างไว้แล้วเป็นส่วนผสมและเก็บตัวอย่างชั้นทันทีที่ผลิตเสร็จ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างนาน 4 เดือนและเก็บเป็นจำนวน 8 ครั้ง/โรงงาน ได้จำนวนตัวอย่างอาหารทั้งหมด 185 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างวัตถุดิบ 161 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารชั้นจำนวน 24 ตัวอย่าง

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง ประกอบด้วย

3.2.1.1 ถุงพลาสติกแบบมีซิปล็อค ขนาดบรรจุ 2 กิโลกรัม

3.2.1.2 อุปกรณ์สำหรับแทงเก็บวัตถุดิบ (probe)

3.2.1.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -10°C สำหรับเก็บตัวอย่าง

3.2.1.4 น้ำแข็งชนิดเป็นเจลและกล่องโฟม

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน

3.2.2.1 Immunoaffinity column (Aflatest[®] P column, Vicam, USA)

3.2.2.2 Fluorometer (Series 4, Vicam, USA)

3.2.2.3 Aflatest[®] Developer (0.001% Bromine solution) (Vicam, USA)

3.2.2.4 Fluorometer calibration standard สำหรับอะฟลาท็อกซิน (Vicam, USA)

3.2.2.5 กระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 24 cm. (Whatman, England)

3.2.2.6 Glass microfiber filter paper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 102 mm. (Type AE, GelmanSciences, USA)

- 3.2.2.7 กรวยแก้วสำหรับกรอง
 - 3.2.2.8 Erlenmyer flash ขนาด 125 cc.
 - 3.2.2.9 ไชริงจ์แก้วขนาด 10 cc.
 - 3.2.2.10 ปิเปต ขนาด 10 cc.
 - 3.2.2.11 บีกเกอร์ ขนาด 250 cc.
 - 3.2.2.12 Fluorometer cuvette ขนาด 12x75 mm.
 - 3.2.2.13 Centrifuge tube แบบพลาสติกพร้อมฝาปิดขนาด 50 cc.
 - 3.2.2.14 Vacuum pump (Model 13156, GelmanSciences, USA)
 - 3.2.2.15 Methanol AR grade และ HPLC grade
 - 3.2.2.16 NaCl
 - 3.2.2.17 น้ำกลั่น
 - 3.2.2.18 ชุดเครื่องปั่นผสมอาหาร
 - 3.2.2.19 เครื่องบดอาหาร
 - 3.2.2.20 เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 3.2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวัดความชื้นสัมพัทธ์และวัดอุณหภูมิ
- 3.2.3.1 เทอร์โมมิเตอร์ (Min-Max Thermometer#210-4411, Novalynx, USA)
 - 3.2.3.2 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์อากาศ (Wet/Dry Bulb hygrometer#225-441732, Novalynx, USA)
 - 3.2.3.3 แบบบันทึกข้อมูล
- 3.2.4 เครื่องมือที่ใช้วัดความชื้น
- 3.2.4.1 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด (Mettler PJ3000, Mettler Toledo, Switzerland)
 - 3.2.4.2 ถ้วยอลูมิเนียมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 mm.และสูง 7 mm.
 - 3.2.4.3 เครื่องตัดหรือบดอาหาร
 - 3.2.4.4 ตู้อบ (Venticell[®] #MMM Medcenter, GS Scherhelt, Germany)
 - 3.2.4.5 เครื่องคิดเลขและแบบบันทึกผล

3.3 วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 การเก็บตัวอย่างวัตถุดิบและอาหาร

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ ประยุกต์วิธีการเก็บตัวอย่างตามระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยวิธีการเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์เป็นตัวอย่างเพื่อทดสอบ ตรวจหรือวิเคราะห์คุณภาพ (ฉบับที่ 1) พ.ศ. 2528 และ Directive 98/53/EC (EC, 1998) เพื่อความถูกต้องและเป็นไปได้โดยสะดวกในการปฏิบัติซึ่งมีวิธีดำเนินการดังนี้ เมื่อวัตถุดิบชนิดนั้นมีปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15 ตัน การสุ่มเก็บตัวอย่างควรเก็บอย่างน้อย 10 ตำแหน่งจากกองวัตถุดิบเดียวกันหรือไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 ของจำนวนกระสอบทั้งหมด โดยใช้ Probe แทงลงไปกองวัตถุดิบลึกอย่างน้อย 50 นิ้ว ในแต่ละตำแหน่ง การแทง Probe แต่ละครั้งจะได้ตัวอย่างวัตถุดิบหนักเฉลี่ย 300 กรัม ปริมาณตัวอย่างวัตถุดิบที่เก็บเพื่อนำมาวิเคราะห์มีปริมาณระหว่าง 2-4 กิโลกรัม วัตถุดิบแต่ละชนิดจะถูกเก็บเป็นจำนวน 2 ครั้ง/1 ชุด นั่นคือ ครั้งที่ 1 เก็บตัวอย่างในวันที่วัตถุดิบเข้าสู่โรงงาน และครั้งที่ 2 ในวันที่นำวัตถุดิบชนิดนั้นไปใช้ผสมเป็นอาหารข้น บรรจุตัวอย่างที่ได้ในถุงพลาสติกแบบมีซิปล็อค ตัวอย่างละ 2 ถุง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการขนส่ง ในระหว่างการขนส่งจากโรงงานมายังห้องปฏิบัติการตัวอย่างจะถูกเก็บไว้ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งชนิดเจล และเมื่อถึงห้องปฏิบัติการตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -10 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.1.2 การเก็บตัวอย่างอาหารข้น ตัวอย่างอาหารข้นที่เก็บเป็นอาหารชุดเดียวกับที่ได้จากการใช้วัตถุดิบที่เก็บตัวอย่างไว้ในข้อ 3.3.1.1 เป็นส่วนประกอบ วิธีการเก็บตัวอย่างปฏิบัติเช่นเดียวกันกับการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน

ตัวอย่างวัตถุดิบและอาหารข้นถูกจัดออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยอาหารข้น ข้าวโพด รำ และมันเส้น กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง กากถั่วเขียว กากมะพร้าว กากปาล์ม กากเบียร์ กากเมล็ดมัน และกากทานตะวัน วัตถุดิบและอาหารข้นทุกชนิดจะทำการวัดผล 2 ครั้งเพื่อความแม่นยำ ตัวอย่างวัตถุดิบและอาหารจะถูกบดให้มีขนาดเล็กลงก่อนที่จะดำเนินการขั้นต่อไป ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.3.2.1 ตัวอย่างวัตถุดิบกลุ่มที่ 1 (อาหารชั้น ข้าวโพด รำ และมันเส้น)

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

- 3.3.2.1.1 ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบและอาหารชั้นที่บดแล้ว 50 g. เติม NaCl 5 g. ใส่ลงในเครื่องปั่นผสมอาหาร
- 3.3.2.1.2 เติม Methanol AR grade ความเข้มข้น 80% ปริมาณ 100 ml.
- 3.3.2.1.3 นำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที
- 3.3.2.1.4 กรองตัวอย่างที่ได้ผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 24 cm. เก็บส่วนที่ได้ไว้ในขวดที่สะอาด

ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างที่สกัด

- 3.3.2.1.5 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาณ 10 ml. ลงใน Centrifuge tube แบบพลาสติก
- 3.3.2.1.6 เติมน้ำกลั่น ปริมาณ 40 ml. ลงในหลอดผสมให้เข้ากัน
- 3.2.2.1.7 กรองตัวอย่างผ่าน Glass microfiber filter paper เก็บส่วนที่ได้ไว้ในหลอดพลาสติกที่สะอาด

ขั้นตอน Aflatest affinity chromatography

- 3.2.2.1.8 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่กรองได้ปริมาณ 10 ml. ลงใน Aflatest[®] P column ปล่อยให้ไหลผ่านที่อัตราเร็ว 1-2 หยด/วินาที จนหมด
- 3.2.2.1.9 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 ml. ลงใน column ปล่อยให้ไหลผ่านที่อัตราเร็ว 1-2 หยด/วินาที จนหมด
- 3.2.2.1.10 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 ml. ลงใน column ซ้ำ อีกครั้ง ปล่อยให้ไหลผ่านที่อัตราเร็ว 1-2 หยด/วินาที จนหมด
- 3.2.2.1.11 เติม Methanol HPLC grade ปริมาณ 1 ml. เพื่อชะอะฟลาที่ออกจากรูออกจาก column เก็บส่วนที่ได้ไว้ใน Fluorometer cuvette
- 3.2.2.1.12 เติม Aflatest[®] Developer ปริมาณ 1 ml. ลงใน cuvette เขย่าให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Fluorometer
- 3.2.2.1.13 ก่อนทำการวัดหาปริมาณอะฟลาที่ออกซินต้อง Calibrate เครื่อง Fluorometer ด้วย Aflatoxin standard ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท Vicam

3.2.2.2 ตัวอย่างวัตถุบิกลุ่มที่ 2 (กากถั่วเหลือง กากถั่วเขียว กากถั่วลิสง กากทานตะวัน กากปาล์ม กากมะพร้าว กากเบียร์ กากเมล็ดนุ่น และกากทานตะวัน)

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

3.2.2.2.1 ชั่งน้ำหนักวัตถุบิและอาหารขั้ที่บดแล้ว 25 g. เติม NaCl 5 g. ใส่ลงในเครื่องปั่นผสมอาหาร

3.2.2.1.2 เติม Methanol AR grade ความเข้มข้น 60% ปริมาณ 125 ml.

3.2.2.1.3 นำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที

3.2.2.1.4 กรองตัวอย่างที่ได้ผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 24 cm. เก็บส่วนที่ได้ไว้ในขวดที่สะอาด

ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างที่สกัด

3.2.2.1.5 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาณ 5 ml. ลงใน Centrifuge tube แบบพลาสติก

3.2.2.1.6 เติมน้ำกลั่น ปริมาณ 20 ml. ลงในหลอดผสมให้เข้ากัน

3.2.2.1.7 กรองตัวอย่างผ่าน Glass microfiber filter paper เก็บส่วนที่ได้ไว้ในหลอดพลาสติกที่สะอาด

ขั้นตอน Aflatest affinity chromatography

3.2.2.1.8 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่กรองได้ปริมาณ 5 ml. ลงใน Aflatest[®] P column ปล่อยให้ไหลผ่านที่อัตราเร็ว 1-2 หยด/วินาที จนหมด

3.2.2.1.9 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 ml. ลงใน column ปล่อยให้ไหลผ่านที่อัตราเร็ว 1-2 หยด/วินาที จนหมด

3.2.2.1.10 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 ml. ลงใน column ซ้ำอีกรั้ง ปล่อยให้ไหลผ่านที่อัตราเร็ว 1-2 หยด/วินาที จนหมด

3.2.2.1.11 เติม Methanol HPLC grade ปริมาณ 1 ml. เพื่อชะอะฟลาที่อกซินออกจาก column เก็บส่วนที่ได้ไว้ใน Fluorometer cuvette

3.2.2.1.12 เติม Aflatest[®] Developer ปริมาณ 1 ml. ลงใน cuvette เขย่าให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Fluorometer

3.2.2.1.13 ก่อนทำการวัดหาปริมาณอะฟลาที่อกซินต้อง Calibrate เครื่อง Fluorometer ด้วย Aflatoxin standard ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท Vicam

3.3.3 การวัดความชื้นของวัตถุดิบ

ใช้วิธี Tradition oven method (Anderson, 1993) ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

- 3.3.3.1 บดวัตถุดิบให้มีขนาดเล็กกว่า ½ นิ้ว
- 3.3.3.2 ชั่งน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียม และบันทึกน้ำหนักที่ได้
- 3.3.3.3 ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบ 50 g. ใส่ในถ้วยอลูมิเนียม กระจายวัตถุดิบให้ทั่วโดยแต่ละจุดต้องไม่หนามากกว่า 1 ½ นิ้ว
- 3.3.3.4 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง และเกลี่ยวัตถุดิบในถ้วยทุก 12-24 ชั่วโมง
- 3.3.3.5 นำออกจากตู้อบไปชั่งน้ำหนักที่เหลือรวมกับน้ำหนักถ้วย บันทึกข้อมูลที่ได้ในครั้งแรกไว้ แล้วนำตัวอย่างไปอบต่อทำซ้ำจำนวน 2 ครั้งจนน้ำหนักสุดท้ายไม่มีการเปลี่ยนแปลง บันทึกผล
- 3.3.3.6 ลบน้ำหนักสุดท้ายที่ได้ด้วยน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียม บันทึกผล
- 3.3.3.7 คำนวณความชื้นวัตถุดิบ ได้ดังนี้

$$\text{ความชื้นวัตถุดิบ(\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสุดท้ายที่ได้(g.)} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (g.)}}$$
- 3.3.3.8 วัตถุดิบแต่ละชนิดถูกวัดความชื้น 2 ครั้งพร้อมกัน โดยความชื้นที่คำนวณได้ในแต่ละครั้งต้องมีค่าไม่แตกต่างกันเกิน 0.15 g./100 g. ตัวอย่าง

3.3.4 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างเก็บรักษาวัตถุดิบ

วิธีการเก็บข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ทำโดยการติดตั้งเทอร์โมมิเตอร์และเครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ไว้บริเวณกลางโรงเก็บวัตถุดิบของ แต่ละโรงงานมีเจ้าหน้าที่ของโรงงาน 1 คนเป็นผู้รับผิดชอบบันทึกข้อมูลในแต่ละวันทำงานตลอดช่วงการศึกษา นำข้อมูลที่ได้มาหาเฉลี่ยอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของวัตถุดิบชนิดนั้นๆ ตามระยะเวลาที่ใช้เก็บรักษาในแต่ละงวด

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูล ตัดข้อมูลที่มีค่าผิดปกติ (Out lier) ออก 3 ข้อมูล และแปลงข้อมูลด้วยเทคนิคทาง Regression เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะพลาที่ออกซินและปัจจัยต่างๆด้วย Pearson's correlation coefficients และ

วิเคราะห์ปัจจัยที่อิทธิพลที่มีผลต่อปริมาณอะฟลาที่ออกซินด้วยวิธี PROC GLM (General linear model procedure) for Unbalance data โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.12 (SAS Institute Inc., Carry, North Carolina. USA)