

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี (Chemicals)

สารมาตรฐาน Aflatoxin B₁ (Sigma-Aldrich Germany A6636, 068K4002), ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na₂HPO₄), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄), โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃), อะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃·6H₂O), ซิงค์อะซีเตต (Zn(CH₃COO)₂·2H₂O), กรดไฮโดรคลอริก (HCl), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), น้ำมันมินเนอรอล (mineral oil), สารกลีเซอรอล (glycerol), เอนไซม์เพพซิน (pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma-Aldrich P700, 077K0661), เอนไซม์น้ำลาย α-amylase (Sigma-Aldrich A3176, 058K0724), แพนครีเอติน (pancreatin, Sigma-Aldrich P1625, 017K1291), สารสกัดน้ำดี (bile extract porcine, Sigma-Aldrich B8631, 037K0196), trifluoroacetic acid (TFA), อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar, อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth, ปิโตรเลียมอีเทอร์ (light petroleum ether, LabScan), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, LabScan), เฮกเซน (hexane, Labscan), เมทานอล (methanol, LabScan), อะซิโตนไนไตรท์ (acetonitrile, LabScan)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ (Instruments)

ชุด Sep-PakVac C18 (500 mg. 3CC) (Waters USA WAT20805, 029138144A), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave), ตู้อบความร้อน (hot air oven), ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet), เครื่องปั่นเหวี่ยง, เครื่องปั่นผสม (vortex), เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (shaking water bath), เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง, เครื่องมือวิเคราะห์ High-performance liquid chromatography (HPLC; Water[®] รุ่น 590), Fluorescence detector (Water[®] รุ่น 470), HPLC column (Gemini-NX, LC-18, 150x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร), ชุดทดสอบ API[®] 50 CHL (*Lactobacillus* API[®] 50 CHL, บริษัท Bio Me'rieux, ประเทศฝรั่งเศส), เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer, เครื่องเขย่าสารด้วยแรงสั่น (sonicator), ตู้ควบคุมความชื้น (dessicator), โกร่งกระเบื้องและลูกบิด, เข็มเย็บ เชื้อปลายห่วง (loops), จานเพาะเชื้อ (petri dish), แท่งแก้วสามเหลี่ยมปากเชื้อ (spreader), เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (micropipette)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)

วิธีการดำเนินการวิจัยประกอบด้วย 4 ส่วน คือ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) การศึกษาหาความสามารถของสายพันธุ์ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักไทยประเภทเนื้อต่อการจับกับ AFB₁ (Binding study) การศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยของ AFB₁ หลังการจับกับ LAB ออกจากอาหาร (ถั่วลิสง) โดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหาร (*In vitro* digestion model study) และการบ่งชี้สายพันธุ์ของ LAB โดยใช้ชุดทดสอบ API[®] 50 CH (Identification of Lactobacillus strain)

3.2.1 การเตรียม LAB ตัวอย่างถั่วลิสง สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และน้ำย่อยเทียมในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร

1) การเตรียม LAB

1.1) LAB เริ่มต้นที่นำมาใช้ ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth นำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS agar โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยก LAB เป็นโคโลนีเดี่ยว

1.2) เมื่อ LAB ถูกแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวแล้ว ใช้เข็มเย็บเชื้อปลายห่วงเย็บเชื้อ LAB จำนวน 1 วง (loop) ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.3) นับจำนวนเชื้อ LAB ให้จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่นำมาใช้ในการทดลองนี้มีจำนวนประมาณ $2.5-3.0 \times 10^9$ CFU/ml โดยนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ spread plate

2) การเตรียมตัวอย่างถั่วลิสง

2.1) คัดแยกตัวอย่างของถั่วลิสงที่ใช้ในการทดลองเพื่อลดการปนเปื้อนของ AFB₁ โดยนำเมล็ดถั่วลิสงมาส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต หากตัวอย่างถั่วลิสงมีการเรืองแสงสีฟ้าหรือน้ำเงินให้คัดตัวอย่างนั้นออก (manual sorting)

2.2) นำตัวอย่างถั่วลิสงที่คัดแยกแล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่งกระเบื้องและลูกบด แล้วเก็บตัวอย่างถั่วลิสงที่เตรียมไว้ในขวดโหลฝาปิดสนิท โดยนำไปวางไว้ที่ตู้ควบคุมความชื้น (dessicator) จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

3) การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffered saline; PBS)

3.1) ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄) ปริมาณ 0.210 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 9.000 กรัมและไดโซเดียมฟอสเฟต (Na₂HPO₄) ปริมาณ 0.726 กรัม

3.2) นำไปละลายลงในน้ำกลั่น พร้อมกับปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ สารละลายมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร เท่ากับ 1 ลิตร

3.3) แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (autoclave)

4) การเตรียมน้ำย่อยเทียมในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร

4.1) น้ำลายเทียม (Simulated Salivary Fluid หรือ SSF, Mark P. Elless et al, 2000) นำไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ปริมาณ 2.38 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 0.19 กรัมและโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 8 กรัม ไปละลายกับน้ำกลั่นและ นำไปปรับค่าความเป็นกรดต่างให้สารละลายมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.75 และปรับ ปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นจึงเติม α -amylase 200 U แล้วคนให้ เข้ากับสารละลาย

4.2) น้ำย่อยเทียมในส่วนของกระเพาะอาหาร (Simulated Gastric Fluid หรือ SGF, USP28) นำโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 2 กรัม ผสมกับเอนไซม์เพพซิน (pepsin) ปริมาณ 3.2 กรัม และนำไปละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 7 มิลลิลิตรและนำไปปรับค่าความเป็น กรดต่างให้สารละลายมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 1.2 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1 ลิตร

4.3) น้ำย่อยเทียมในส่วนของลำไส้เล็ก (Simulated Intestinal Fluid หรือ SIF, USP28) นำโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 6.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 77 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรและเติมแพนครีเอติน (pancreatin) ปริมาณ 10 กรัม แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ สารละลายมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8 ± 0.1

4.4) น้ำดีเทียม (Simulated Bile Fluid หรือ SBF, Mark P. Elless et al, 2000) นำสารสกัดน้ำดีปริมาณ 3 กรัม ละลายในโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 35 มิลลิลิตรและปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

3.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

Method validation เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของ วิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ โดยทำตามการวิเคราะห์ ตาม Guidance for industry, Bioanalytical method validation ของ U.S. FDA (2001) โดยที่ Method validation จะครอบคลุมถึงสมบัติของวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้ Accuracy, Precision, Selectivity, Sensitivity, Limit of detection, Limit of quantitation, Linearity และ Range

1) Method validation ของสารมาตรฐาน AFB₁

เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ โดยแบ่งออกเป็น 6 ความเข้มข้น คือ 1, 5, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล ระเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำอนุพันธ์เรืองแสง AFB₁ ด้วย TFA นำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง HPLC-FL โดยทำการทดสอบตามเงื่อนไขของ Guidance for industry: Bioanalytical method validation ขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA, 2001) ดังนี้

- ความจำเพาะ (selectivity หรือ specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่วิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์

การศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ และ Blank เข้าไปในเครื่อง HPLC-FL แล้วเปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ปรากฏระหว่างฉีดสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ และ Blank เข้าไป

- ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้นขึ้นไป แต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งขึ้นไป นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ กำหนดให้ค่า Correlation coefficient $r \geq 0.990$

การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้น 6 ความเข้มข้น ดังนี้ 1, 5, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจำนวนครั้งที่ใช้ในการฉีดสารของแต่ละความเข้มข้นของการทดลองนี้คือ 8 ครั้ง (n=8)

- การทำซ้ำอย่างแม่นยำ (precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำๆ กัน หลายๆ ครั้ง โดยที่ความแตกต่างของการผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์นี้แสดงเป็นค่า SD หรือ CV (Coefficient of variation; สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน) ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ เข้าไปในเครื่อง HPLC-FL เพื่อดูความแม่นยำของการฉีดสารในแต่ละครั้ง โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้งขึ้นไป นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน AFB₁ ที่ได้จากวิเคราะห์มาคำนวณค่าร้อยละของ CV (%CV) กำหนดให้ค่า %CV ในแต่ละจุดไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด คือ ไม่เกินร้อยละ 2

การคำนวณหา %CV หาได้จากสูตร $\%CV = SD/mean \times 100$

การศึกษาการทำซ้ำอย่างแม่นยำของการทดลองนี้ เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งเป็น 6 ความเข้มข้น ดังนี้ 1, 5, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจำนวนครั้งที่ใช้ในการฉีดสารของแต่ละความเข้มข้นของการทดลองนี้คือ 8 ครั้ง (n=8)

- การหาค่า LOD และ LOQ (Limit of detection and limit of quantification)

LOD (Limit of detection) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ LOQ (Limit of quantification) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้อย่างหรือหาปริมาณได้

การศึกษาหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ เข้าไปในเครื่อง HPLC-FL โดยทำการฉีดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้งขึ้นไป เจือจางสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ และนำสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ ที่เจือจางแล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL จนกว่าเครื่องจะไม่สามารถวัดอัตราส่วนของฟิสิกส์ต่อสัญญาณรบกวนต่อความสูงของสัญญาณรบกวน (Signal to noise ratio, S/N) ได้

สำหรับความเข้มข้นใดที่ทำให้อัตราส่วนความสูงของฟิสิกส์มาตรฐาน AFB₁ มากกว่าสามเท่าของความสูงของสัญญาณรบกวน ถือให้ ณ ความเข้มข้นนั้น เป็นค่า LOD และความเข้มข้นใดที่ทำให้อัตราส่วนความสูงของฟิสิกส์มาตรฐาน AFB₁ มากกว่าสิบเท่าของความสูงของสัญญาณรบกวน ถือให้ ณ ความเข้มข้นนั้น เป็นค่า LOQ

- ความคงตัว (stability) หมายถึง ความคงตัวของสารมาตรฐานที่นำมาใช้ทำการวิเคราะห์ ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลง เช่น สิ่งแวดล้อม เวลา อุณหภูมิ pH เป็นต้น และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะประเมินจากค่าร้อยละความคงตัวของสาร

การศึกษาหาความคงตัวของสารมาตรฐาน AFB₁ ทำได้แบ่งเป็นแบบ 2 แบบคือ การศึกษาแบบระยะสั้น (Short-term): โดยการนำสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมงและนำสารละลายมาตรฐาน AFB₁ นั้นฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC-FL เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารละลายมาตรฐาน AFB₁ โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละความคงตัวของสารมาตรฐาน ซึ่งเทียบกับค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานตั้งต้น

การศึกษาแบบระยะยาว (Long-term): โดยการนำสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน นำสารละลายมาตรฐาน AFB₁ นั้นฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC-FL เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารละลายมาตรฐาน AFB₁ โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละความคงตัวของสารมาตรฐาน ซึ่งเทียบกับค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานตั้งต้น

- 2) Method validation ของวิธีการสกัด AFB₁ ด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction; SPE)

เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งออกเป็น 6 ความเข้มข้น คือ 1, 5, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปสกัดสารละลาย AFB₁ ด้วย SPE column (Sep-Pak®) เตรียม SPE column ก่อนใช้โดยเติม methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และร้อยละ 8 ของ acetonitrile

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผ่านลงใน SPE column และทำซ้ำ 2 ครั้ง ระวังไม่ทำให้ SPE column แห้งในระหว่างการวิเคราะห์ หลังจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ที่เตรียมไว้ผ่านลงใน SPE column โดยให้สารไหลผ่าน SPE column และควบคุมให้อัตราการไหลของสารผ่าน ด้วยความเร็ว 2-3 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นล้าง SPE column ด้วยน้ำเปล่าต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร แล้วทำให้ SPE column แห้ง โดยใช้แรงดูดอากาศช่วย หรือเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ขั้นตอนสุดท้ายจะ (elute) AFB₁ ออกมาจาก SPE column โดยใช้ methanol 2 มิลลิลิตร ทำต่อเนื่องกัน 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำอนุพันธ์เรืองแสง AFB₁ ด้วย TFA นำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง HPLC-FL โดยทำการทดสอบตามเงื่อนไขของ Guidance for industry: Bioanalytical method validation ขององค์การอาหารและยาของ (US FDA, 2001) ดังนี้

- ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้นขึ้นไป นำไปสกัด AFB₁ ด้วย SPE column และนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL โดยแต่ละความเข้มข้นฉีดเข้าอย่างน้อย 3 ครั้งขึ้นไป นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน AFB₁ กำหนดให้ค่า Correlation coefficient $r \geq 0.990$

สำหรับการทดลองนี้ใช้ 5 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 5, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจำนวนครั้งที่ใช้ในการฉีดสารของแต่ละความเข้มข้นของการทดลองนี้คือ 8 ครั้ง (n=8)

- ความแม่นยำของวิธีการสกัดสารมาตรฐาน AFB₁ ที่สกัดด้วย SPE column แต่ละครั้ง (Precision of injection) ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ที่ผ่านการสกัดด้วย SPE column เข้าไปในเครื่อง HPLC-FL โดยการทำซ้ำอย่างแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์นี้ วิเคราะห์ 3 ลักษณะคือ ความแม่นยำของวิธีการสกัด (precision of extraction) ความแม่นยำของการสกัดภายในวันเดียวกัน (precision of within-day) และความแม่นยำของการสกัดระหว่างวัน (precision of between-day)

- ความแม่นยำของวิธีการสกัด (precision of extraction) เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันวิธีการสกัดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ด้วย SPE column โดยการศึกษาความแม่นยำของการทดลองนี้เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งเป็น 5 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 5, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำ 5 ครั้ง นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน AFB₁ ที่ได้มาคำนวณค่า %CV

- ความแม่นยำของการสกัดภายในวันเดียวกัน (precision of within-day) เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันถึงวิธีการสกัดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ด้วย SPE column โดยการศึกษา

ภายในวันเดียวกัน การทดลองนี้เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งเป็น 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ดังนี้ 5, 20 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน AFB₁ ที่ได้มาคำนวณค่า %CV

- ความแม่นยำของการสกัดระหว่างวัน (precision of between-day) เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันถึงวิธีการสกัดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ด้วย SPE column โดยการสกัดระหว่างวัน คือการสกัดซ้ำ 3 วันติดต่อกัน การทดลองนี้เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งเป็น 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ดังนี้ 5, 20 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน AFB₁ ที่ได้มาคำนวณค่า %CV

- ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) การศึกษาหาค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ โดยการฉีดตัวอย่างที่ถูกเติมสารละลายมาตรฐานก่อนการสกัดและตัวอย่างที่ถูกเติมหลังการสกัดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ด้วย SPE column หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่ถูกเติมก่อนการสกัดและที่ถูกเติมหลังการสกัด การคำนวณหาได้จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ recovery} = (\text{พื้นที่ใต้กราฟที่ถูกเติมก่อนการสกัด} / \text{พื้นที่ใต้กราฟที่ถูกเติมหลังการสกัด}) \times 100$$

3) Method validation ของวิธีการสกัด AFB₁ ออกจากถั่วลิสงในระบบจำลองทางเดินอาหารด้วยตัวทำละลาย (Liquid-Liquid Extraction หรือ LLE)

เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งออกเป็น 3 ระดับความเข้มข้น คือ 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นเตรียมอย่างละ 5 หลอดการทดลอง นำไปคลุกเคล้ากับถั่วลิสงบดหนัก 4.5 กรัม นำไปเติมน้ำย่อยเทียมในส่วนต่างๆ ได้แก่ น้ำลายเทียม น้ำกระเพาะเทียม น้ำลำไส้เล็กเทียมและน้ำดีเทียม โดยควบคุมตัวแปรต่างๆ ได้แก่ เวลา อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อเป็นการจำลองระบบทางเดินอาหาร หลังจากนั้นสกัด AFB₁ ด้วยตัวทำละลาย ระเหยให้แห้งโดยนำไปต้มบนอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส ทำอนุพันธ์เรืองแสง AFB₁ ด้วย TFA นำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง HPLC-FL ฉีดแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง ทำการทดสอบตามเงื่อนไขของ Guidance for industry: Bioanalytical method validation ขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA, 2001) ดังนี้

- ช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน AFB₁ ที่สกัด AFB₁ ออกจากถั่วลิสงในระบบจำลองทางเดินอาหารด้วยตัวทำละลาย (Linearity range) ทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ ให้มีความเข้มข้น 4 ความเข้มข้นสำหรับการวิเคราะห์หาความสามารถของวิธีการสกัด AFB₁ ด้วย SPE column ดังนี้ 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นเตรียม 5 ตัวอย่างและฉีดซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาเขียน

กราฟเส้นระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของ AFB₁ กำหนดให้ค่า Correlation coefficient $r \geq 0.990$

- การทำซ้ำอย่างแม่นยำในการฉีดสารมาตรฐาน AFB₁ ที่สกัด AFB₁ ออกจากถั่วลิสงในระบบจำลองทางเดินอาหารด้วยตัวทำละลายในแต่ละครั้ง (Precision of injection) ทำได้โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเข้าไปในเครื่อง HPLC-FL

โดยการทำซ้ำอย่างแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์นี้ วิเคราะห์ 3 ลักษณะคือ ความแม่นยำของวิธีการสกัด (precision of extraction) ความแม่นยำของการสกัดภายในวันเดียวกัน (precision of within-day) และความแม่นยำของการสกัดระหว่างวัน (precision of between-day) ซึ่งขั้นตอนของวิธีการทดลองนี้เหมือนกันกับวิธีการสกัดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ด้วย SPE column

- ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) เป็นการศึกษาหา %recovery ของวิธีวิเคราะห์ หลังการสกัดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ที่สกัด AFB₁ ออกจากถั่วลิสงในระบบจำลองทางเดินอาหารด้วยตัวทำละลาย ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานที่ถูกเติมก่อนการสกัดและที่ถูกเติมหลังการสกัด โดยการทดลองนี้การศึกษา % recovery ของการทดลองนี้เตรียมสารมาตรฐาน AFB₁ แบ่งเป็น 4 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง สามารถคำนวณหา %recovery ได้จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ recovery} = (\text{พื้นที่ใต้กราฟสารก่อนการสกัด} / \text{พื้นที่ใต้กราฟสารหลังการสกัด}) \times 100$$

3.2.3 ศึกษาหาความสามารถของ LAB ทั้ง 26 ไอโซเลทที่แยกได้จากอาหารหมักไทย ประเภทเนื้อต่อการจับกับ AFB₁ (Binding study)

1) ศึกษาความสามารถของ LAB ทั้ง 26 ไอโซเลทที่แยกได้จากอาหารหมักไทย ประเภทเนื้อต่อการจับกับ AFB₁

เพื่อศึกษาความสามารถของ LAB ในแต่ละไอโซเลทต่อการจับกับ AFB₁ โดยเติม LAB แขนงลอยในสารละลาย PBS (pH 5.8) ที่มีสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ที่รู้ความเข้มข้นเข้มข้นแน่นอนและนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาทำวิธี clean-up sample โดยใช้ Sep-Pak[®] column นำมาทำอนุพันธ์ของ AFB₁ โดยเติม TFA และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ AFB₁ ซึ่งค่าที่วัดได้นั้นเป็นค่าของ AFB₁ ที่ไม่ได้ถูกจับกับ LAB (Free AFB₁) โดยนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ผลของการจับของ LAB ในแต่ละสายพันธุ์กับ AFB₁ โดยการคำนวณหาค่าร้อยละของ BAF (%binding

of aflatoxin B₁; %BAF) หรือค่าร้อยละของ LAB ที่จับกับ AFB₁ (Zinedine, A., Faïd, M., & Benlemlih, M., 2005)

คำนวณ %BAF จากสูตรดังนี้ (%BAF) = $(1 - (\text{Peak area of sample} / \text{Peak area of control})) \times 100$

การเตรียม LAB จับกับ AFB₁

- เติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LAB จำนวน $2-3 \times 10^9$ CFU/mL ลงไปแขวนลอยในสารละลาย PBS (pH 5.8) และนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

การแยกสิ่งรบกวน (Sample clean-up preparations)

- การแยกสารให้มีสิ่งรบกวนลดลง โดยใช้ SPE column (Sep-Pak[®]) นำมาต่อกับ vacuum manifold หรือหลอดทดลองที่เหมาะสมแล้วเติม methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และร้อยละ 8 ของ acetonitrile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน cartridge ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง ระวังต้องไม่ให้ cartridge แห้งในระหว่างการวิเคราะห์

- เติมตัวอย่างใส่ cartridge โดยให้มีปริมาตรของสารมากถึง 2 ใน 3 ส่วนจากปริมาตรเต็มและให้สารไหลผ่าน cartridge โดยควบคุมให้อัตราการไหลของสารผ่านด้วยความเร็ว 2-3 มิลลิลิตรต่อนาทีหลังจากนั้นล้าง cartridge ต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง ด้วยน้ำปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงทำ cartridge ให้แห้งโดยใช้แรงดูดอากาศช่วยหรือเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และสุดท้ายจะ (elute) AFB₁ ออกมาจาก cartridge โดยใช้ methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำต่อเนื่องกัน 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งอีกครั้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน

การทำอนุพันธ์ AFB₁ ด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) (TFA Derivatization)

- เติม hexane ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ TFA ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงใน residue ที่เหลืออยู่ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ แล้วนำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม acetonitrile:water (อัตราส่วน 1 ต่อ 9) ปริมาตร 1.95 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการแยกชั้นและนำเฉพาะส่วนที่มี acetonitrile:water ซึ่งมี AFB₁ อยู่ไปวิเคราะห์ คือชั้นส่วนข้างล่าง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ Free AFB₁ โดยเครื่อง HPLC ที่ต่อพ่วงด้วย fluorescence detector (HPLC-FL)

การวิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁ โดยเครื่อง HPLC-FL

- หลังจากนำตัวอย่างที่ผ่านการทำอนุพันธ์ด้วย TFA แล้ว นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL ปริมาตร 30 ไมโครลิตรและคอลัมน์ที่ใช้คือ C18 Gemini (Phenomenex[®]) ขนาด 5 ไมโครเมตร RP (150 มิลลิลิตร) และจัดให้เครื่อง HPLC-FL มีสภาวะต่างๆ ดังนี้

- 1) Mobile phase = methanol: acetonitrile: water (20:20:60)
- 2) Flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- 3) ความยาวคลื่น Excitation wavelength = 365 นาโนเมตรและความยาวคลื่น Emission wavelength = 455 นาโนเมตร

2) การศึกษาพิสูจน์ยืนยันการจับ (binding affirmation) ของ LAB กับ AFB₁

เพื่อยืนยันว่าปริมาณของ AFB₁ ที่ลดลง หลังจากเติม LAB ลงไปในหลอดทดลองที่มีสารละลาย AFB₁ ที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อวัดหาปริมาณความเข้มข้นของ AFB₁ ที่เหลืออยู่ หากพบว่าความเข้มข้นของ AFB₁ ลดลงจากความเข้มข้นตั้งต้น เราจะทราบได้อย่างไรว่าค่าที่ลดลงนั้นเกิดจากกลไกการทำงานของ LAB ที่จับกับ AFB₁ จริง ดังนั้นการทดลองนี้เป็นการศึกษาเพื่อพิสูจน์และยืนยันว่าการทำงานของ LAB ต่อ AFB₁ ในการวิจัยนี้เป็นกลไกการจับของ LAB กับ AFB₁ จริง

การเตรียม LAB จับกับ AFB₁

- ออกแบบการทดลองเป็น 4 หลอด ดังนี้ หลอดที่ 1 คือหลอดทดลองควบคุมเติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ แขนวลอยในสารละลาย PBS สำหรับหลอดที่ 2 และ 3 เติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ และ LAB แขนวลอยในสารละลาย PBS แล้วนำทุกหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง
- เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อ นำหลอดทดลองที่ 1 และ 2 ไปสกัดด้วย SPE และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁ ด้วยเครื่อง HPLC-FL
- สำหรับหลอดทดลองที่ 3 เมื่อครบเวลาที่บ่มเชื้อ นำไปผ่านการปั่นเหวี่ยง ก่อนไปผ่านการสกัดด้วย SPE นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁ ด้วยเครื่อง HPLC-FL
- สำหรับตะกอนของหลอดที่ 3 ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว นำไปเติมด้วย methanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและนำไปสกัดด้วย SPE แล้วนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง HPLC-FL สำหรับการทดลองนี้ทำให้เป็นหลอดทดลองที่ 4

แสดงวิธีเตรียมหลอดทดลองทั้ง 4 การทดลองไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเตรียมหลอดทดลองสำหรับการศึกษาคุณสมบัติในการจับของ LAB กับ AFB₁

ลักษณะหลอดทดลอง	วิธีเตรียม
1) หลอดทดลองควบคุม	สารละลาย AFB ₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร + สารละลาย PBS
2) หลอดทดลองที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง	สารละลาย AFB ₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร + สารละลาย PBS + LAB จำนวน $2-3 \times 10^9$ CFU/mL
3) หลอดทดลองที่นำไปผ่านการปั่นเหวี่ยง	สารละลาย AFB ₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร + สารละลาย PBS + LAB จำนวน $2-3 \times 10^9$ CFU/mL
4) หลอดทดลองตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง	ตะกอนเชื้อจากหลอดทดลองที่ 3 + methanol 500 ไมโครลิตร

3) การศึกษาหาช่วงเวลาที่ LAB สามารถจับกับ AFB₁ ได้สูงสุด

เพื่อศึกษาหาช่วงเวลาที่ LAB สามารถจับกับ AFB₁ ได้สูงสุด โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ และ LAB ไปแขวนลอยในสารละลาย PBS (pH 5.8) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 0, 4, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาทำวิธี clean-up sample โดยใช้ Sep-Pak[®] column นำมาทำอนุพันธ์ของ AFB₁ โดยเติม TFA และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ AFB₁ ซึ่งค่าที่วัดได้นั้นเป็นค่าของ AFB₁ ที่ไม่ได้ถูกจับกับ LAB (Free AFB₁) โดยนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลของการจับของ LAB ในแต่ละสายพันธุ์กับ AFB₁ โดยการคำนวณหาค่าร้อยละของ BAF (%BAF) หรือค่าร้อยละของ LAB ที่จับกับ AFB₁ แล้วเลือกเฉพาะช่วงเวลาที่ค่า %BAF สูงสุดไปวิเคราะห์ต่อในการทดลองถัดไป โดยสามารถคำนวณหาค่า %BAF (%binding of aflatoxin B₁) ได้จากสูตรดังนี้

$$(\%BAF) = (1 - (\text{Peak area of sample} / \text{Peak area of control})) \times 100$$

การเตรียม LAB จับกับ AFB₁

- เติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LAB จำนวน $2-3 \times 10^9$ CFU/mL ลงไปแขวนลอยในสารละลาย PBS (pH 5.8) และนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 0, 4, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

การแยกสิ่งรบกวน (Sample clean-up preparations)

- การแยกสารให้มีสิ่งรบกวนลดลง โดยใช้ SPE column (Sep-Pak®) นำมาต่อกับ vacuum manifold หรือหลอดทดลองที่เหมาะสมแล้วเติม methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และร้อยละ 8 ของ acetonitrile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน cartridge ทำซ้ำเช่นนี้ 2 ครั้ง ระวังต้องไม่ให้ cartridge แห้งในระหว่างการวิเคราะห์

- เติมตัวอย่างใส่ cartridge โดยให้มีปริมาตรของสารมากถึง 2 ใน 3 ส่วนจากปริมาตรเต็มและให้สารไหลผ่าน cartridge โดยควบคุมให้อัตราการไหลของสารผ่านด้วยความเร็ว 2-3 มิลลิลิตรต่อนาทีหลังจากนั้นล้าง cartridge ต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง ด้วยน้ำปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงทำ cartridge ให้แห้งโดยใช้แรงดูดอากาศช่วยหรือเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และสุดท้ายชะ (elute) AFB₁ ออกจาก cartridge โดยใช้ methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำต่อเนื่องกัน 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งอีกครั้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน

การทำอนุพันธ์ AFB₁ ด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) (TFA Derivatization)

- เติม hexane ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ TFA ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงใน residue ที่เหลืออยู่ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ แล้วนำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม acetonitrile : water (อัตราส่วน 1 ต่อ 9) ปริมาตร 1.95 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการแยกชั้นและนำเฉพาะส่วนที่มี acetonitrile:water ซึ่งมี AFB₁ อยู่ไปวิเคราะห์ คือชั้นส่วนข้างล่าง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ Free AFB₁ โดยเครื่อง HPLC-FL

3.2.4 การศึกษาความสามารถในการปลดปล่อย AFB₁ หลังการจับกับ LAB ออกจากอาหาร (ถั่วลิสง) โดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* digestion model)

เพื่อศึกษาการปลดปล่อยของ AFB₁ ที่จับกับ LAB ออกจากอาหาร(ถั่วลิสง) โดยใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหาร (*In vitro* digestion model study) โดยการนำ LAB และ AFB₁ ที่จับกันแล้วที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมงไปคลุกเคล้ากับอาหาร(ถั่วลิสง) และเติมน้ำย่อยเทียมในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารตั้งแต่ ปาก กระเพาะอาหาร ลำไส้และน้ำดี โดยควบคุมสถานะตัวแปรแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด่าง อุณหภูมิและเวลา หลังจากนั้นนำสารตัวอย่างที่ผ่านการจำลองระบบทางเดินอาหารเรียบร้อยแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายและทำอนุพันธ์ของ AFB₁ ด้วย TFA แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ AFB₁ โดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าปริมาณการปลดปล่อยของ AFB₁ ออกจากถั่วลิสง

โดยออกแบบการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองแรก เลียนแบบการรับประทานถั่วลิสงที่มีการปนเปื้อนของ AFB₁ โดยทานไปพร้อมกับ LAB ทันทีก็นำไปผ่านกระบวนการเติมน้ำย่อยในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร ซึ่งการทดลองนี้ระยะเวลาในการจับของ AFB₁ กับ LAB คิดให้เป็น 0 ชั่วโมง การทดลองที่สองคือ นำ LAB กับ AFB₁ แฉวนลอยในสารละลาย PBS แล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปปลูกเซลล์กับถั่วลิสงและนำไปผ่านกระบวนการเติมน้ำย่อยในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารเช่นกัน การทดลองนี้ระยะเวลาในการจับของ AFB₁ กับ LAB คิดให้เป็น 48 ชั่วโมง

- สำหรับการทดลองที่ 1 หมายความว่า ระยะเวลาในการจับของ AFB₁ กับ LAB เป็น 0 ชั่วโมง นำสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปลูกเซลล์กับตัวอย่างถั่วลิสงบดหนัก 4.5 กรัมและเติม LAB จำนวน $2-3 \times 10^9$ CFU/mL ที่แขวนลอยในสารละลาย PBS (pH 5.8) แล้วปลูกเซลล์ให้เข้ากัน นำไปเติมน้ำย่อยในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารในขั้นตอนต่อไป

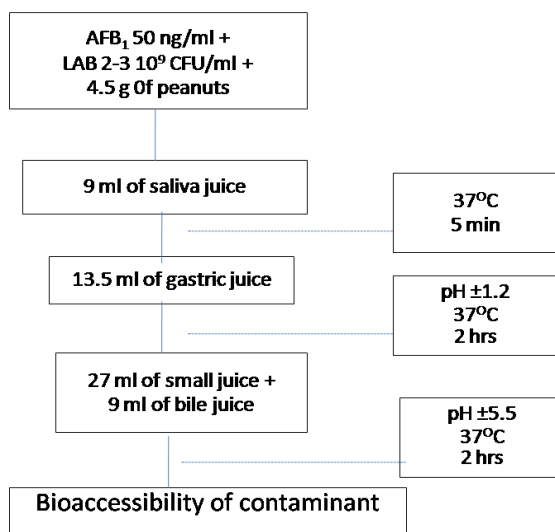
- สำหรับการทดลองที่ 2 หมายความว่า ระยะเวลาในการจับของ AFB₁ กับ LAB เป็น 48 ชั่วโมง โดยเติมสารมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติม LAB จำนวน $2-3 \times 10^9$ CFU/mL ที่แขวนลอยในสารละลาย PBS (pH 5.8) นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปปลูกเซลล์กับถั่วลิสงบดหนัก 4.5 กรัม ปลูกเซลล์ให้เข้ากันและนำไปเติมน้ำย่อยในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารในขั้นตอนต่อไป

ลำดับการเติมน้ำย่อยในส่วนต่างๆ

- หลังจากเติม LAB ลงไปในถั่วลิสงที่ถูกปลูกด้วยสารมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรแล้ว เติมน้ำลายเทียมปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในตัวอย่างและวางตัวอย่างบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที

- เติมน้ำย่อยเทียมในส่วนของกระเพาะอาหารปริมาตร 13.5 มิลลิลิตร ขณะตัวอย่างเขย่าอย่างต่อเนื่องบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

- เติมน้ำย่อยเทียมส่วนของลำไส้เล็กปริมาตร 27 มิลลิลิตรและน้ำดีปริมาตร 9 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลาที่กำหนด นำไปสกัดหาปริมาณ AFB₁ ด้วยวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย



ภาพที่ 6 ลำดับขั้นตอนการเติมตัวอย่างในน้ำย่อยในส่วนต่างๆ (Oomen, Rompelberg, Bruil, Dobbe, Pereboom, & Sips, 2003)

สกัดหาปริมาณ AFB₁ ด้วยวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

- นำตัวอย่างที่ผ่านการเติมน้ำย่อยเทียมในส่วนต่างๆของทางเดินอาหาร นำไปเติม zinc acetate/aluminium chloride TS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนานประมาณ 5 นาทีนำไปกรองสารละลายโดยผ่านกระดาษกรอง
 - เก็บเฉพาะสารละลายในส่วนล่างมาสกัดต่อโดยใส่ลงไปใน separating funnel โดยเติมร้อยละ 10 ของสารละลาย sodium chloride ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและเติม light petroleum ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที
 - แยกเฉพาะสารละลายส่วนล่างใส่ลงไปใน separating funnel อันใหม่ สกัดต่อด้วย dichloromethane ปริมาตร 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แต่แต่ละครั้งเขย่าให้เข้ากันนานประมาณ 1 นาทีและรอให้ทั้งสองแยกชั้นกัน เก็บเฉพาะสารละลายส่วนล่างของ dichloromethane มาใช้ต่อ
 - นำเฉพาะสารละลายส่วนล่างของ dichloromethane ที่ได้จากการสกัดไประเหยให้แห้งบน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
- การทำอนุพันธ์ AFB₁ ด้วยสารเรืองแสง TFA (Derivatization)
- เติม hexane ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ TFA ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงใน residue ที่เหลืออยู่ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ แล้วนำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม acetonitrile:water (อัตราส่วน 1 ต่อ 9) ปริมาตร 1.95 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการแยกชั้น นำเฉพาะส่วนที่มี acetonitrile:water ซึ่งมี AFB₁ อยู่คือส่วนล่าง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ AFB₁ โดยฉีดสารสกัดเข้าเครื่อง HPLC-FL

วิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁ โดยเครื่อง HPLC-FL

- นำตัวอย่างที่ผ่านการทำอนุพันธ์ด้วย TFA นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC-FL ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

3.2.5 การบ่งชี้หาสายพันธุ์ของ LAB โดยใช้ชุดทดสอบ API[®] 50 CH (Identification of

- นำ LAB ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth ไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS agar โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว

- นำ LAB ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวแล้ว เชื้อเชื้อ LAB ทั้งหมดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรแล้วนำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที (หลอดทดลอง A)

- ตวงสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง (หลอดทดลอง B) คูณเชื้อจากหลอดทดลอง A ใส่ลงไปในหลอดทดลอง B และนำไปเปรียบเทียบความขุ่นให้เทียบเท่ากับ 2 standard McFarland scale หรือเปรียบเทียบความขุ่นโดยการวัดภายใต้เครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกปริมาณของเชื้อจากหลอดทดลอง A ที่ดูมาใส่ในหลอดทดลอง B ด้วย (แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง McFarland scale กับความเข้มข้นของแบคทีเรียและค่า OD ดังตารางที่ 5)

- คูณเชื้อจากหลอดทดลอง A ตามปริมาณที่บันทึกไว้ใส่ลงไปใน medium ของชุดทดสอบ API[®] 50 CHL ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (หลอดทดลอง C) แล้วนำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที

- คูณเชื้อจากหลอดทดลอง C ใส่ลงไปในแต่ละหลุมของชุดทดสอบ API[®] 50 CH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากนั้นหยด mineral oil ลงไปในแต่ละหลุมด้วยปริมาณที่เติมหลุมของชุดทดสอบ API[®] 50 CH เพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนเข้าไประหว่างทำการบ่มเชื้อ

- นำชุดทดสอบ API[®] 50 CH ไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ medium ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพร้อมทั้งบันทึกผล โดยบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีของ medium ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง McFarland scale กับความเข้มข้นของแบคทีเรียและค่า OD

Standard McFarland scale	Bacterial concentration x10 ⁸ /ml	Theoretical optical density at 550 nm
0.5	1.5	0.125
1	3	0.250
2	6	0.500
3	9	0.750
4	12	1.000
5	15	1.250
6	18	1.500

ตารางที่ 6 การบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีอินดิเคเตอร์ของชุดทดสอบ API[®] 50 CH

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของ Medium ของชุดทดสอบ API [®] 50 CH	สัญลักษณ์
Medium เปลี่ยนจาก สีน้ำเงินเป็นสีเหลือง	+
Medium ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี	-
Medium เปลี่ยนจาก สีน้ำเงินเป็นสีเขียว	ข
Medium หมายเลขที่ 25 เปลี่ยนจาก สีน้ำเงินเป็นดำ	ค

- นำข้อมูลจากการเปลี่ยนแปลงสีอินดิเคเตอร์ของชุดทดสอบ API[®] 50 CH
นำไปวิเคราะห์เพื่อป่งชี้หาสายพันธุ์ของ LAB โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์และประเมินผลของชุด
ทดสอบ API[®] 50 CH ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ในแต่ละหลุมที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อ
นำไปเข้าโปรแกรมประเมินผลของชุดทดสอบของ API[®] 50 CHL Software ทำให้สามารถจำแนก
สกุลและสปีชีส์ของ LAB ได้

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

3.3.1 ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา MDL 6 คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3.2 ห้องปฏิบัติการกลาง MDL 4 คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3.3 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยี เภสัชกรรม MDL 1 คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น